

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 957**

51 Int. Cl.:

**A61K 36/00** (2006.01)

**A61K 31/015** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2012 PCT/SE2012/051048**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13051994**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2012 E 12781489 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2750683**

54 Título: **Nanopartículas, procedimiento para la preparación y utilización de las mismas como portadoras de moléculas anfipáticas o hidrofóbicas en el campo de la medicina, incluyendo el tratamiento del cáncer, y compuestos de tipo alimentario**

30 Prioridad:  
**03.10.2011 US 201161542425 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.06.2018**

73 Titular/es:  
**MX ADJUVAC AB (100.0%)  
Härkebergaby 6  
74596 Enköping, SE**

72 Inventor/es:  
**MOREIN, BROR;  
BERENJIAN, SAIDEH y  
HU, KEFEI**

74 Agente/Representante:  
**ISERN JARA, Jorge**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 673 957 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

5 Nanopartículas, procedimiento para la preparación y utilización de las mismas como portadoras de moléculas anfipáticas o hidrofóbicas en el campo de la medicina, incluyendo el tratamiento del cáncer, y compuestos de tipo alimentario

CAMPO DE LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden esteroles y un componente derivado de *Quillaja saponaria Molina* seleccionado de entre ácido de *Quillaja* y saponina de *Quillaja*, en la que las nanopartículas no comprenden un fosfolípido como componente esencial. Se refiere además a una composición que comprende las nanopartículas y a la utilización de las mismas como adyuvante, especialmente en vacunas y como agentes para el tratamiento del cáncer, como portadores para moléculas anfipáticas o hidrofóbicas en el campo médico, especialmente para el tratamiento del cáncer y para compuestos de tipo alimentario. Asimismo, se refiere a un método para producir nanopartículas libres de fosfolípidos, a un método para el tratamiento del cáncer y a un método para evaluar la aplicabilidad del método de tratamiento del cáncer y para la preparación de compuestos de tipo alimentario solubles en agua para facilitar su asimilación por el cuerpo.

TÉCNICA ANTERIOR

20 El complejo inmunoestimulante (ISCOM, por sus siglas en inglés) es una partícula de 40 nm compuesta de saponina procedente del árbol *Quillaja saponaria Molina*, que se asocia firmemente al colesterol, formando anillos hexagonales de 6 nm de diámetro. El tercer componente es un lípido, por ejemplo fosfatidilcolina, que adhiere los anillos para formar esferas de 40 nm. Dicha partícula se utiliza con los antígenos de vacuna específicos incorporados en la partícula o como una partícula adyuvante sin antígeno coadministrada con el antígeno de vacuna en una partícula separada. Las partículas del ISCOM pueden producirse mediante el método descrito por Lövgren y Morein y en la patente nº EP 0 436 620 así como en el documento nº WO2004/004762.

30 Un problema con ISCOM y la matriz ISCOM es su compleja tecnología de producción. Lo anterior también plantea problemas en la utilización como sistema portador/de administración, por ejemplo para integrar moléculas/compuestos como pasajeros o para conseguir efectos complementarios a los efectos farmacológicos y vacunales, o como dispositivo de administración dirigida.

35 Las vacunas se basan mayoritariamente en microorganismos completos o subunidades que estimulan las respuestas inmunológicas, incluyendo las respuestas tanto de anticuerpos como de células T contra estructuras de superficie. Alternativamente, los antígenos de vacuna son subunidades, es decir, con frecuencia, proteínas de superficie, aunque también son proteínas internas/intracelulares o incluso proteínas no estructurales que se expresan en vectores celulares. Las proteínas de superficie y antígenos carbohidratos con frecuencia se valoran por su capacidad de inducir respuestas de anticuerpos, sin excluir que también inducen respuestas mediadas por células, incluyendo las de células T; sin embargo, mayoritariamente respuestas no de células T citotóxicas. Se utilizan las proteínas internas y no estructurales como antígenos de vacuna para inducir respuestas de células T, incluyendo células T citotóxicas, ya que los anticuerpos no interactúan con las proteínas internas de los agentes infecciosos y pueden, por lo tanto, no mediar en la protección inmunológica en el punto temporal de infección. En contraste, la inmunidad mediada por células, incluyendo células T ayudantes y células T citotóxicas, puede matar las células infectadas, es decir, después del punto temporal de infección. Se utilizaron formulaciones y productos de tecnología ISCOM para incrementar la inmunogenicidad de los antígenos accesibles, es decir, antígenos de superficie y los antígenos revelados por la disrupción (antígenos internos) del agente a partir del cual y contra el cual se ha preparado la vacuna, ver Morein et al., 2007<sup>3</sup> y documento nº WO2011/005183. También puede producirse cualquier antígeno de vacuna mediante técnicas de ADN<sub>r</sub> y en muchos casos también sintéticamente, tal como describen Lövgren y Morein<sup>2</sup>. La tecnología ISCOM se describe en varias solicitudes de patente, incluyendo los documentos nº US 2006/0121065, nº EP1539231A1, nº WO 2004/004762 y nº WO2005/002620.

55 Los adyuvantes en general se utilizan para potenciar el nivel y calidad de las respuestas inmunológicas de los antígenos incluidos en la formulación de vacuna. Sin embargo, existen varios agentes infecciosos para los que todavía existe una necesidad no satisfecha de vacuna protectora de los mismos y que escapan a la protección inmunológica:

- Los mutantes de escape (virus influenza humano, coronavirus del pollo (virus de la bronquitis infecciosa [VBI]) y virus de la hepatitis C (VHC).
- Que no revelan los determinantes antigénicos:
  - Inaccesibles-ocultos (*Staphylococcus aureus* [SA], *Streptococcus equi*)
  - Dominancia inmunológica por otros determinantes antigénicos en el microorganismo ejemplificado por virus influenza en el ser humano, parvovirus que provoca enfermedad aleutiana en el visón, virus de la hepatitis C (VHC) en el ser humano.

- o Inducción de respuestas inmunológicas que exacerban la enfermedad (parvovirus [enfermedad aleutiana] del visón]
- o Vacunas destinadas a especies de patógenos que presentan de muchas a innumerables variantes que provocan que resulte difícil/excesivamente costoso, alternativamente que permiten que resulte más económico, producir una vacuna con cobertura suficiente, por ejemplo VIH y hepatitis C en el ser humano. También es bien conocido que existen varias vacunas que necesitan varias, hasta 23, componentes de vacuna procedentes del mismo número de variantes de cepa, por ejemplo variantes de carbohidrato (vacunas conjugadas, por ejemplo *Haemophilus influenzae*, *Meningococcus meningitides*, *Streptococcus pneumonia*, *Streptococcus pyogenes*, *Pneumococcus pneumonie* y también *Staphylococcus aureus*) que presentan diversos antígenos de cápsula.
- o Siguen existiendo otras necesidades no satisfechas para diversos cocos Gram+, por ejemplo *Staphylococcus* spp. en animales, en particular se requieren vacunas que protegen contra la mastitis en rumiantes, causada por *S. aureus*, *Streptococcus* spp. en el caballo (*Str. equi*, *Str. zooepidemicus*), en vacas (*Str. agalacti*, *Str. dysgalacti* y *Str. uberis*)
- o Pecado antigénico (gripe) o antígeno de supresión epitópica inducida por portador (CIES, por sus siglas en inglés).
- o Los agentes de replicación rápida, p.ej. el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), complican el escape de los mecanismos de protección inmunológica del huésped con nuevas variantes aparecidas, incluyendo las inducidas por vacunas.
- o Las vacunas de ADN y ARN en muchos casos no presentan adyuvantes.

De esta manera, existe una necesidad no satisfecha de incrementar la capacidad de las vacunas de responder a nuevas situaciones que, p.ej., conducen a epidemias e incluso a pandemias, o de mejorar la posibilidad de mantener el valor de protección de una vacuna mediante la evasión de los efectos negativos de la mutación de escape o de compensar la inmunidad perdida mediante escape por mutación, o de potenciar la protección inmunológica frente a variantes nuevas debido a mutaciones durante la infección. Por este motivo, también pueden resultar necesarias nuevos adyuvantes particulados de vacuna con la flexibilidad para hacer virar la respuesta inmunológica a un perfil inmunológico requerido para la protección frente a un patógeno particular.

El cáncer se trata de diversas maneras, entre ellas la cirugía, la radiación y con fármacos, es decir, fármacos citostáticos. El tratamiento médico generalmente con fármacos citostáticos causa efectos secundarios severos, por ejemplo la radioterapia con frecuencia provoca efectos secundarios severos. De esta manera, existe una necesidad no cubierta de un tratamiento médico que resulte bien tolerado por el paciente. La publicación de patente internacional nº WO2008/063129 y Hu et al.<sup>1</sup> describen nanopartículas que comprenden colesterol, fosfatidilcolina y las fracciones de saponina de *Quillaja* ASAP (acil-saponina, correspondiente a QS 21 o QHC) o DSAP (desacil-saponina, correspondiente a QS 7 o QHA). Dichas partículas, denominadas KGI y BBE, se ha descrito que matan células de cáncer a concentraciones 30 a 40 veces inferiores que células normales de origen similar, tal como se indica en la invención "Killcan, New Use" en la solicitud de patente nº PCT/SE 2007/050878 y el documento nº WO2008/063129 y Hu et al.<sup>1</sup> Dichas partículas presentan una complejidad de producción similar a las descritas para ISCOM y la matriz ISCOM.

No pueden desarrollarse muchos fármacos potenciales debido a que no ha podido desarrollarse su solubilidad en agua, incluyendo su utilización en los campos de las vacunas/adyuvantes y la administración farmacológica, incluyendo los fármacos anticáncer. Si dichos potenciales fármacos se aprovecharán tal como se encuentran disponibles y se convirtieran en solubles en agua, algunos de ellos enriquecerían el mercado médico.

#### DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCIÓN

Los presentes inventores han identificado una necesidad de una nueva forma de nanopartícula que debe utilizarse como fármaco anticáncer, partícula portadora/de administración para fármacos y como adyuvante que pueda compensar las desventajas de las formulaciones de adyuvante-vacuna disponibles comercialmente.

Un problema de la tecnología ISCOM es el complejo procedimiento de formulación de las partículas, basado en la solubilización en detergentes de los componentes de *Quillaja*, el colesterol y el tercer componente, p.ej. fosfatidilcolina, p.ej. utilizando técnicas de ultrafiltración, flujo tangencial, diálisis o centrifugación. La totalidad de dichas técnicas, tal como se describen en Lövgren y Morein<sup>2</sup>, provocan la pérdida de material durante el procedimiento de producción.

Además, las tecnologías ISCOM no son fácilmente adaptables a la integración con otras moléculas hidrofóbicas o anfipáticas ya que los métodos desarrollados hasta hoy permiten una fuerte tendencia de dichos compuestos a formar espontáneamente complejos estables (autoensamblaje) en agua, p.ej. micelas, que no se integran en la formulación ISCOM, por ejemplo por interacción hidrofóbica.

La presente invención se refiere a una nanopartícula libre de fosfolípidos que comprende esterol y por lo menos una saponina.

En contraste con la presente invención, las partículas que contienen lípidos, tales como los liposomas, ISCOM, matriz

ISCOM, posintros y diversos tipos de liposomas para la preparación y utilización en fármacos, incluyendo formulaciones adyuvantes para potenciar la eficacia de las vacunas y en formulaciones de vacuna y formulaciones para el tratamiento del cáncer, contienen lípidos, tales como fosfolípidos, p.ej. Fosfatidilserina y fosfatidilcolina, estearilamina, etc.

5 Las nanopartículas según la invención pueden utilizarse además como sistemas de administración para uno o varios compuestos, por ejemplo para fármacos, incluyendo los utilizados para el tratamiento del cáncer, y compuestos relacionados con la alimentación, en los que una o más sustancias adicionales proporcionan funciones adicionales y modos de acción complementarios.

10 La ventaja de las nanopartículas según la invención las convierte en sustitutos de las formulaciones de la técnica anterior, incluyendo una aplicación más amplia como adyuvantes para cubrir nuevas variantes de un patógeno, p.ej. las futuras pandemias indicadas anteriormente.

15 La presente invención proporciona un procedimiento de producción fácil, con prácticamente ninguna pérdida, basado en la tecnología de la evaporación. Lo anterior no excluye la utilización de técnicas tales como las indicadas para la producción de los ISCOM o matriz ISCOM (ver anteriormente).

20 Se describen aspectos de la invención en las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferentes se exponen en las reivindicaciones dependientes.

Descripción corta de los dibujos adjuntos

25 Figura 1A. La microscopía electrónica (ME) muestra una nanopartícula que comprende colesterol, QHC y diterpenoide en una proporción molar de 1:1:0,5. Las partículas presentan un diámetro medio de aproximadamente 17 a 20 nm según la invención. Es claramente diferente de una partícula ISCOM de aproximadamente 40 nm tal como se ilustra en la fig. 1B. Las partículas según la invención sin el diterpenoide presentan la misma morfología. Figura 1B. La microscopía electrónica muestra una partícula similar a ISCOM que comprende colesterol, QHC y fosfatidilcolina en una proporción molar 1:1:0,5. Las partículas se preparan tal como se describe utilizando una tecnología similar a la descrita en el Ejemplo 1, según el diseño C en el Ejemplo 1 presentan un diámetro de aproximadamente 40 nm, es decir utilizando el. La morfología y tamaño son claramente diferentes de los de una nanopartícula según la invención, tal como se ilustra en la fig. 1A.

30 Figura 2. Comparación entre la capacidad de eliminación de células de cáncer de nanopartículas G3 y KGI, en donde ambas contienen QHC, sometidas a ensayo en células U937. G3 y KGI presentaban prácticamente el mismo efecto de eliminación de células de cáncer en el modelo de células tumorales (P=0,8422).

35 Figura 3. Comparación entre G3 y KGI en la inducción de células tumorales U937 para producir IL-8, que muestra que ambas partículas presentan una capacidad similar de inducir a que las células de cáncer produzcan citoquinas, indicando la diferenciación de las células de cáncer (P>0,05).

40 Figura 4A. Estevia es el inductor más fuerte de IL-12B, IL-6 e IL-1alfa en comparación con BBE o KGI.

40 Figura 4B. DT, la incorporarlo en G3, regula positivamente la expresión génica de citoquina IL-12 de las células dendríticas (CD) humanas normales.

45 Figura 5. Las partículas G3 influyen sobre la producción intracelular de TK de las células U937 en una magnitud similar a la de las partículas KGI (las columnas en cada combinación de concentración-formulación indica los puntos temporales 24, 48, 72, 96 y 120 horas, de izquierda a derecha).

45 Figura 6. Curvas de titulación de G3, G3 con DT incorporado (G3-DT) y QHC no particulado, en células de leucemia mieloide aguda (LMA) HL-60. Las formulaciones G3 y G3-DT matan las células de LMA más eficientemente que QHC no particulado libre.

50 Figura 7. Efectos autónomos y en combinación de G3 y citarabina sobre las células de LMA HL-60. G3 potencia significativamente la citarabina.

50 Figura 8. G3 potencia la capacidad de eliminación de la daunorrubicina de las células de cáncer LMA HL-60.

50 Figura 9. Curvas de titulación de G3, G3 con DT incorporado (G3-DT) y QHC en células de cáncer de próstata PC-3.

50 Figura 10. Efectos autónomos y en combinación de G3 y docetaxel sobre las células de cáncer de próstata PC-3. G3 potencia significativamente el efecto de eliminación de células de cáncer del docetaxel.

55 Figura 11. G3 potencia el efecto de eliminación del cabazitaxel sobre las células de cáncer de próstata PC-3.

55 Figura 12. Las curvas de titulación de células de cáncer renal ACHN muestran que G3 formulado con QHA es más potente (P<0,01) que G3 formulado con QHA en la eliminación de células de cáncer sólido.

60 Figura 13A. Calendario de inmunización.

60 Diseño experimental (ratones C56B16, 6 ratones/grupo, 200 µl/dosis, dos inmunizaciones s.c., separadas por 4 semanas)

- Grupo 1 (control de Abisco): Influenza 1 µg + ISCOM -5 µg
- Grupo 2 (G3-dosis alta): Influenza 1 µg + G3 - 5 µg
- Grupo 3 (G3-dosis intermedia): Influenza 1 µg + G3 - 2,5 µg
- Grupo 4 (G3-dosis baja): Influenza 1 µg + G3-1 µg
- Grupo 5 (G3 con DT): Influenza 1 µg + G3-2,5 µg

Grupo 6 (sin adyuvante, control de antígeno): Influenza 1 µg  
Grupo 7 (control no inmunizado)

Evaluación

5 Sangre para respuestas de anticuerpos. Células de bazo en la necropsia para inmunidad celular, incluyendo ensayo de proliferación, IL-4, IFN-γ.

10 Figura 13B. Respuesta de anticuerpos de inhibición de la hemaglutinación (IH) medida a las 3 semanas después de la primera inmunización.

Figura 13C. Respuesta de anticuerpos de IH de suero de ratón medida a las 4 semanas después de la segunda inmunización.

15 Figura 13D. Respuestas de citoquinas de células de bazo de ratón a las 4 semanas después de la segunda inmunización.

20 Figura 14A. La formulación de G3/VLX40 (la columna derecha) presenta un elevado efecto de eliminación de las células de cáncer (U937). En contraste con VLX40 solo (la columna izquierda), que presentó un efecto bajo de eliminación de las células de cáncer, indicando una elevada solubilidad de la formulación de G3/VLX40 y un bajo efecto de eliminación de células de cáncer de la formulación de VLX40-DMSO.

25 Figura 14B. La formulación de VLX40 DMSO (columna izquierda) presentaba una elevada actividad anticáncer en los precipitados. En contraste, el escaso precipitado de la formulación de G3-VLX40 (columna derecha) presentaba una baja actividad anticélulas de cáncer, indicando que la actividad anticélulas de cáncer se localiza esencialmente en la fase acuosa.

Definiciones

30 Todos los términos y palabras en la presente memoria deben interpretarse con el significado habitualmente asignado a ellos en la técnica relevante, a menos que se indique específicamente lo contrario. En aras de la claridad se definen a continuación unos cuantos términos.

35 Una formulación de vacuna es una formulación farmacéutica que se utiliza profilácticamente y mejora/potencia la inmunidad protectora frente a una o más enfermedades particulares. Una vacuna terapéutica según la invención puede utilizarse para curar enfermedades en el caso de que se incluya en la formulación según la invención un antígeno específico para un componente relacionado con la enfermedad o, como es el caso particular para el tratamiento del cáncer, el antígeno se encuentra presente en el cáncer/tumor. Una vacuna incluye un "antígeno" que induce una respuesta inmunológica en el sujeto tratado y, opcionalmente, una sustancia añadida a una vacuna para mejorar la respuesta inmunológica denominada "adyuvante".

40 De esta manera, un "antígeno" es la parte específica activa en una vacuna y puede ser el microorganismo entero, tal como un virus o bacteria, provocando la enfermedad para la que la vacuna pretende mejorar la inmunidad. También puede ser una parte de dicho microorganismo una subunidad, tal como una proteína (una subunidad), una parte de una proteína, una proteína aislada del microorganismo patogénico o producida mediante una técnica de ADNr o producida sintéticamente, denominada con frecuencia péptido. Un péptido presenta menos aminoácidos que una proteína.

50 Un "adyuvante" es un constituyente de vacuna que potencia el nivel y/o la calidad de la respuesta inmunológica a la parte antígeno de la vacuna profiláctica o terapéutica.

Un compuesto relacionado con la alimentación es cualquier compuesto relacionado con nutrientes, incluyendo vitaminas, sustancias activas para la salud y compuestos mejoradores del sabor.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

55 La presente invención se refiere a nanopartículas que comprenden esteroles y un componente de *Quillaja saponaria Molina* seleccionada de entre ácido de *Quillaja* y saponina de *Quillaja*, caracterizado porque dichas nanopartículas no comprenden un fosfolípido.

60 La partícula resultante según la innovación difiere de los ISCOM en el tamaño, en los que las partículas según la invención son menores de 40 nm, de aproximadamente ~20 nm, mientras que los ISCOM son de ~40 nm. De esta manera, la nanopartícula de la invención puede presentar un diámetro comprendido en el intervalo de 10 a 40 nanómetros, preferentemente de 12 a 35 nanómetros o de 15 a 25 nanómetros. El tamaño en cierto grado es dependiente de la carga de otras moléculas integradas aparte del colesterol y la molécula de *Quillaja*.

65 El esteroles puede seleccionarse de entre colesterol, colestanol, caprostanol, fitoesteroles, p.ej. estigmasterol, sitosterol,

micoesteroles, p.ej. ergosterol, preferentemente colesterol y vitamina D3 o cualquier compuesto hidrofóbico expuesto al agua para reaccionar covalentemente con un grupo reactivo en la solución acuosa, incluyendo la suspensión en agua de una micela.

5 Puede utilizarse la saponina de *Quillaja* o cualquiera de sus fracciones con un esqueleto triterpenoide común también denominado ácido de *Quillaja*. Hasta el momento se han descrito 4 formas de ácidos de *Quillaja*. Las saponinas de *Quillaja* forman cadenas con varios azúcares, con un grupo acilo, es decir, una acilsaponina (ASAP) o sin la cadena de acilo, es decir, desacilsaponina (DSAP), tal como se describe en, p.ej., Hu et al.<sup>1</sup>

10 La saponina puede ser hidrofílica y seleccionarse de entre las fracciones 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15 de Quil A, especialmente las fracciones 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14, descritas en el documento n° EP 0 3632 279 B2 y la fracción A de Quil A o Quil A en bruto.

15 La saponina puede ser un extracto en bruto o no procesado o no fraccionado de Quil A que comprende una mezcla de saponinas o una forma semipurificada de la misma, tal como extracto en polvo de *Quillaja* (Berghausen, UAS), *Quillaja* Ultra Powder QP UF 300, *Quillaja* Ultra Powder QP UF 1000 o Vax-Sap (los tres de Natural Responses, Chile) o de Prodalysa, Santiago, Chile. Pueden utilizarse las fracciones de saponina purificadas C y B, solas o combinadas entre sí. Las fracciones B y C se describen en el documento n° WO 96/11711, las fracciones B3, B4 y B4b se describen en la patente n° EP 0 436 620. Las fracciones QA1-22 descritas en el documento n° EP 0 3632 279 B2, Q-VAC (Nor-Feed, AS, Dinamarca), 'Spikoside' de *Quillaja saponaria Molina* (Isconova AB, Uppsala Science Park, 751 83, Uppsala, Suecia).

25 La saponina puede ser saponina hidrofóbica y seleccionarse de entre las saponinas que contienen ácidos grasos, p.ej. en la posición 4 en la aglicona triterpenoide de las saponinas de *Quillaja saponaria Molina*, tal como las fracciones C y B de Quil A o las fracciones de la región entre las fracciones A y B y las fracciones 15, 16, 17, 18, 19, 10 y 21 descritas en el documento n° EP 0 3632 279 B2; resultan especialmente adecuadas en la presente memoria las fracciones 17 y 18. Preferentemente, puede utilizarse la fracción de saponina de *Quillaja* QHA, QHB y/o QHC.

30 La proporción de colesterol a saponina de *Quillaja* puede ser de entre 1:10 y 10:1, preferentemente de entre 1:2 y 2:1.

Las nanopartículas según la invención pueden comprender además por lo menos una molécula anfipática o hidrofóbica, que puede seleccionarse de entre un antígeno, un adyuvante, una molécula dirigida, un compuesto farmacéutico y compuestos relacionados con la alimentación.

35 El antígeno puede ser cualquier antígeno con grupos anfipáticos o hidrofóbicos, tal como se describe en la solicitud de patente EPC n° 0 109 942 o manipularse para que presente una región hidrofóbica mediante la expresión de ADNr y producirse en células o sintetizarse químicamente. El adyuvante puede ser cualquier adyuvante con grupos anfipáticos o hidrofóbicos, tales como los obtenidos de *Quillaja saponaria Molina*.

40 Puede incorporarse una o más moléculas de compuesto en G3 para funciones complementarias, p.ej. como dispositivo de administración dirigida o como antígeno o antígenos complementarios en la utilización de vacunas para funciones inmunomoduladoras descritas en el documento n° EP 9600647-3 (PCT/SE97/00289) o como fármaco que incluye efectos anticáncer o nutricionales. Para la incorporación en partículas G3, las moléculas requieren dominios hidrofóbicos o estar unidas electrostáticamente a las partículas G3. Los compuestos que no presentan partes hidrofóbicas pueden acoplarse con moléculas que presentan dichas moléculas antes o después de la incorporación en la partícula G3 tal como se describe para una partícula similar en el documento n° EP 1800564.

50 Puede incorporarse cualquier adyuvante, tal como saponina de *Quillaja* natural o sintética, incluyendo sintética o semisintética, o derivados de la misma de *Quillaja saponaria Molina*, lípido A o derivados o versiones sintéticas del mismo, esqueleto de pared celular, aunque sin limitarse a los compuestos adyuvantes mencionados. Puede utilizarse un diterpenoide (DT) suministrado por Javier Saints, Prodalysa, Santiago, Chile, como adyuvante y nutriente (de estevia, un agente edulcorante). El diterpenoide (DT) se ha integrado en nanopartículas según la invención, resultando en nanopartículas típicamente pequeñas, de 17 nm.

55 Pueden utilizarse receptores que contienen lípidos y que se unen a componentes de unión a células, incluyendo receptores de la toxina del cólera, que es el gangliósido GM1, y antígenos de grupo sanguíneo fucosilados. Los componentes de unión a células también pueden funcionar como molécula de transporte dirigido a mucosa. La tecnología para complejos se describe en, por ejemplo, el documento n° WO97/30728 y puede aplicarse a las partículas G3 tanto para el tratamiento anticáncer como para la utilización en vacunas. Puede utilizarse cualquier subfragmento de *Quillaja saponaria Molina* por sí solo o en diversas combinaciones.

60 Los receptores suministrados con cola/región hidrofóbica destinada a capturar moléculas en la partícula de la invención para suministrar propiedades complementarias deseadas, por ejemplo un modo diferente de eliminación de las células de cáncer, p.ej. los anticuerpos monoclonales con diana en células de cáncer y también con un efecto de eliminación celular es una opción de portador-administrador.

65 De esta manera, otros componentes que pueden integrarse en la nanopartícula son fármacos, incluyendo fármacos

anticáncer que comprenden receptores de anticuerpos o anticuerpos monoclonales, tales como receptores de Fc o el DD de la proteína A de *Staphylococcus aureus* (documento nº WO2011/005183).

5 El método de producción de nanopartículas dado a conocer en la presente invención es más simple que para ISCOM y más adecuado para la incorporación de moléculas hidrofóbicas y anfipáticas. De esta manera, la nanopartícula de la invención es una nanopartícula adecuada para la administración de antígenos vacunales, fármacos para el tratamiento anticáncer, así como para cualquier tipo de fármaco. La partícula producida tal como se describe en la presente memoria también puede complementarse con moléculas anfipáticas integradas (lípidos, tales como  
10 estearilamina, etc.) para la utilización en la unión covalente a otras moléculas, p.ej. Fármacos o antígenos vacunales, o para la unión electrostática, unión de lectinas tal como se describen en Morein et al.<sup>3</sup> y en el documento nº WO2004/004762.

15 La partícula puede comprender además moléculas con diana en el cáncer, tales como antígenos de superficie de células de cáncer, antígenos de superficie vírica y antígenos de virus influenza.

20 Las moléculas de superficie de membranas microbianas pueden incorporarse mediante interacción hidrofóbica, tal como se indicó originalmente en Morein et al.<sup>3</sup> y en la patente nº EP 242380. Otras moléculas, por ejemplo producidas mediante tecnología de ADNr o producidas sintéticamente, pueden incorporarse tal como se indica en los documentos nº WO 2002/080981 y nº WO 2004/030696.

25 Entre dichas moléculas de transporte dirigido se incluyen proteínas de cubierta de virus, tales como los virus influenza y sincitial respiratorio, que presentan afinidad para el tracto respiratorio, p.ej. para el transporte dirigido a formas de cáncer pulmonar, o CTA1DD, siendo A1 la parte de la subunidad A de la toxina del cólera incorporada en formulaciones de KGI o BBE tal como se describen en Lycke et al.<sup>4</sup> CTA1DD se diseña racionalmente en tres componentes principales, contribuyendo cada una efectos complementarios. CTA1 es la subunidad enzimáticamente activa de la toxina del cólera que es convertida en no tóxica mediante la separación de las subunidades A2 y B. Fusionada con DD de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, presenta como diana las células B. De manera más general, los anticuerpos monoclonales y policlonales pueden incorporarse en las partículas tal como se indica en las patentes nº EP 0 109 942 B1, nº EP 0 242 380 B1 y nº EP 0 180 564 B1.

30 La invención se refiere además a una composición que comprende una o más nanopartículas. La composición puede comprender diferentes fracciones de saponina de *Quillaja*, cada una incorporada en diferentes nanopartículas.

35 De esta manera, dos fracciones de saponina diferentes pueden unirse en un complejo en una partícula G3 y la otra (las otras) de por lo menos dos fracciones de saponina diferentes unirse en otro (otros) complejos en otra (otras) partículas físicamente diferentes que contienen lípidos.

40 Las diferentes saponinas pueden ser saponinas hidrofílicas o hidrofóbicas. La partícula puede contener por lo menos la fracción C o por lo menos la fracción B o por lo menos cualquier fracción de entre las fracciones C y B de Quil A y por lo menos otra fracción de Quil A. De esta manera, una partícula puede comprender la fracción C únicamente; la fracción C y por lo menos otra fracción de Quil A; la fracción C y una o más fracciones de Quil A; las fracciones C y A de Quil A, o Quil A en bruto. La partícula puede contener además la fracción B únicamente; la fracción B y por lo menos otra fracción de Quil A, o la fracción B y una o más fracciones de Quil A; las fracciones B y A de Quil A. Las combinaciones anteriormente indicadas de fracciones también pueden encontrarse en diferentes partículas lipídicas o  
45 en la misma partícula lipídica.

De esta manera, pueden utilizarse mezclas de partículas que contienen lípidos que comprenden saponinas hidrofílicas e hidrofóbicas en partículas físicamente diferentes.

50 Según una realización, la fracción A de Quil A puede integrarse en una nanopartícula junto con por lo menos otro adyuvante con actividad inmunomoduladora.

Según otra realización, el otro u otros adyuvantes se encuentran presentes en forma libre o integrados en otra nanopartícula separada para la preparación de una composición adyuvante.

55 El otro u otros adyuvantes pueden ser una saponina, tal como una saponina de Quil A.

60 La fracción A puede facilitar la utilización de otro adyuvante que, al ser utilizado por sí solo, podría resultar tóxico en dosis a las que resulta eficiente y puede obtenerse un efecto sinérgico, incluyendo la potenciación de las respuestas inmunológicas y actividad inmunomoduladora.

65 Una composición según la invención puede comprender la fracción A adyuvante de Quil A y el otro u otros adyuvantes en cualesquiera proporciones en peso. Preferentemente, la fracción A de Quil A es 2% a 99,9% en peso, preferentemente 5% a 90% en peso y especialmente 50% a 90% en peso respecto a la cantidad total de adyuvantes. Para, p.ej. Al(OH)<sub>3</sub>, adyuvantes aceitosos y polímeros en bloque, la cantidad de fracción A de Quil A puede ser sustancialmente más baja.

Una composición de ISCOM preferente comprende 50% a 99,9% de fragmento A de Quil A y 0,1% a 50% de fragmento C y/o fracción B y/o otras fracciones o derivados de Quil A (en lo sucesivo, fracciones no A de Quil A) respecto al peso total de las fracciones A y no A de Quil A. Especialmente, la composición comprende 70% a 99,9% de fragmento A de Quil A y 0,1% a 30% de fracciones no A de Quil A, preferentemente 75% a 99,9% de fragmento A de Quil A y 0,1% a 25% de fracciones no A de Quil A y especialmente 80% a 99,9% de fragmento A de Quil A y 0,1% a 20% de fracciones no A de Quil A respecto al peso total de fracción A y fracciones no A de Quil A. La composición más preferente comprende 91% a 99,1% de fragmento A de Quil A y 0,1% a 9% de fracciones no A de Quil A respecto al peso total de fracciones A y fracciones no A de Quil A, especialmente 98,0% a 99,9% de fracción A y 0,1% a 2,0% de fracciones no A de Quil A respecto al peso total de fracciones A y fracciones no A de Quil A.

Las nanopartículas y una composición que comprende las nanopartículas pueden utilizarse como fármaco, opcionalmente en una composición farmacéutica que comprende además tampones, diluyentes, excipientes, aditivos, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.

Entre los portadores y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables adecuados se incluyen todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, rellenos, portadores sólidos, soluciones acuosas, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción y similares convencionales. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocida de la técnica y se describe en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, Mack Publishing Company, Pennsylvania, USA. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones farmacéuticas de la presente invención. También pueden incorporarse ingredientes activos complementarios en las composiciones.

La invención comprende además una composición farmacéutica que comprende además por lo menos un compuesto farmacéuticamente activo, tal como fármacos anticáncer, compuestos de coordinación de platino, compuestos de taxano, compuestos de camptotecina, alcaloides vinca antitumorales, derivados nucleósidos antitumorales, mostazas nitrogenadas o agentes alquilantes de nitrosourea, derivados de antraciclina antitumorales, trastuzumab y derivados de podofilotoxina antitumorales, *Quillaja saponaria Molina* y subfragmentos de la misma, receptores de anticuerpos o anticuerpos monoclonales, tales como receptores de Fc o DD de proteína A de *Staphylococcus aureus*, agentes para el tratamiento del cáncer, tales como agentes seleccionados de entre el grupo que consiste en citarabina, daunorrubicina, paclitaxel, docetaxel, cabazitaxel, toricisel y trabectedina, que son compuestos activos que pueden integrarse en la nanopartícula o mezclarse con la composición.

Los agentes anticáncer adicionales se seleccionan preferentemente de compuestos de coordinación de platino, compuestos de taxano, compuestos de camptotecina, alcaloides vinca antitumorales, derivados de nucleósido antitumorales, mostazas nitrogenadas o agentes alquilantes de nitrosourea, derivados de antraciclina antitumorales, trastuzumab y derivados de podofilotoxina antitumorales.

La expresión "compuesto de coordinación de platino" se utiliza en la presente memoria para referirse a cualquier compuesto de coordinación de platino inhibidor del crecimiento celular tumoral que proporciona platino en forma de un ion. Entre los compuestos de coordinación de platino preferentes se incluyen cisplatino, carboplatino, cloro (dietilentriammina)-cloruro de platino (II), dicloro(etilendiamina)-platino (II), diamina (1,1-diclobutanodicarboxilato)-platino (II) (carboplatino), espiroplatino, iproplatino, diamina (2-etilmalonato)-platino (II), (1,2-diaminociclohexano)malonato-platino (II), (4-carboxifalato) (1,2-diaminociclohexano) platino (II), (1,2-diaminociclohexano)-(isocitrato)platino (II), (1,2-diaminociclohexano)-cis-(piruvato)platino (II) y (1,2-diaminociclohexano)-oxalato-platino (II), ormaplatino y tetraplatino.

El cisplatino se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo bajo el nombre comercial Platinol, de Bristol Myers Squibb Corporation en forma de unos polvos para la reconstitución con agua, solución salina estéril u otro vehículo adecuado. Otros compuestos de coordinación de platino y sus composiciones farmacéuticas se encuentran disponibles comercialmente y/o pueden prepararse mediante técnicas convencionales.

El compuesto taxano puede encontrarse comercializado bajo el nombre comercial Taxol, de Bristol Myers Squibb, y el docetaxel se encuentra disponible comercialmente bajo el nombre comercial Taxotere, de Rhone-Poulenc Rorer. Ambos compuestos y otros compuestos de taxano pueden prepararse de manera convencional, por ejemplo tal como se indica en las patentes nº EP 253738, nº EP 253739 y en el documento nº WO 92/09589, o mediante procedimientos análogos. El carbazitaxel se encuentra disponible de Sanofi Pasteur.

Entre los compuestos de camptotecina se incluyen el irinotecán y el topotecán. El irinotecán se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Rhone-Poulenc Rorer bajo el nombre comercial Campto y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 137145 o mediante procedimientos análogos a los mismos. El topotecán se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de SmithKline Beecham bajo el nombre comercial Hycamtin y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 321122 o mediante procedimientos análogos a los mismos. Pueden prepararse otros compuestos de

campotecina de manera convencional, por ejemplo mediante procedimientos análogos a los indicados anteriormente para el irinotecán y el topotecán.

5 Entre los alcaloides vinca antitumorales se incluyen la vinblastina, la vincristina y la vinorelbina a los que se ha hecho referencia anteriormente. La vinblastina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo como la sal sulfato para inyección, de Eli Lilly and Co., bajo el nombre comercial Velban, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la memoria de patente alemana nº 2124023 o mediante procedimientos análogos a los mismos. La vincristina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo como la sal sulfato para inyección, de Eli Lilly and Co., bajo el nombre comercial Oncovin y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la memoria de patente alemana nº 2124023 o mediante procedimientos análogos a los mismos. La vinorelbina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo en forma de la sal tartrato para inyección, de Glaxo Wellcome, bajo el nombre comercial Navelbina, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente US nº 4307100, o mediante procedimientos análogos a los mismos. Pueden prepararse otros alcaloides vinca antitumorales de manera convencional, por ejemplo mediante procedimientos análogos a los indicados anteriormente para la vinblastina, vincristina y vinorelbina.

20 Entre los derivados de nucleósido antitumorales se incluyen 5-fluorouracilo, gemcitabina y capecitabina, a los que se ha hecho referencia anteriormente. El 5-fluorouracilo se encuentra ampliamente disponible comercialmente y pueden prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la patente US nº 2802005. La gemcitabina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Eli Lilly, bajo el nombre comercial Gemzar, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 122707 o mediante procedimientos análogos a los mismos.

25 La capecitabina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Hoffman-La Roche, bajo el nombre comercial Xeloda, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 698611 o mediante procedimientos análogos a los mismos. Pueden prepararse otros derivados de nucleósido antitumorales de manera convencional, por ejemplo mediante procedimientos análogos a los indicados anteriormente para la capecitabina y la gemcitabina.

30 Entre los compuestos de mostaza nitrogenada se incluyen la ciclofosfamida y el clorambucilo. La ciclofosfamida se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Bristol-Myers Squibb, bajo el nombre comercial Cytoxan y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente U.K. Nº 1235022 o mediante procedimientos análogos a los mismos. El clorambucilo se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Glaxo Wellcome bajo el nombre comercial Leukeran y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente US nº 3046301, o mediante procedimientos análogos a los mismos. Entre los compuestos de nitrosourea preferentes para la utilización según la invención se incluyen la carmustina y la lomustina, a los que se ha hecho referencia anteriormente. La carmustina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Bristol-Myers Squibb, bajo el nombre comercial BiCNU y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 902015 o mediante procedimientos análogos a los mismos. La lomustina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Bristol-Myers Squibb, bajo el nombre comercial CeeNU y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente U.S. nº 4377687 o mediante procedimientos análogos a los mismos.

45 Entre los derivados de antraciclina antitumorales se incluyen daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina, a los que se ha hecho referencia anteriormente. La daunorrubicina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo en forma de la sal hidrocloreto, de Bedford Laboratories bajo el nombre comercial Cerubidina y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente US nº 4020270, o mediante procedimientos análogos a los mismos.

50 La doxorrubicina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo en forma de la sal hidrocloreto, de Astra, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente US nº 3803124 o mediante procedimientos análogos a los mismos. La idarrubicina se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo, en forma de la sal hidrocloreto, de Pharmacia & Upjohn, bajo el nombre comercial Idamicina, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente US nº 4046878 o mediante procedimientos análogos a los mismos. Pueden prepararse otros derivados de antraciclina antitumorales de manera convencional, por ejemplo mediante procedimientos análogos a los indicados anteriormente para la daunorrubicina, doxorrubicina e idarrubicina.

60 El trastuzumab se encuentra disponible comercialmente de Genentech bajo el nombre comercial Herceptina y puede obtenerse tal como se indica en la especificación de patente US nº 5821337 o las especificaciones de patente PCT nº WO 94/04679 y nº WO 92/22653.

65 Entre los derivados de podofilotoxina antitumorales se incluyen etopósido y tenipósido. El etopósido se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Bristol-Myers Squibb, bajo el nombre comercial VePesid, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente europea nº 111058 o mediante procedimientos análogos a los mismos. El tenipósido se encuentra disponible comercialmente, por ejemplo de Bristol-Myers Squibb, bajo el nombre comercial Vumon, y puede prepararse, por ejemplo, tal como se indica en la especificación de patente PCT nº WO 93/02094 o mediante procedimientos análogos a los mismos. Pueden

prepararse otros derivados de podofilotoxina antitumorales de manera convencional, por ejemplo mediante procedimientos análogos a los indicados anteriormente para el etopósido y el tenipósido.

5 Las saponinas en bruto o fracciones de las mismas, tales como las indicadas anteriormente, también pueden utilizarse en forma libre, es decir, no integradas en partículas que comprenden lípidos, a modo de agentes anticancerosos. Dichos compuestos anticáncer pueden mezclarse, acoplarse o integrarse en partículas que contienen lípidos, tales como liposomas, ISCOM y/o matriz de ISCOM y posintros.

10 Resulta adecuado que sean hidrofóbicos una vez integrados. En caso contrario, pueden acoplarse grupos hidrofóbicos a ellos, tal como se indica en la patente nº EP 242380.

Los compuestos no hidrofóbicos y especialmente las proteínas o péptidos, pueden convertirse en hidrofóbicos mediante el acoplamiento de grupos hidrofóbicos a los mismos.

15 Los grupos hidrofóbicos que pueden acoplarse a los compuestos no hidrofóbicos son cadenas alifáticas lineales, ramificadas, saturadas o insaturadas, preferentemente que presenten 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 átomos de carbono, o aminoácidos o péptidos hidrofóbicos u otras estructuras hidrofóbicas, tales como esteroides. La longitud de la estructura hidrofóbica está adaptada al tamaño y naturaleza de la proteína. A título de ejemplo, puede mencionarse que un péptido con 10 a 15 aminoácidos (virus de la fiebre aftosa) convenientemente se produce con dos tirosinas en el extremo amino- o carboxi-terminal. Una proteína con un peso molecular de 70.000 daltons exige aproximadamente 20 aminoácidos hidrofóbicos. Los ensayos se llevaron a cabo empíricamente. De esta manera, se utilizaron especialmente péptidos con 1 a 20 aminoácidos, preferentemente 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos, especialmente seleccionados de entre Trp, Ile, Phe, Pro, Tyr, Leu, Val, especialmente Tyr; derivados de colesterol, tales como ácido colina y ácido ursodesoxicolina.

25 Dichos grupos hidrofóbicos deben unirse a un grupo que pueda acoplarse a la proteína o compuesto no hidrofóbico, tal como un grupo carboxilo, amino, disulfuro, hidroxilo, sulfhidrilo o carbonilo, tal como grupos aldehído.

30 Como grupos hidrofóbicos que pueden acoplarse se seleccionan preferentemente los derivados carboxilo, aldehído, amino, hidroxilo y disulfuro de metano, etano, propano, butano, hexano, heptano, octano y péptidos que contienen Cys, Asp, Glu, Lys, preferentemente octanal y Tyr. Tyr. Tyr-Cys, -Asp o -Glu. Los grupos hidrofóbicos con un grupo que puede acoplarse deben disolverse en agua con ayuda de, por ejemplo, los agentes solubilizadores y detergentes indicados anteriormente, o ácido clorhídrico, ácido acético al 67% en volumen de ácido acético, licor cáustico, amonio, según qué sustancia debe disolverse. A continuación, se ajusta el pH en dirección a la neutralidad sin que precipite la sustancia; ello con el fin de garantizar que se alcance un pH que desnaturalice la proteína a la que debe acoplarse el grupo hidrofóbico. El lípido puede potenciar la solubilización.

La molécula hidrofóbica puede añadirse al compuesto no hidrofóbico en una proporción molar de entre 10:1 y 0,1:1, preferentemente de 1:1.

40 Los grupos hidrofóbicos con un grupo carboxilo como molécula de acoplamiento pueden acoplarse a la proteína mediante carbodiimidas solubles en agua o compuestos anhídridos. En el primer caso, el grupo carboxilo se activa a pH 5 con carbodiimida y se mezcla con la proteína disuelta en tampón a pH 8 con un contenido elevado de fosfato. En el último caso, el compuesto carboxi se hace reaccionar con isobutilcloroformato en presencia de trietilamina en dioxano o acetonitrilo y se añade el anhídrido resultante a la proteína a pH 8 a 9. También resulta posible convertir el grupo carboxilo con hidrazina en hidrazida que junto con los aldehídos y cetonas en unidades de azúcar oxidado con peryodato en la proteína proporciona enlaces hidrazona.

50 Los grupos amino con ácido nitroso pueden, a temperatura baja, convertirse en sales diazonio, que proporcionan enlaces azo con Tyr, His y Lys. Los grupos hidroxilo con anhídrido succínico pueden convertirse en derivados hemisuccinato que pueden acoplarse en forma de grupos carboxilo. Los grupos aldehído pueden hacerse reaccionar con grupos amino en la proteína para formar una base de Schiff. Se han descrito varios grupos de acoplamiento y métodos<sup>6,7,8</sup>.

55 Las proteínas, péptidos o compuestos producidos de esta manera que han recibido grupos hidrofóbicos seguidamente se unen a un complejo con glucósido, tal como se ha indicado en a), aunque pueden omitirse en este caso las etapas de purificación para eliminar fragmentos celulares.

60 Las proteínas hidrofílicas que presentan incluidos grupos hidrofóbicos pueden convertirse en hidrofóbicas haciendo los grupos hidrofóbicos accesibles mediante desnaturalización suave de las proteínas, es decir, con un pH bajo de aproximadamente 2,5, urea 3 M o una temperatura elevada, superior a 70 grados C. Dichas proteínas pueden ser inmunoglobulinas, tales como IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Las inmunoglobulinas pueden utilizarse como anticuerpos antiidiotípicos. Las proteínas se obtienen purificadas como proteínas tal como se indica en (b) y después se unen en un complejo a glucósido, tal como se indica en (a); las etapas de purificación para eliminar fragmentos celulares pueden omitirse.

65

La molécula hidrofóbica o anfipática también puede seleccionarse de entre fosfolípidos, tales como derivados de fosfatos de glicerol, tales como derivados de ácidos fosfatídicos, es decir, lecitina, cefalina, fosfátidos de inositol, derivados de esfingosina con 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 átomos de carbono, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina.

Todas las moléculas anfipáticas e hidrofóbicas anteriormente indicadas, que pueden seleccionarse de entre un antígeno, un adyuvante, una molécula de transporte dirigido, un compuesto farmacéutico y un nutriente, pueden integrarse en la nanopartícula o mezclarse con la misma en una composición.

La composición farmacéutica puede utilizarse como adyuvante, p.ej. Para la utilización en combinación con una vacuna en desarrollo, para la utilización en combinación con una vacuna de virus influenza estacional, para la utilización en combinación con una vacuna de influenza pandémica o para la utilización en combinación con una vacuna de emergencia, tal como una vacuna contra un arma biológica. De esta manera, la invención se refiere además a una formulación farmacéutica de vacuna que comprende las partículas G3 tal como se ha indicado anteriormente.

La invención se refiere además a un método para el tratamiento o la prevención de una enfermedad causada o complicada por un organismo, que comprende administrar en un sujeto una formulación farmacéutica de vacuna según la invención en una persona que la requiere.

Además, la invención se refiere a un método para el tratamiento del cáncer, que comprende administrar en un paciente que lo necesita, una cantidad farmacéuticamente eficaz de nanopartículas o una composición según la invención. Según una realización, dicho cáncer es la leucemia.

Las composiciones farmacéuticas pueden encontrarse en forma de una suspensión acuosa u oleaginosa inyectable estéril. Dicha suspensión puede formularse según la técnica conocida, utilizando los agentes dispersantes o humectantes adecuados y agentes de suspensión que se han indicado anteriormente. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo en forma de una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y solventes aceptables que pueden utilizarse se encuentran el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, pueden utilizarse convencionalmente aceites fijos estériles como solvente o medio de suspensión. Con este fin puede utilizarse cualquier aceite fijo suave, incluyendo mono- o di-glicéridos sintéticos. Además, pueden utilizarse ácidos grasos tales como el ácido oleico, en la preparación de inyectables.

Las soluciones o suspensión pueden comprender además por lo menos uno de los adyuvantes siguientes: diluyentes estériles, tales como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerol, propilenglicol u otros solventes sintéticos, agentes antibacterianos, tales como alcohol bencílico o metilparabeno, antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico, agentes quelantes tales como ácido etilén-diamina tetraacético, tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad, tales como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede envasarse en ampollas, jeringas desechables o recipientes multidosis realizados en vidrio o plástico.

Los compuestos de fórmula general pueden administrarse por vía parenteral. El término parenteral tal como se utiliza en la presente memoria incluye inyecciones subcutáneas, la inyección intravenosa, intramuscular o intradérmica o técnicas de infusión, electroporación (EP), para la inyección sin aguja - inyección por chorro, pistola génica, biinyector, así como la administración oral con aerosol. Para la utilización oral, puede utilizarse, por ejemplo, el compuesto derivado de proteína A, CTA1DD, tal como describen Eliasson et al.<sup>9</sup>, con la propiedad de reconocer las células B, que resulta útil en el tratamiento de células para la inducción de inmunidad mucosal, en particular en el tracto intestinal aunque también potencialmente para cánceres, en particular linfoma de células B.

Generalmente, las partículas que contienen lípidos de la presente invención se administran en una cantidad farmacéuticamente eficaz. La cantidad de partículas realmente administrada típicamente es determinada por un médico, a la luz de las circunstancias relevantes, incluyendo la condición que debe tratarse, la vía de administración seleccionada, el compuesto real administrado, la edad, el peso y la respuesta del paciente individual, la gravedad de los síntomas del paciente y similares.

La nanopartícula según la invención puede utilizarse como adyuvante en cualquier vacuna contra cualquier microorganismo. Puede utilizarse en cualquier animal, tal como aves, mamíferos, tales como seres humanos, animales domésticos, tales como gatos, perros, ovejas, cabras, cerdos, vacas y caballos. Según una realización, la invención se utiliza como adyuvante en una vacuna contra estreptococos en animales e influenza en caballos.

Las dosis para el uso humano pueden variar según otros compuestos incluidos. En vista de la duración del tratamiento, la dosis puede encontrarse comprendida entre <50 µg y 1 mg o más al día.

La invención se refiere además a un método para evaluar la aplicabilidad del método de tratamiento de cáncer según la invención en un paciente individual, que comprende:

- poner en contacto las células de cáncer de dicho paciente in vitro con nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 o una composición farmacéutica según la reivindicación 8 o 9;
- 5 • medir por lo menos un efecto indicativo de efecto terapéutico de dichas nanopartículas o composición farmacéutica en dichas células de cáncer;

10 en el que el método según la reivindicación 10 o 11 se evalúa como aplicable en dicho paciente individual en el caso de que las nanopartículas o composición farmacéutica muestre un efecto significativo indicativo de efecto terapéutico sobre dichas células de cáncer.

15 La indicación de efecto terapéutico puede interpretarse como regulación negativa de los genes que son importantes en la regulación del ciclo celular, tal como quinasas dependientes de ciclina (CDK, por sus siglas en inglés), ciclinas u otras moléculas que estimulan el paso por puntos de comprobación del ciclo celular y la replicación (CDK2, CDK6 y ciclinaD1) o regulación negativa de la timidina quinasa (TK, por sus siglas en inglés) y regulación positiva de moléculas que facilitan la diferenciación celular, tales como IL-8, FOXC1 y HDAC5, que también indican la salida del ciclo celular. Los factores de regulación se proporcionan a título de ejemplo, es decir, los ejemplos no implican limitación.

20 La invención se refiere además a un método para producir nanopartículas libres de fosfolípidos que comprende las etapas:

- a) proporcionar una superficie hidrofóbica o una suspensión de liposomas,
- b) poner en contacto la superficie hidrofóbica o la suspensión de liposomas con una solución de esteroles, preferentemente colesterol disuelto como monómeros en un solvente orgánico o detergente,
- 25 c) eliminar el solvente o detergente, formando una membrana de esteroles sobre la superficie,
- d) proporcionar una solución acuosa de micelas de saponina de *Quillaja*,
- e) añadir la solución acuosa que comprende las micelas de saponina a la membrana de esteroles, de manera que se forma un complejo entre las saponinas y los esteroides y se suspende en la solución acuosa.

30 La superficie hidrofóbica puede ser una superficie en una jarra, cubeta, superficies de varias capas, perlas, p.ej. perlas de látex, mallas o mallas tridimensionales o material poroso. También puede ser un liposoma con los componentes integrados en la membrana o membranas lipídicas.

35 El liposoma puede construirse según diversas técnicas y con diferentes composiciones tal como se ha descrito (p.ej. en Review Liposomes Preparation Methods Mohammad Riaz Faculty of Pharmacy, University of the Punjab, Lahore, Pakistan Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 19(1):65-77, enero de 1996). También puede construirse como un virosoma que contiene proteínas víricas integradas en la membrana del liposoma. Los liposomas pueden encontrarse en una solución acuosa. Los dispositivos pueden, p.ej. empaquetarse en columnas.

40 Las saponinas y esteroides pueden ser las indicadas anteriormente para las nanopartículas.

45 El solvente puede ser cualquier solvente de los solventes o detergentes que pueden encontrarse en el sitio [http://en.wikipedia.org/wiki/Organic\\_solvents](http://en.wikipedia.org/wiki/Organic_solvents), preferentemente cloroformo, etanol o acetonitrilo. La naturaleza del solvente se describe en [en.wikipedia.org/wiki/organic\\_solvents](http://en.wikipedia.org/wiki/organic_solvents). La selección del solvente es dependiente de la naturaleza de la molécula que se disuelve. Los diferentes tipos de solvente se clasifican principalmente según la polaridad y no polaridad. Los solventes no polares son, p.ej., hexano, cloroformo y éter dietílico. Los mencionados resultan útiles debido a que pueden evaporarse, ya que presentan puntos de ebullición entre 35 y 65 que facilitan la eliminación mediante evaporación. Los solventes aproticos polares con frecuencia se utilizan para la solubilización de moléculas farmacéuticas, p.ej. dimetilsulfóxido y acetonitrilo. Este último es de interés debido a que presenta un punto de ebullición bajo. Los solventes proticos polares también resultan útiles en particular en combinación con otros solventes. El etanol y el metanol presentan un punto de ebullición bajo y el ácido acético presenta un punto de ebullición elevado. El punto de ebullición bajo resulta particularmente importante para la técnica de evaporación. La solubilización puede llevarse a cabo con dos o más solventes. Los solventes mencionados son ejemplos y existen muchos más que presentan propiedades tal vez incluso más deseadas para la utilización en la innovación durante la formación de formulaciones de G3.

55 Son ejemplos de utilizables, los detergentes no iónicos, iónicos, es decir catiónicos, aniónicos o zwitteriónicos, tales como Zwittergent o el detergente basado en ácido gálico, que se utiliza en exceso. Son ejemplos típicos de detergentes no iónicos adecuados, las N-alcanoil-N-alkil-glucaminas, los poliglicol-ésteres y los poliglicol-éteres con ácidos alifáticos o arilalifáticos y alcoholes. Son ejemplos de los anteriores los éteres de alquilpolioxi-etileno de fórmula general  $C_n H_{2n+1} (OCH_2 CH_2)_x OH$ , abreviadamente Cn Ex; éteres de alquil-fenil polioxi-etileno que contienen un anillo fenilo entre el grupo alquilo y la cadena polioxi-etileno, abreviadamente Cn phi. Ex, p. ej., Triton X-100=terc-C<sub>8</sub> E<sub>9</sub>6 (octilfenoléter de óxido de polietileno), éteres de acilpolioxi-etileno: éteres de acilpolioxi-etilén-sorbitano, abreviadamente Cn sorbitano Ex, p.ej. Tween 20, Tween 80, beta.-D-alquilglucósidos, p.ej. beta.-D-octilglucósido. Son ejemplos típicos de detergentes iónicos adecuados, los detergentes de ácido gálico, tales como, p.ej., el ácido cólico,

el desoxicolato, el colato y CTAB (bromuro de cetiltrimonio). Pueden utilizarse incluso detergentes conjugados, tales como, p.ej., taurodesoxicolato, glucodesoxicolato y glicocolato. Otros agentes solubilizadores posibles son lisolecitina y lisofosfolípidos sintéticos. Pueden utilizarse incluso mezclas de los detergentes anteriormente indicados. Al utilizar el método de diálisis, los detergentes deberían ser dializables en un tiempo no excesivo.

5 Algunas sustancias activas en superficie facilitan en gran medida la formación de matriz. Entre ellas se incluyen los lípidos intrínsecos de membrana biológica, con un grupo polar de cabeza y una cadena alifática no polar, p.ej. de fosfatidilcolina (cargada negativamente) y fosfatidiletanolamina (cargada positivamente).

10 Según una realización, el detergente puede ser Triton-X-100, Tween-20, Nonidet, NP-40, desoxicolato, MEG-10 y octilglicósido. MEGA-10 y octilglicósido pueden eliminarse mediante diálisis. Para otros, pueden utilizarse otras tecnologías, tal como se ha indicado, p.ej. el método de centrifugación y la cromatografía de columna.

15 El agente soluble puede eliminarse mediante evaporación utilizando un solvente orgánico de punto de ebullición bajo o mediante diálisis, o mediante diálisis, cromatografía, filtración o flujo tangencial, tal como se indica en la patente EPC nº 0 109 942.

20 La solución acuosa de micelas de saponina se obtiene mediante la adición de unos polvos liofilizados o secos mediante pulverización, tal como son suministrados por el fabricante. La saponina o fracción de saponina normalmente se guarda en forma de solución madre, p.ej. 10 mg/ml, en agua, aunque sin limitarse a dicha concentración, y se añade al agua circundante a la membrana lipídica a una concentración final superior a CMC, es decir, la concentración micelar crítica, p.ej. 30 mg/litro; el valor exacto dependerá del producto de *Quillaja*. Las saponinas se obtienen en forma de extracto de polvos de *Quillaja* y pueden obtenerse a partir de extracto de *Quillaja* en bruto (Berghausen, USA), *Quillaja* Ultra Powder QP UF 300, *Quillaja* Ultra Powder QP UF 1000 o Vax-Sap, un producto de saponina de *Quillaja* no fraccionado, fracciones de QHA y QHC (las tres de Natural Responses, Chile) o de Prodalya, Santiago, Chile.

30 La invención utiliza un nuevo método de producción en el que se produce en las etapas a-c) una membrana artificial del esteroil unida a una superficie hidrofóbica. Una micela soluble en agua de un producto de saponina de *Quillaja* y una unión química (covalente) entre la micela de *Quillaja* y un componente en la membrana artificial extrae los componentes membranales artificiales a un complejo soluble en agua en forma de un innovador complejo nanoparticulado soluble en agua, es decir, G3. Dicho complejo se mantiene mediante enlace químico (covalente) y la unión de las partes hidrofílicas entre sí en la fase acuosa e interacciones hidrofóbicas entre los componentes se mantienen en el centro del complejo. La membrana se forma a partir de una solución orgánica con un agente soluble que puede ser un detergente o un solvente orgánico.

35 Las moléculas hidrofóbicas y anfipáticas que deben incorporarse en la membrana artificial se solubilizan con solvente orgánico o detergente junto con el esteroil en la etapa b) y se transfieren a la fase acuosa mediante evaporación del solvente orgánico. Según el solvente, puede eliminarse éste mediante evaporación, en el caso de que el punto de ebullición del mismo sea inferior al del agua, o mediante diálisis o técnica similar descrita para la formación de ISCOM. De esta manera, la eliminación del solvente no es una parte de la formación de la partícula excepto por la formación de la membrana artificial que no es una parte de la formación de las partículas. Después de completar la formación de la membrana artificial, se observa agua circundando la membrana artificial. En esta fase acuosa se añaden las micelas de *Quillaja* suspendidas (disueltas) en agua y se extrae la membrana artificial en la fase acuosa y se reorganizan las micelas de *Quillaja* en la nueva formulación de G3. La composición puede ajustarse fácilmente para disolver por completo la membrana artificial en una suspensión particulada en agua. La composición difiere de una micela desde el punto de vista constructivo, ya que participa un enlace covalente; de esta manera se forma una partícula innovadora.

50 En las etapas f) y g), la forma de micela soluble en agua del producto de *Quillaja* se deja interactuar para obtener el producto final en una fase acuosa. La primera interacción en dicha etapa es la unión covalente entre las micelas de *Quillaja* y el esteroil en la membrana artificial y la segunda interacción es entre el esqueleto triterpenoide de *Quillaja* y el esteroil. Bajo proporciones adecuadas, todos los componentes en la membrana artificial se incorporan en micelas de *Quillaja* solubles en agua formando una nueva nanopartícula que variará en tamaño entre 17 nm y hasta 40 nm. Se obtiene un tamaño mayor en el caso de que los lípidos, p.ej. un fosfolípido, se encuentran presentes en la membrana artificial. Los ejemplos 2, 4, 9, 14, 15 y 16 demuestran la incorporación de diversos tipos de molécula lipofílica según la invención, incluyendo DT, busulfán, roscovitina, Vivolux 40 y vitamina D3.

55 La matriz de ISCOM puede producirse con el nuevo método mediante la adición de por lo menos un fosfolípido a la suspensión que comprende esteroil, en la etapa b).

60 El fosfolípido puede seleccionarse de entre derivados fosfatos de glicerol, tales como derivados de ácidos fosfatídicos, es decir, lecitina, cefalina, fosfátidos de inositol, derivados de esfingosina con 14, 15, 16, 17, 18, 19 y 20 átomos de carbono, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilcolina.

65 Pueden incorporarse componentes hidrofóbicos en la etapa b), es decir, en la membrana artificial que incluye además lípidos y esteroides.

En la etapa d), la saponina en la forma soluble en agua, es decir, en forma de micela, se añade a la fase acuosa que cubre la membrana artificial.

5 La nanopartícula de la invención sustituye la matriz de ISCOM debido a que es más simple y económica de producir, ya que la nanopartícula según la invención se basa en dos componentes: una saponina de *Quillaja*, colesterol; en contraste con la formación de la partícula de ISCOM, incluye tres componentes: una saponina de *Quillaja*, colesterol y el tercer componente, un fosfolípido, p.ej. fosfatidilcolina. El componente o componentes de *Quillaja* no necesitan solubilizarse con detergente o con un solvente orgánico. La nueva técnica de producción según la invención es robusta  
10 y se supera la necesidad de un precario equilibrio. De esta manera, el nuevo método resulta más adecuado que las tecnologías de matriz ISCOM para la integración de un cuarto, quinto o adicionales moléculas hidrofóbicas o anfipáticas, ya que los métodos desarrollados hasta hoy permiten una fuerte tendencia a que dichos compuestos formen espontáneamente complejos estables (autoensamblaje) en agua, p.ej. micelas y, por lo tanto, no se integran en la formulación de matriz ISCOM, por ejemplo mediante interacción hidrofóbica. De esta manera, la tecnología de matriz ISCOM adolece de desventajas para el desarrollo como sistema general de administración, mientras que la  
15 invención no presenta dichas desventajas.

Todas las publicaciones mencionadas en la presente memoria se incorporan como referencia en la presente memoria. A continuación, se describe la invención mediante los ejemplos no limitativos siguientes.

20

## EJEMPLOS

### Materiales y métodos:

#### 25 Sustancias químicas y compuestos

Se adquirió colesterol (C8667), fosfatidilcolina (PC, P-5763) y cloroformo (288306) de Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Suecia. La fracción A (QHA) y la fracción C (QHC) de la saponina de *Quillaja* se adquirieron de ISCONOVA AB, Uppsala, Suecia. Se obtuvo diterpenoide (DT), es decir, estevia, de Prodalysa Ltda., Chile. La vitamina D3 se  
30 obtuvo comercialmente de Miva Nutri-molecular Research Limited, Shanghai, China.

#### Líneas celulares

35 La línea celular de macrófagos humanos (M $\phi$ ) U937 (que con frecuencia se utiliza como línea celular modelo en la investigación biológica y del cáncer) y las líneas celulares de leucemia mieloide aguda (LMA) humana HL-60 se cultivaron en medio de cultivo RPMI-1640. El adenocarcinoma de próstata humano, PC-3, se cultivó como una mezcla 50/50 de F-12K de Ham y RPMI-1640. Todas las células fueron suministradas por la división de farmacología clínica de la universidad de Uppsala. Todos los medios fueron complementados con suero de feto bovino (FCS, por sus siglas en inglés) inactivado por calor al 10%, glutamina 2 mM, estreptomycin 100  $\mu$ g/ml y penicilina 100 IE/ml (todos de Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Todas las líneas celulares fueron incubadas a 37°C en aire humidificado que  
40 contenía 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Células dendríticas (CD) humanas

45 Se adquirieron CD humanas inmaduras de 3H Biomedical, Uppsala, Suecia.

#### Procedimiento de ensayo in vitro

50 Las células en placas de microtitulación de 96 pocillos a una densidad celular de 5.000 a 20.000 células/pocillo se expusieron a G3 diluida en serie, KGI y saponina de *Quillaja* que contenían las mismas cantidades de QHC a 37°C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de CO<sub>2</sub>, durante 72 horas. Para las células U937, se utilizó un juego de las células directamente para el ensayo fluorimétrico de citotoxicidad de microcultivos (FMCA, por sus siglas en inglés) para medir el efecto de eliminación celular de las formulaciones. Para el otro juego de células, se recolectó el sobrenadante, 150  $\mu$ l/pocillo, para la determinación de la citoquina IL-8.

55

#### Medición del efecto de eliminación de células de cáncer

60 El método FMCA se basa en la medición de la fluorescencia generada a partir de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA, por sus siglas en inglés) en fluoresceína por células con las membranas plasmáticas intactas. Tras la incubación anteriormente mencionada durante 3 días, se eliminó el medio mediante aspirado. Tras un lavado con PBS, se añadieron 100  $\mu$ l/pocillo de FDA disueltos en un tampón fisiológico (10  $\mu$ g/ml). Las placas se incubaron durante 45 minutos y la fluorescencia generada en cada pocillo se midió en un fluorímetro de escaneo de 96 pocillos. La fluorescencia es proporcional al número de células intactas en el pocillo. Los criterios de calidad para un análisis con éxito incluían una señal fluorescente en los pocillos de control superior a cinco veces el valor medio del blanco, un coeficiente de variación (CV) medio en los pocillos de control inferior a 30%.

65

Determinación de la citoquina IL-8 de células U937 estimuladas con formulaciones de G3

Se llevó a cabo un ELISA para la detección de IL-8 humana siguiendo las instrucciones del fabricante (ELISA de IL-8 humana, nº de catálogo S8000C, R&D System, Minneapolis, MN55413, USA). Brevemente, se añadieron 50 µl de estándares reconstituídos de IL-8 humana y los sobrenadantes a cada pocillo en pocillos por triplicado y se mezclaron bien mediante varios golpes suaves en las placas. A continuación, las placas se cubrieron con cubiertas de placa adhesivas y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente (TA, 20°C a 25°C). Tras la incubación, las placas se lavaron 3 veces con tampón de lavado y se añadieron 50 µl/pocillo del reactivo de anticuerpos biotinilados (anti-IL-8 humana). Se cubrieron nuevamente las placas con cubiertas de placa adhesivas y se incubaron durante una hora a TA. Tras 3 lavados con tampón de lavado, se aplicaron 100 µl/pocillo de solución de estreptavidina-HRP. Se cubrieron nuevamente las placas con las cubiertas de placa adhesivas y se incubaron durante 30 minutos a TA. Se descartó el contenido de las placas y éstas se lavaron 3 veces con tampón de lavado. Se dispensaron en cada pocillo 100 µl de solución de sustrato TMB. Se dejó que se desarrollase la reacción enzimática de color a TA en la oscuridad durante 30 minutos. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl/pocillo de solución de parada. Se leyó la absorbancia en un lector de placas de ELISA a 450 y 550 nm. Se restaron los valores de 550 nm de los valores de 450 nm para corregir para imperfecciones ópticas en las microplacas. A continuación, se generó la curva patrón y se utilizó para calcular la cantidad de IL-8 humana en las muestras problema. La curva patrón se creó mediante la representación gráfica de la absorbancia media obtenida de cada concentración de estándar en el eje vertical (Y) vs. la concentración correspondiente (pg/ml) en el eje horizontal (X).

Expresión génica de citoquina IL-12 en monocitos humanos estimulados con la formulación G3

Se comparó la expresión génica de la citoquina IL-12 de las CD tratadas con G3, DT, G3 con DT incorporados, con el control celular utilizando matrices génicas. Brevemente, se expusieron monocitos humanos normales a 10 µg/ml de G3, 100 µg/ml de DT y la combinación de ellos, en las mismas partículas a las mismas concentraciones durante 6 horas; después, se aisló el ARN siguiendo el manual del fabricante (minikit RNeasy de QIAGEN). Se llevó a cabo el análisis de la expresión de ARN en "Uppsala Array Platform, Clinical Chemistry and Pharmacology, Uppsala University Hospital Uppsala- Sweden" mediante la conversión de las muestras de ARN a ADNc marcado mediante transcripción inversa y comparando los datos cuantitativos de las diversas muestras con células no tratadas (kit de expresión WT de Ambion).

Actividad de timidina quinasa (TK)

Se determinó la actividad de TK con un kit obtenido de Biovica (Uppsala, Suecia). Brevemente, tras exponer a las formulaciones de KGI o G3 en diversos puntos temporales, se transfirieron 100 µl de suspensión celular a una concentración de entre 0,1 y 1x10<sup>6</sup> células/ml a tubos Eppendorf y se centrifugaron a 200 x g durante 10 minutos. Se resuspendió el pellet celular en 100 µl de PBS frío y se congeló/descongeló 2 a 3 veces. Tras la centrifugación a velocidad máxima durante cinco minutos, se recolectaron las células. Se midió la actividad de TK intercelular siguiendo el protocolo del fabricante.

Detección de vitamina D3

Se analizaron las muestras con colecalciferol (vitamina D3) incorporada en las partículas de G3 en un laboratorio clínico universitario en un instrumento automático Liaison. Aunque el ensayo (DiaSorin Liaison) está diseñado para medir 25-HO-D3, presenta una reactividad cruzada de aproximadamente uno por ciento con la vitamina D3 no hidroxilada.

Cepas y vacuna del virus influenza

El virus influenza humano A/California/07/2009 (H1N1), A Perth/16/2009 (H3N2) y B/Brisbane/60/2008 (B) como vacuna sin adyuvante se utilizó como antígeno en la preparación de las vacunas, los ensayos serológicos y en la reestimulación de los linfocitos. El virus se cultivó sobre células VERO y se fragmentó con desoxicolato. Fue suministrado por el fabricante. Tras la recolección, los virus se purificaron, se inactivaron, se fragmentaron y se resuspendieron a una concentración de 30 µg de proteína/ml. La dosis contenía 1 µg de antígeno vírico y diversas cantidades de adyuvante, tal como se indica en la figura 1.

Vacunación

Se inmunizaron ratones C56B16 mantenidos en las instalaciones animales de University Hospital, Karolinska Institute, Stockholm, por vía subcutánea en el cuello dos veces. Para más información, ver el Ejemplo 12.

Ensayo de hemaaglutinación (HA)

Se lavaron eritrocitos de pollo (RBC, por sus siglas en inglés) recolectados en solución de citrato, 3 veces en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (PBS), pH 7,2, y se resuspendieron a una concentración de 0,5% en PBS que

contenía albúmina de suero bovino (BSA) al 0,05%. Se llevó a cabo el ensayo de HA en microplacas en U a 4°C durante 1 hora.

#### Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH)

5 Se incubaron muestras de suero a temperatura ambiente (TA) junto con una suspensión al 30% de RBC de pollo durante 1 hora (h). Tras la absorción, las mezclas se centrifugaron a 500 x g durante 10 min y se recolectaron los sobrenadantes. La dilución sérica final era de 1:5. Se llevó a cabo el ensayo de IH utilizando microplacas en V y 16 unidades de HA/50 µl. Se diluyeron 2 veces muestras de 25 µl de suero, utilizando una cantidad igual de PBS-BSA. 10 Los sueros diluidos se incubaron a TA durante 1 h junto con 25 µl de suspensión vírica, seguido de la incubación de las mezclas a 4°C durante 1 h. Se consideró que la dilución sérica más alta que inhibía el 100% de la hemaglutinación era el título de anticuerpos de la muestra.

#### Preparación de los linfocitos

15 Se obtuvieron linfocitos de bazo (esplenocitos) con la máxima asepsia posible. Se sangraron ratones inmunizados y no inmunizados y se sacrificaron mediante dislocación cervical 3 semanas después de la revacunación. Se extrajeron los bazos y después se limpiaron cuidadosamente, se pasaron por una malla estéril de acero inoxidable y se enjuagaron con EME con tricina utilizando una pipeta. Las células se lavaron dos veces con EMEM con tricina 20 mediante centrifugación a 500 x g. A continuación, se resuspendieron los pellets en medio F-DMEM complementado con suero de feto bovino al 1% (FCS), 10 µg de gentamicina/ml, L-glutamina 2 mM, 3,81 g de HEPES/l y β-mercaptoetanol 5x10<sup>-5</sup> M (medio de cultivo). Se sometió a ensayo la viabilidad celular mediante un ensayo de exclusión de pigmento azul Tripán.

#### Ensayo de 'inmunospot' ligado a enzima (ELISPOT)

25 La enumeración de los esplenocitos secretores de citoquinas se llevó a cabo utilizando kits ELISPOT comerciales para IFN-γ, IL-2 o IL-4. Los kits se adquirieron de Mabtech, Stockholm, Suecia. Las placas de ELISPOT se utilizaron siguiendo las instrucciones recomendadas por Mabtech.

30 Para cada citoquina, los esplenocitos a una densidad de 2x10<sup>5</sup> por cada 100 µl de medio de cultivo se pipetearon a 8 pocillos diferentes. Cuatro réplicas recibieron 50 µl de medio de cultivo que contenían 4,5 µg de hemaglutinina de antígeno del virus influenza. Los cuatro pocillos restantes recibieron 100 µl de medio de cultivo únicamente. Las placas se incubaron a 37°C en cajas humidificadas durante 18 h, seguido del descarte de las células y el lavado de los pocillos. Se revelaron las manchas siguiendo el procedimiento descrito por Mabtech. Brevemente, se incubaron las placas durante 2 h a TA con 100 µl de anticuerpos monoclonales (AnMo) biotinilados anti-IFN-γ, IL-2 o IL-4. A 35 continuación, las placas se enjuagaron cuidadosamente y después se incubaron durante 1 h a TA con estreptavidina conjugada con HRPO. Después de otro ciclo de lavado, las placas se incubaron con el sustrato a TA durante aproximadamente 15 min o hasta aparecer una mancha clara. El lavado de las placas con agua corriente detuvo las reacciones. Finalmente, se dejó que se secasen las placas y después se contó el número de manchas utilizando un 40 contador de ELISPOT.

#### Análisis de los datos y estadísticas

45 Se analizaron los datos de respuesta a dosis utilizando los valores de SI calculados y el programa de software GraphPadPrism4 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Los datos se presentan como valores medios ± SE. Se llevaron a cabo inferencias estadísticas entre varias medias utilizando ANOVA de un factor con pruebas post-hoc de Tukey de múltiples comparaciones de las medias de grupo y para la comparación de pares de medias, la prueba t de Student, en GraphPadPrism.

#### -----Parte I. Formulación y caracterización-Ejemplo 1

55 En el presente ejemplo, se describe la formulación de la nanopartícula G3. En el diseño experimental, etapa 2, A y B (ver posteriormente), se exploró la influencia de las proporciones de colesterol vs fracción QHC (de ISCONOVA AB, Uppsala, Suecia, ver el documento nº WO2008/063129) de saponina de *Quillaja*. En C, se exploró el efecto de añadir un fosfolípido sobre la formulación de las partículas.

#### Diseño experimental

60 En la etapa 1, se formó una membrana artificial de colesterol que requirió una solubilización en detergente o solvente orgánico. En el presente experimento, los presentes inventores utilizaron cloroformo (288306, Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Suecia) como solvente para el colesterol (C8667, Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Suecia) a fin de generar una solución patrón de 100 mg/ml. En un tubo Eppendorf, se añadieron 2 µl de colesterol de la solución patrón diluida en 50 µl de cloroformo, seguido de la aplicación en una capa de 1/2 ml de agua sobre la solución de 65 colesterol. Se evaporó el cloroformo utilizando un flujo de aire creado con una jeringa con una aguja. Se observó una capa visible de colesterol sobre la pared del tubo.

En la etapa 2

Se sustituyó el 1/2 ml de agua por 1 ml de agua potable y se añadieron al agua 10 µl de la solución madre de QHC (100 mg/ml en agua), seguido de la incubación durante la noche a 37°C. La membrana desapareció de la pared y se observó una solución acuosa transparente.

- A. Dos µl de solución madre de colesterol procesada tal como se ha indicado en la etapa 1 y 10 µl de QHC en la etapa 2 se utilizaron para generar dicha formulación de G3, que proporcionó una proporción molar de 1:1.
- B. También se utilizó otra proporción molar, es decir, 2 moles de colesterol vs. 1 mol de QHC. Aparte de lo anterior, el experimento era igual que A.
- C. Se utilizó una proporción de 1 mol de colesterol y 1 mol de fosfatidilcolina (P-5763, de Sigma-Aldrich Sweden AB, Stockholm, Suecia) para formar la membrana en la etapa 1. En la etapa 2, se utilizaron dos moles de QHC.

Resultados

A. Tras la evaporación, se consiguió una partícula de 17 nm de tamaño uniforme, caracterizada mediante microscopía electrónica (ME); ver la fig. 1A, y mediante centrifugación en gradiente. La suspensión de G3 se visualizó como una solución transparente.

B. Tras la evaporación, se observaron partículas de un intervalo de tamaños ligeramente más ancho en la ME, con un diámetro medio de aproximadamente 17 nm (no mostrado), es decir, también se crearon partículas de 17 nm dentro del intervalo de 2 moles de colesterol y 1 mol de saponina de *Quillaja*.

C. El producto presentaba una morfología similar a la de partículas de ISCOM, con un diámetro de aproximadamente 40 nm (fig. 1B). De esta manera, la morfología era completamente diferente con la inclusión de fosfatidilcolina que la de las nanopartículas según la invención de G3 sin la fosfatidilcolina. Se concluye además que las nanopartículas según la invención son una excelente base para la integración de fosfolípidos, incluyendo fosfatidilcolina, que resulta esencial para la formulación de ISCOM según reivindican Lövgren y Morein<sup>1</sup>.

Conclusión y comentario

Con una proporción molar de 1 colesterol a 1 *Quillaja*, se forma una nanopartícula pequeña (17 nm). A una proporción más alta de colesterol, es decir, una proporción molar de 2 colesterol vs. 1 *Quillaja* o superior, aparecen partículas más grandes. Cabe destacar que al incluir otros componentes lipofílicos en la etapa 1, varía el tamaño de la partícula, es decir, la carga de la partícula influye sobre su tamaño. En este caso, se registró el intervalo de tamaños entre 17 y 40 nm, aunque el tamaño no se encuentra limitado por dicho intervalo. Resulta especialmente importante que en la ME no se observó agregación de las partículas; por el contrario, las partículas se encontraban bien dispersas unas de otras.

Un nuevo concepto esencial para convertir las sustancias lipofílicas en solubles en agua es dicho procedimiento en dos etapas. Existen diversas maneras de formar una membrana lipídica, p.ej. Liposomas que no presentan ningún soporte hidrofóbico sólido sino que se encuentran en suspensión libre en una fase acuosa. La segunda etapa extrae la membrana a la fase acuosa en primer lugar a la partícula G3 soluble en agua.

Cabe destacar que el procedimiento para formar nanopartículas según la invención es robusto y mucho más simple que los métodos utilizados actualmente, p.ej. para preparar formulaciones de ISCOM (Lövgren y Morein, ver anteriormente). Principalmente, con la evaporación utilizada prácticamente no se produce ninguna pérdida de material utilizado para la formulación de partículas, es decir, la saponina de *Quillaja*, en el caso referido QHC o colesterol, y no se requiere ningún fosfolípido, reduciendo adicionalmente los costes de producción. Resulta interesante que pueden utilizarse las nanopartículas según la invención como base para formar ISCOM.

En el caso de que se utilice detergente para la solubilización, la eliminación del detergente debe llevarse a cabo tal como describen Lövgren y Morein<sup>2</sup>, p.ej. mediante diálisis, cromatografía de columna, ultracentrifugación o flujo tangencial; puede resultar más práctico utilizar perlas (p.ej. perlas de látex) con una superficie hidrofóbica. De esta manera, el procedimiento en dos etapas es un innovador método robusto para formular nanopartículas, que puede variar en morfología dependiendo de la carga.

Además, el presente método, en el que en la etapa 1 se formula una membrana, es un método general para incorporar moléculas lipofílicas en la partícula G3 soluble en agua en la etapa 2.

Ejemplo 2

El presente ejemplo muestra que puede incorporarse una molécula con propiedades anfipáticas en las partículas G3 según la tecnología descrita en el Ejemplo 1. Cabe destacar que G3 es naturalmente soluble en agua como micela que se desintegra después de la administración debido a la dilución en el sitio de inyección y posteriormente después

del transporte desde el sitio. Por lo tanto, presentaba una biodisponibilidad pobre. En consecuencia, resulta importante la formación de un complejo estable en G3.

#### Diseño experimental

5 La configuración del experimento es esencialmente la misma que para el Ejemplo 1, aparte de que también se solubilizó una molécula hidrofóbica diterpenoide (DT) al mismo tiempo con colesterol, tal como se indica para el Ejemplo 1. La molécula de DT junto con la fracción C de Quil A (QHC) y colesterol se incorporaron en la partícula G3 utilizando el mismo procedimiento en dos etapas que en el Ejemplo 1, es decir, se solubilizó 1 µl de DT (100 µg/ml en etanol al 99% como solución madre) en una proporción molar de 1 colesterol: 0,5 DT descrito para la etapa 1 en el Ejemplo 1. En la etapa 2, se añadió QHC en una proporción molar de 1 a 1 con colesterol en el Ejemplo 1.

#### Resultados

15 La partícula G3 con DT incorporado presentaba la misma morfología que la partícula G3 sin DT ilustrada en la fig. 1A.] En la etapa 1, se visualizó una membrana sobre las paredes del tubo que desapareció en la etapa 2. La solución acuosa de la etapa 2 era transparente a ligeramente opalescente y no se detectó sedimento.

#### Conclusión

20 La molécula anfipática diterpenoide (DT) en la forma de micela se ha desintegrado con éxito con los solventes utilizados y en la etapa 2, se ha integrado en las nanopartículas según la invención, resultando en nanopartículas G3 típicas de 17 nm. De esta manera, se muestra la capacidad de utilizar las nanopartículas G3 según la invención como sistema portador/administrador para una molécula anfipática. Las moléculas anfipáticas con la configuración requerida forman micelas mayoritariamente inestables tras la administración en individuos que con frecuencia resultan en una baja biodisponibilidad. En el Ejemplo 4 se muestra que dicha partícula G3-DT es biológicamente activa. Se llevarán a cabo estudios adicionales durante el año de prioridad de la Convención de París con el fin de demostrar adicionalmente la capacidad inmunopotenciadora y la utilidad de las nanopartículas según la invención como partículas de administración y para potenciar los efectos biológicos mediante la interacción con las células, p.ej. mediante receptores en las membranas celulares. Para más información, ver Hu et al.<sup>3</sup>, incorporada como referencia en la presente memoria. Mediante la incorporación de otras moléculas con propiedades complementarias, se ampliarán sustancialmente los efectos de inmunopotenciación y de eliminación de las células de cáncer.

#### Ejemplo 3

35 La capacidad de G3 de eliminar células de cáncer se sometió a ensayo in vitro en el modelo U937 que representa una célula de tumor linfoides.

#### Diseño experimental

40 Se formularon partículas G3 con diversas proporciones en peso o molares de colesterol y QHC tal como se describe en Materiales y métodos. Se incubaron las diversas formulaciones y el efecto de eliminación de células de cáncer se midió después de la tinción y lectura mediante el método de FMCA tal como se indica en Materiales y métodos.

#### Resultados

45 Se formaron partículas G3 con la proporción de 1 colesterol vs. 5 QHC en peso, es decir, 1 colesterol vs. 1 QHC según la molaridad, tal como se indica en el Ej. 1, como se concluye a partir de la morfología según los resultados de ME (ver el Ej. 1 y la figura 1A). El efecto de eliminación de las células de cáncer U937 de las partículas G3 fue de la misma magnitud que para las partículas KGI (fig. 2), indicando que el componente activo QHC se conserva al incorporarlo en la formulación de G3. Se ha conocido anteriormente que KGI elimina las células de cáncer U937 (documento nº PCT/SE 2007/050878).

#### Ejemplo 4

55 El presente ejemplo muestra que la molécula anfipática DT puede incorporarse en las partículas G3 según la tecnología descrita en los Ejemplos 1 y 2.

60 DT es un diterpeno, un esteviósido producido a partir de *Stevia rebaudiana bertonii*<sup>10</sup>. Los presentes inventores utilizaron

65 DT porque presenta varias propiedades médicas interesantes, entre ellas algunas inmunológicas, tal como se ha publicado<sup>11</sup>. Un problema con dicho compuesto es que presenta una baja biodisponibilidad in vivo, ya que la experiencia de los presentes inventores es que requiere un sistema de transporte, por ejemplo, una nanopartícula.

La capacidad de las CD de inducir a que la célula de cáncer U937 produzca IL-8 se estudió para explorar el efecto inmunológico, aunque más importante, se estudió para demostrar que, mediante dicha citoquina, las CD pueden conducir a que el cáncer se diferencie y detener la proliferación incontrolada de las células de cáncer. Además, se sometió a ensayo la capacidad de DT de inducir citoquinas en las CD humanas, incluyendo IL-12. Dichos ensayos se llevaron a cabo a fin de subrayar que DT presenta un efecto inmunológico complementario importante a Quil A y, por lo tanto, resulta útil para la incorporación en las partículas G3. DT fue suministrado por Prodalysa Ltda., Santiago, Chile. Los presentes inventores utilizaron células dendríticas (CD) humanas, preparadas tal como se indica en Materiales y métodos.

#### Diseño experimental

Las células U937 se incubaron con formulaciones de KGI o G3, partiendo de 100 µg/ml, seguido de diluciones de 5 veces durante 6 etapas durante 48 horas a 37°C. A continuación, se recolectó el sobrenadante y se utilizó para la detección de IL-8, tal como se indica en Materiales y métodos.

Para la medición de la expresión génica, las CD humanas se incubaron con BBE, KGI, estevia y estevia en combinaciones con BBE o KGI (fig. 4A), así como G3 con o sin estevia incorporada (fig. 4B) durante 6 horas. La expresión de diversos genes de citoquina a partir de las CD tratadas se llevó a cabo mediante análisis de matrices de ARNm tal como se indica en Materiales y métodos.

#### Resultados

Las partículas G3 indujeron a que las células de cáncer U937 produjeran un nivel similar de producción de IL-8, que es un marcador de diferenciación de la célula de cáncer, al inducido por KGI (fig. 3).

La figura 4A muestra que DT indujo niveles elevados de IL-12, IL1β e IL-6 superiores a los inducidos por las formulaciones similares a ISCOM, KGI y BBE.

Las partículas G3 sin DT incorporado indujeron un nivel elevado de IL-12, mientras que la formulación de G3 sin DT incorporado no indujo un nivel detectable de IL-12 (fig. 4B).

#### Comentario y conclusión

DT presenta propiedades complementarias a G3. La capacidad de inducir las células de cáncer U937 a producir IL-8 podría indicar inmunopotenciación. Más importante, G3 por sí solo puede diferenciar y conducir a que la célula de cáncer detenga la proliferación al igual que KGI, tal como han demostrado los presentes inventores (manuscrito en preparación que se proporcionará como suplemento). Se demuestra que como efecto complementario a G3 solo, DT induce potencialmente IL-2 que resulta importante para la inducción de un tipo Th1 de respuesta, en particular para la producción de IFN, que presenta un efecto anticáncer en determinados tumores. Desde el punto de vista inmunológico, IL-12 resulta importante en el rechazo de los tumores en el caso de que existan antígenos tumorales reconocidos por el sistema inmunológico. IL-12 también resulta importante para la defensa inmunológica contra las infecciones víricas. Resulta de particular interés registrar que DT se incorpora en G3, sirviendo como partícula portadora/transportadora, que incrementa su estabilidad en forma de partícula después de la administración y en consecuencia incrementa la biodisponibilidad de G3. Cabe destacar que DT por sí solo se encuentra en forma de micela en agua. Una forma de micela administrada en el cuerpo de un individuo se desintegra por dilución en el sitio de administración y posteriormente se reduce su nivel a medida que es transportado desde el sitio. La partícula G3 se sostiene debido a otras fuerzas y no se desintegra, p.ej., hasta después de la inyección, tal como se ha observado en estudios de ME (no publicado). El presente ejemplo subraya que la invención de G3 sirve como portador para moléculas anfipáticas.

#### Ejemplo 5

La inhibición de la actividad de timidina quinasa (TK) por las partículas de G3 es una propiedad esencial para evitar la replicación incontrolada de las células de cáncer y para las etapas posteriores de reorientación de la célula a una muerte celular programada, es decir, apoptosis.

Con el fin de explorar un mecanismo de la partícula G3 de inhibir las células de cáncer, se evaluó la replicación mediante la inhibición del enzima TK sobre las células U937. Aparte de utilizar la inhibición de la actividad del enzima TK para demostrar la inhibición de la replicación de las células de cáncer, se utilizó dicho modo de acción para evaluar si las partículas G3 o cualquier otra formulación de *Quillaja* utilizada para el tratamiento anticáncer resultará útil para tratar pacientes tumorales, por sí sola o en combinación con otras formulaciones anticáncer. Dicho ensayo puede utilizarse en un kit para medir la sensibilidad de los fármacos anticáncer utilizando la inhibición del modo de acción de TK en muestras clínicas en el campo definido como medicina personalizada.

Diseño del experimento

Se expusieron células U937 a las mismas cantidades de G3 o KGI. En diversos puntos temporales, se recolectaron las células tratadas y se midieron las actividades de TK intercelular tal como se indica en Materiales y métodos.

Resultados

Las partículas G3 inhiben prácticamente en la misma magnitud las actividades de TK intercelular que KGI (figura 5).

Conclusión

La inhibición de la actividad de TK muestra que la célula de cáncer deja de replicarse. Por lo tanto, puede utilizarse la inhibición de la actividad de TK a nivel celular para medir la sensibilidad de la célula de cáncer de muestras del paciente al fármaco, es decir, las partículas G3, preparando el terreno a la medicina personalizada. Según los conocimientos de los presentes inventores, se ha utilizado la actividad de TK como ensayo no específico para la detección de TK sérica de pacientes de cáncer u otras indicaciones de enfermedad de los pacientes: la innovación de los presentes inventores es la utilización directa en las células de cáncer de los pacientes (con una especificidad de 100%, es decir, sólo se utilizan células de cáncer). Lo anterior, junto con la propiedad de eliminación de células de cáncer, hace a las partículas G3 más viables para la utilización clínica al evitar su utilización en pacientes no respondedores.

Parte II. G3 como fármaco anticáncerEjemplo 6

El presente ejemplo muestra que G3 y G3 con DT (G3-DT) eliminan el tumor no sólido humano de células de leucemia mieloide aguda (LMA) más eficientemente que el componente activo QHC (QHC) en G3 en una forma no particulada.

Diseño experimental

Las nanopartículas G3 y G3DT formuladas tal como se indica en los ej. 1 y 2, se compararon con el componente activo QHC para el efecto de eliminación de células de cáncer. Las muestras se diluyeron en serie 5 veces en 6 etapas partiendo de 100 µg/ml y se incubaron durante 3 días con células de LMA HL-60. A continuación, las células se tiñeron y se leyeron utilizando el método de FMCA.

Resultado

G3 (IC<sub>50</sub>=3,144 µg/ml) y G3-DT (IC<sub>50</sub>=3,12 µg/ml) inhibieron el crecimiento de las células de LMA más eficientemente que QHC (IC<sub>50</sub>=8,473 µg/ml) (fig. 6).

Conclusiones y comentario

Esencialmente, G3 presenta un efecto de eliminación de células de cáncer más fuerte que QHC no particulado. La incorporación de DT en las partículas de G3 formando G3-DT potencia el efecto de eliminación de células de cáncer en comparación con QHC o G3 sin DT. DT solo no presenta efecto de eliminación de células de cáncer (no mostrado). La QHC no particulada provoca una reacción local que resulta anulada por las formas particuladas. El efecto añadido de G3-DT en la eliminación de las células de cáncer LMA también implicaría una reducción beneficiosa de la dosis.

Ejemplo 7

La citarabina es un fármaco citostático disponible comercialmente que se utiliza para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda (LMA). El presente ejemplo se diseñó con el fin de explorar la capacidad de G3 de potenciar el efecto de eliminación de células de cáncer de la citarabina.

Diseño experimental

Se expusieron células de LMA HL-60 durante 3 días a concentraciones predeterminadas de G3 y citarabina por separado y en combinación, tal como se muestra en la fig. 7. A continuación, se tiñeron las células y se leyeron para el efecto de eliminación de células de cáncer mediante el método de FMCA.

Resultado

Tras la incubación durante 3 días, G3 o citarabina por sí solas eliminaron menos de 5% y de 55% de las células, respectivamente. Al combinarlas, la tasa de eliminación se elevó significativamente ( $P < 0,01$ ) hasta aproximadamente 75% (fig. 7).

Conclusiones y comentario

Las partículas G3 potenciaron significativamente el efecto de eliminación de la citarabina sobre las células de LMA HL-60. El tratamiento con el fármaco citostático citarabina provoca efectos secundarios con molestias para el paciente. Debido a que las partículas de G3 son prácticamente no tóxicas, el tratamiento de combinación con G3 y citarabina también podría presentar una mayor eficacia y reducir los efectos secundarios mediante reducción de la dosis de citarabina.

Ejemplo 8

El presente ejemplo demuestra que G3 presenta un efecto añadido de la eliminación de células de cáncer sobre el fármaco citostático comercial para el cáncer, daunorrubicina, sobre las células de tumor no sólido de leucemia mieloide agudo (LMA) humano.

Diseño experimental

Las células de LMA HL-60 se expusieron a una concentración fija (1  $\mu\text{M}$ ) de G3 en combinación con concentraciones crecientes de daunorrubicina a partir de 1.000 nM y se incubaron durante 3 días. A continuación, las células se tiñeron y se leyeron mediante el método de FMCA.

Resultado

G3 potencia significativamente ( $P < 0,0001$ ) el efecto de eliminación de las células de cáncer de la daunorrubicina en comparación con la daunorrubicina por sí sola (fig. 8).

Conclusiones y comentario

Las partículas de G3 potenciaron sinérgicamente el efecto de eliminación de la daunorrubicina sobre las células de LMA HL-60. Debido a que las partículas de G3 son prácticamente no tóxicas, es probable que la dosis del fármaco citostático daunorrubicina se reduzca considerablemente en una terapia de combinación con G3, implicando un mejor efecto de tratamiento, y debido a que los efectos secundarios son menores, el tratamiento puede prolongarse durante tiempos más largos en pacientes sensibles a la daunorrubicina.

Ejemplo 9

El presente ejemplo se diseñó a fin de comparar los efectos de G3 y G3 con DT incorporado (G3DT) sobre tumores sólidos ejemplificados por las células de cáncer de próstata humano PC-3.

Diseño experimental

Se compararon G3 y G3DT con QHC no particulado. Las muestras se diluyeron en serie 5 veces en 6 etapas partiendo de una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  y se incubaron con células de cáncer de próstata PC-3 durante 3 días. A continuación, las células se tiñeron y se leyeron mediante el método de FMCA.

Resultado

Las partículas de G3 ( $\text{IC}_{50}=2,75 \mu\text{g/ml}$ ) y G3-DT ( $\text{IC}_{50}=1,662 \mu\text{g/ml}$ ) incorporado inhibieron el crecimiento de las células de cáncer de próstata más potentemente que el mismo componente activo QHC por sí solo ( $\text{IC}_{50}=3,388 \mu\text{g/ml}$ ) (fig. 9)

Conclusiones y comentario

Esencialmente, G3 en el presente ejemplo presentaba un efecto de eliminación similar de las células de cáncer de próstata PC-3 al de QHC. Mediante la incorporación de DT en la partícula, es decir, G3-DT, se potenció el efecto de eliminación de células de cáncer de G3, al igual que con las células de LMA. Es conocido que DT por sí solo no presenta ningún efecto de eliminación de células de cáncer. Su efecto aditivo en el presente ejemplo en la eliminación de células de cáncer PC-3 implica que se potencia el efecto de G3 y también que se reducen los efectos secundarios, en caso de existir. Cabe destacar que QHC en forma no particulada es comparativamente eficiente in vitro pero QHC in vivo se mantiene en el sitio de inyección, resultando en una baja biodisponibilidad y en efectos secundarios locales.

Ejemplo 10

El presente ejemplo demuestra el efecto de combinación entre G3 y el fármaco comercial docetaxel sobre tumores sólidos ejemplificados por las células de cáncer de próstata PC-3.

Diseño experimental

5 Se expusieron células PC-3 durante 3 días a concentraciones predeterminadas de G3 y docetaxel por separado y en combinación, tal como se muestra en el gráfico. A continuación, las células se tiñeron y se leyeron mediante el método de FMCA.

Resultado

10 El efecto de eliminación de células de cáncer de G3 o de docetaxel por sí solos fue ligeramente superior a 35% y 2% de las células, respectivamente. Al combinar dichos dos fármacos, la tasa de eliminación se elevó significativamente ( $P < 0,01$ ) hasta aproximadamente 75%. (Fig. 10).

Conclusiones y comentario

15 Las partículas de G3 potencian significativamente el efecto de eliminación de células de cáncer del citostático docetaxel sobre las células de cáncer de próstata PC-3, implicando una mayor eficacia y menores dosis del fármaco citostático, con efectos secundarios reducidos en vista del hecho de que las partículas de G3 son prácticamente no tóxicas.

Ejemplo 11

20 El presente ejemplo se diseñó para explorar el efecto de combinación de G3 y un citostático comercial reciente y cubierto por patente denominado cabazitaxel sobre las células de tumor sólido de cáncer de próstata humano PC-3.

Diseño experimental

25 Las células de cáncer de próstata PC-3 se expusieron a una concentración fija (1  $\mu\text{M}$ ) de G3 en combinación con concentraciones crecientes de cabazitaxel a partir de 100  $\mu\text{M}$  y se incubaron durante 3 días. A continuación, las células se tiñeron y se leyeron mediante el método de FMCA.

30

Resultado

35 El cabazitaxel por sí solo eliminó las células de cáncer PC-3 con una  $\text{IC}_{50} = 25,54 \mu\text{M}$ . El efecto de eliminación de células de cáncer del cabazitaxel en combinación con G3 ( $\text{IC}_{50} = 0,00023 \mu\text{M}$ ) resultó potenciado significativamente ( $P < 0,0001$ ) (fig. 11).

Conclusiones y comentario

40 Las partículas de G3 potenciaron significativa y sinérgicamente el efecto de eliminación del cabazitaxel de las células de cáncer de próstata PC-3, con la perspectiva de una mayor eficacia, menores efectos secundarios y la posibilidad de un tratamiento prolongado en vista del hecho de que las partículas de G3 son prácticamente no tóxicas.

Ejemplo 12

45 El presente ejemplo se diseñó para explorar la capacidad de las partículas de G3 formuladas con otra importante fracción de saponina de *Quillaja*, QHA, de eliminación de tumores sólidos, ejemplificados en el presente ejemplo por la línea de células de cáncer renal ACHN, ya que se ha observado anteriormente que las partículas de Duecom formuladas con dicha fracción presentan una capacidad de eliminación más fuerte que las partículas de Duecom formuladas con fracción C (QHC).

50

Diseño del experimento

55 Se diluyó 5 veces G3 formulado con QHA y con QHC, en 6 etapas desde 100  $\mu\text{g/ml}$  hasta 0,032  $\mu\text{g/ml}$  y se incubó con células de carcinoma renal ACHN a 37°C durante 3 días. Se determinó la supervivencia celular mediante el método de FMCA.

Resultado

60 G3 formulado con QHA elimina significativamente más células de cáncer renal ACHN ( $P < 0,01$ ) que G3 formulado con QHC (fig. 12).

Conclusiones y comentario

65 Dicho resultado es prácticamente idéntico a la observación anterior con partículas Duecom formuladas con QHA y QHC, es decir, las formulaciones con QHC eliminan selectivamente más células de tumor no sólido mientras que las formulaciones con QHA preferentemente eliminan más tumores sólidos que no sólidos. Esta propiedad de eliminación

específica de tipo tumoral de las formulaciones de G3 podría aprovecharse al igual que con las partículas Duecom, a fin de evitar la eliminación de células normales en otra categoría.

### Parte III. G3 como adyuvante

#### Ejemplo 13

Ensayo animal de partículas de G3 como adyuvante contra virus completo.

Se evaluó el efecto adyuvante de G3 en comparación con ISCOM en un ensayo animal con ratones C57BL/6. En el experimento se utilizó virus influenza desintegrado e inactivado como antígeno modelo.

#### Diseño del experimento

Seis ratones por grupo, inmunizados dos veces separadas por 4 semanas; se extrajeron muestras de sangre de los mismos a las 3 semanas de la primera inmunización y a las 4 semanas de la segunda inmunización (ver la descripción gráfica en la página siguiente). En la necropsia, es decir, 4 semanas después de la segunda inmunización, se analizaron las células de bazo para la producción de citoquinas, tal como se indica en Materiales y métodos. Con el fin de facilitar la comprensión, se muestra el agrupamiento de los animales en la fig. 13A.

#### Resultado

- G3 e ISCOM indujeron de manera dependiente de la dosis niveles detectables de anticuerpo de IH después de la primera inmunización. Tras la segunda inmunización, el nivel de anticuerpo de IH se incrementó considerablemente (un claro efecto de refuerzo) también de manera dependiente de la dosis para las formulaciones con adyuvante de G3. Las formulaciones con adyuvante de ISCOM, G3 y G3 con DT indujeron niveles considerablemente más elevados de anticuerpo de IH que la vacuna comercial sin adyuvante, es decir, se registraron niveles similares o más elevados de respuestas de IH en animales inmunizados con formulaciones de G3 y de ISCOM en dos puntos temporales después de la primera (fig. 13A) y segunda (fig. 13B) inmunización.
- Se detectaron niveles similares o incluso superiores de IFN- $\gamma$  e IL-4 en células de bazo después de la reestimulación in vitro con el virus fragmentado en animales inmunizados con formulaciones de G3 y de ISCOM en la necropsia 4 semanas después de la segunda inmunización (fig. 13C).

#### Conclusión

Tanto la inmunidad mediada por anticuerpos como la inmunidad celular inducidas por las formulaciones de G3 y de ISCOM son cualitativa y cuantitativamente iguales, es decir, las formulaciones de G3, es decir G3 y G3DT, pueden sustituir a ISCOM como adyuvante.

### Parte IV. G3 como sistema de administración de fármaco

#### Ejemplo 14

Se considera que VLX40 es un fármaco prometedor para el tratamiento del cáncer. La investigación dirigida a la comercialización ha cesado porque VLX40 no ha podido ser formulado de manera adecuada para su administración en animales en ensayos preclínicos y, en consecuencia, tampoco en ensayos con pacientes. El motivo ha sido que VLX40 no podía solubilizarse en agua, paso necesario para su incorporación en el cuerpo. El presente experimento se diseñó para comprobar si la tecnología de G3 podría resolver este problema y solubilizar VLX40 en agua.

#### Diseño experimental

- En primer lugar, se disolvió VLX40 en el disolvente orgánico DMSO, rindiendo una concentración de 20 mM (5,8664 mg/ml, la concentración más alta recomendada) y se consideró la solución madre.
- Se utilizó VLX40 a una concentración de 100  $\mu$ g/ml como control de VLX40 en agua, es decir, en forma de una formulación prácticamente no soluble en agua.
- Se mezclaron 8,5  $\mu$ l de la solución madre de VLX40 con 50  $\mu$ l de cloroformo en un tubo Eppendorf que contenía 500  $\mu$ l de agua para formar una membrana lipídica artificial (ver el Ejemplo 1). En la segunda etapa, se añadieron 10  $\mu$ l de Quil A (100 mg/ml en agua como solución madre) y se incubaron durante la noche a 37°C. Ésta es la formulación G3-VLX40, formada esencialmente de la manera descrita en el Ejemplo 1.

Se recolectó el control de VLX40-DMSO (2) y la suspensión/solución de G3-VLX40 (3) y se sometieron a ensayo con células U937-GTB tras diluirlos en serie a partir de la concentración indicada anteriormente y se calcularon los valores de IC<sub>50</sub> a partir de las curvas de regresión.

Resultados

5 La solución madre (1) añadida a agua dio lugar a un sedimento o precipitado visible, es decir, lo esperado a partir de experimentos anteriores. De esta manera, VLX40 no pudo disolverse en agua a partir del tubo de control (2). Se confirmó la formulación de partículas de G3-VLX40 (3) mediante microscopía electrónica en la solución/suspensión transparente. No se produjo ningún precipitado o sólo un precipitado muy escaso en el tubo que contenía la formulación de G3-VLX40.

10 Se sometieron a ensayo las diversas formulaciones para función, es decir, en bioensayo, para el efecto de eliminación de células de cáncer de las células U937 (ver Materiales y métodos). La fase acuosa de VLX40/DMSO (2) presentó un efecto anticáncer bajo (expresado como IC<sub>50</sub>), lo que significa que sólo una fracción muy pequeña de la mezcla de VLX40/DMSO se disuelve en agua (fig. 14A).

15 En contraste, la fase acuosa de la formulación de partículas de G3-VLX40 (3) presentó una elevada actividad anticélulas de cáncer, tal como se muestra en la figura 14A.

20 La parte no soluble sedimentada también se sometió a ensayo in vitro para el efecto de eliminación de las células de cáncer. Se registró un elevado efecto de eliminación de células de cáncer con VLX40/DMSO (2) en el precipitado insoluble en agua; el precipitado escasamente soluble en agua de la formulación de G3-VLX40 presentó un bajo efecto de eliminación de células de cáncer (figura 14B).

El presente experimento se repitió 3 veces.

25 Conclusión y comentario

Se disolvieron aproximadamente 50 a 100 microgramos de VLX40 con 2 mg de G3 medidos como componente de *Quillaja* en un volumen de 1 ml de agua. Debe indicarse que la concentración de partículas de G3 puede incrementarse mediante el incremento de la concentración de partículas de G3, por ejemplo 10 mg/ml de formulación de G3 pueden encontrarse presentes en una solución transparente. Los presentes inventores también pudieron modificar la composición de las partículas de G3 para facilitar la incorporación de una mayor cantidad de VLX40. El presente ejemplo demuestra claramente que las partículas de G3 satisfacen una demanda no resuelta al facilitar la formulación de fármacos para la utilización clínica que sin la tecnología de G3 no podrían llegar al paciente debido a que no pueden solubilizarse en agua con las tecnologías actuales.

35 Ejemplo 15

El presente ejemplo demuestra que la partícula de G3, como sistema de administración de fármaco, puede incorporar fácilmente otros dos fármacos no solubles en agua, el busulfán y la roscovitina, solubilizándolos en agua.

40 Diseño experimental

Se utilizaron dos µl de busulfán (50 mg/ml en DMSO) o 1 µl de roscovitina (100 mg/ml en cloroformo) junto con 2 µl de colesterol (100 mg/ml en cloroformo) para formar la membrana lipídica con busulfán o roscovitina, respectivamente, utilizando el método descrito para la etapa 1 en el Ejemplo 1. A continuación, se añadieron 10 µl de QHC (100 mg/ml en agua) al igual que para la etapa 2 en el Ejemplo 1, proporcionando una proporción molar de QHC:colesterol:busulfán/roscovitina=1:1:0,5.

50 Resultado

Para ambos compuestos, es decir busulfán y roscovitina, se visualizaron soluciones transparentes, es decir, sedimento o turbidez en la fase acuosa causada por los fármacos insolubles, que se eliminaron mediante su incorporación en las partículas de G3 solubles en agua.

55 Comentario

El presente ejemplo, de manera similar al Ejemplo 13, muestra nuevamente la capacidad de G3 como plataforma general para solubilizar en agua moléculas/fármacos lipofílicos no solubles en agua mediante la incorporación de los mismos en las partículas de G3. Considerando que aproximadamente el 40% de los candidatos a fármaco anticáncer no son solubles en agua y por lo tanto no pueden desarrollarse ulteriormente en productos comerciales, la presente invención puede mejorar drásticamente la situación.

60 Ejemplo 16

65 En el presente ejemplo, los presentes inventores exploraron si una vitamina lipofílica, la vitamina D3, podía integrarse

en la nanopartícula de G3 con el fin de solubilizarla en agua. Se disolvió en cloroformo y se incorporó en la partícula de G3 tal como se indica en el Ejemplo 1; para más información, ver Materiales y métodos.

#### Diseño experimental

Se formaron partículas de G3 utilizando 50% de colesterol y 50% de vitamina D3 para formar la membrana lipídica. Se añadió Quil A a la fase acuosa para generar las partículas de G3 (para más información, ver el Ejemplo 1). A modo de controles se utilizó 100% colesterol y 100% vitamina D3 en agua. Las muestras con vitamina D3 incorporada en partículas de G3 se analizaron en Uppsala University Hospital Laboratory en un instrumento automático DiaSorin Liaison.

#### Resultado

La fase acuosa recuperada en la etapa 2 era una solución transparente y no pudo detectarse sedimento. Se detectó más vitamina D3 en la formulación de G3-vitamina D3 basada en *Quillaja* no fraccionada (950 nmoles/l) que en la formulación de fracción QHC de *Quillaja*, es decir, 55 nmoles/l. En un experimento de dilución, la concentración de vitamina D3 era lineal en la lectura, demostrado que era una suspensión homogénea de partículas, es decir, no se producía agregación, concordando con otras partículas de G3 observadas en la fig. 1. En comparación, sólo se detectaron cantidades residuales de vitamina D3 en el control de vitamina D3 y no se encontraba presente nada de vitamina D3 en el control de colesterol.

#### Conclusión y comentario

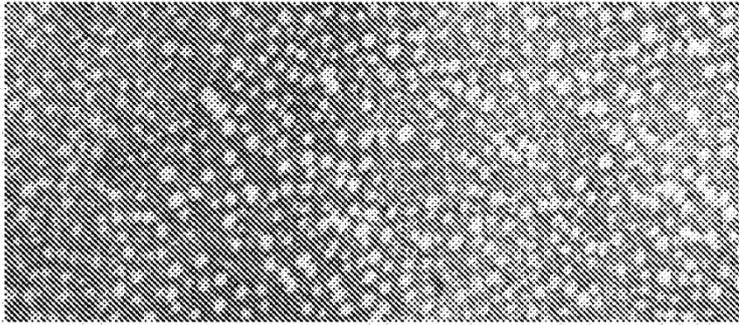
La vitamina D3 es una vitamina esencial que resulta pobremente asimilada por el cuerpo en la forma lipídica por vía oral o parenteral. De esta manera, una forma soluble en agua facilitaría su asimilación por dichas vías. Los inventores demuestran en el presente experimento que la vitamina D3 se incorpora en las nanopartículas de G3 tanto con saponina de *Quillaja* no fraccionada como con la fracción QHC de la misma. Resulta importante que la lectura lineal del experimento de dilución muestra una dispersión homogénea de las partículas, corroborada mediante microscopía electrónica de las partículas de G3 en general (ver la fig. 1). En alimentos, la saponina de *Quillaja* no fraccionada está bien aceptada y es utilizada en, p.ej., bebidas, incluyendo cerveza, y también en otros tipos de alimento. Por lo tanto, la alternativa más económica para la formulación de G3 para la administración de dicha vitamina es *Quillaja* no fraccionada como base para la formulación de G3. En el presente experimento, se incorporó más D3 en G3 con saponina de *Quillaja* no fraccionada que en las partículas de G3 con la fracción QHC de saponina.

#### REFERENCIAS

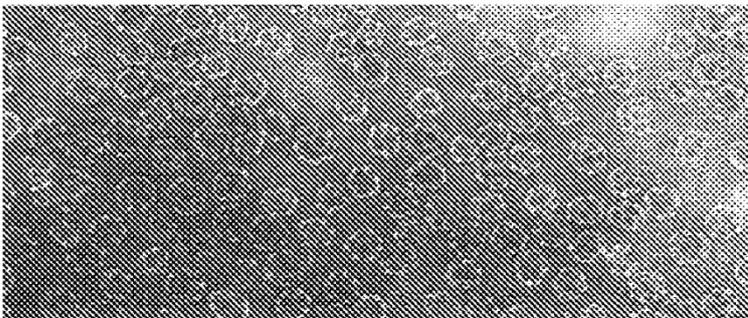
- <sup>1</sup> Kefei Hu, Saideh Berenjian, Rolf Larsson, Joachim Gullbo, Peter Nygren, Tanja Lövgren, Bror Morein Nanoparticulate *Quillaja* saponin induces apoptosis in human leukemia cell lines with a high therapeutic index. International Journal of Nanomedicine, enero de 2010, volumen 2010:5 páginas 51 a 62
- <sup>2</sup> Lövgren & Morein (2000) ISCOM Technology in Methods in Molecular Medicine, Vol 42: 239-258, Vaccine adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols, Edited by D.T.O O'Hagen, Humana Press, Inc., Titawa, N.J.
- <sup>3</sup> Morein B, Hu K, Lovgren K and D'Hondt E. New ISCOMs meet unsettled vaccine demands in Vaccine Adjuvants and Delivery Systems, Ed. by Singh M. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, Hoboken, New Jersey. 2007, p191-222.
- <sup>4</sup> Lycke, N. From toxin to adjuvant: The rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. Cell Microbiol 2004, 6(1), 23-32, and by Mowat et al. (2001)
- <sup>5</sup> Mowat, A.M., Donachie, A.M., Jagewalll, S., Schon, K., Lowenadler, B., Dalsgaard, K., et al. CTA1-DD-immune stimulating complex: a novel, rationally designed combined mucosal vaccine adjuvant effective with nanogram doses of antigen. J. Immunol 2001:3398-3405, 6).
- <sup>6</sup> Blair AH, Ghose TI. Linkage of cytotoxic agents to immunoglobulins. J Immunol Methods. 1983 Apr 29;59(2):129-43.
- <sup>7</sup> Ghose TI, Blair AH, Kulkarni PN. Preparation of antibody-linked cytotoxic agents. Methods Enzymol. 1983;93:280-333.
- <sup>8</sup> Davis MT, Preston JF. A simple modified carbodiimide method for conjugation of small-molecular-weight compounds to immunoglobulin G with minimal protein crosslinking. Anal Biochem. 116(2):402, 15 de sept. de 1981).
- <sup>9</sup> Eliasson DG, El Bakkouri K, Schön K, Ramne A, Festjens E, Löwenadler B, Fiers W, Saelens X, Lycke N. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine. Vaccine. 2008 Feb 26;26(9):1243-52. Epub 2008 Jan 10.
- <sup>10</sup> A. Esmat Abou-Arab, Azza Abou-Arab and M.Ferial Abu-Salem, Physico-chemical assessment of natural sweeteners steviosides produced from *Stevia rebaudiana bertonii*, African Journal of Food Science, Vol4 (5) pp 269-281, May 2010.
- <sup>11</sup> Chaiwat Boonkaewwant, Chaivat Toskulkao, and Molvibha Vongsakul. Antinflammatory and Immunomodulatory Activities of Stevioside and Its Metabolite Steviol on THP-1 Cells, J. Agric. Food Chem. 2006, 54, 785789 7)
- <sup>13</sup> Kersten, G.F.A., Spiekstra, A., Beuvery, E.C. and Cromelin D.J.A. (1991) On the structure of immune-stimulating saponin lipid complexes (ISCOMs). BBA 1062, 165-171

## REIVINDICACIONES

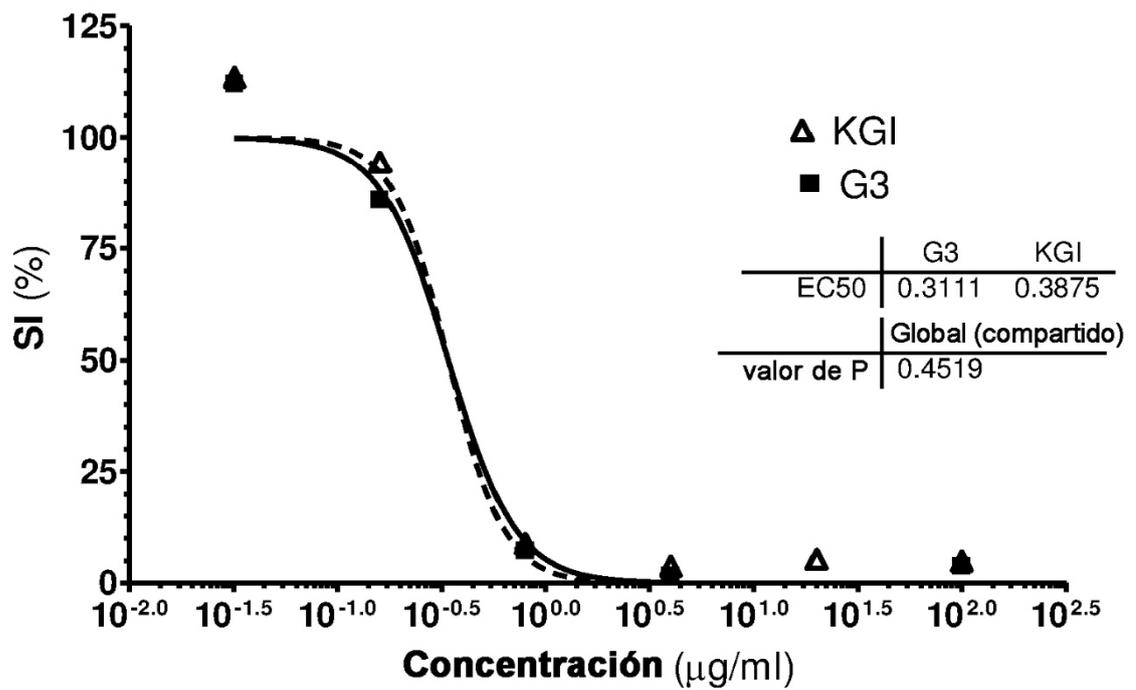
- 5 1. Nanopartículas estables que comprenden esteroles, preferentemente colesterol y un componente de *Quillaja saponaria Molina* seleccionado de entre ácido de *Quillaja* y saponina de *Quillaja*, caracterizadas por que dichas nanopartículas no comprenden un fosfolípido, presentan un diámetro de partícula comprendido en el intervalo de 15 a 25 nanómetros y en las que la proporción de colesterol a saponina de *Quillaja* es de 1:10 a 10:1, preferentemente de 1:2 a 2:1.
- 10 2. Nanopartículas según la reivindicación 1, en las que dicho componente de *Quillaja* es una saponina de *Quillaja*, preferentemente la fracción QHA, QHB y/o QHC de saponina de *Quillaja*.
- 15 3. Nanopartículas según la reivindicación 1, que comprenden colesterol y fracción QHC de saponina de *Quillaja*, en las que las partículas presentan un diámetro de entre aproximadamente 17 a 20 nm y en las que la proporción molar de colesterol a QHC es de aproximadamente 1:1.
- 20 4. Nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además por lo menos una molécula anfipática o hidrofóbica.
- 25 5. Nanopartículas según la reivindicación 3 o 4, en las que la molécula anfipática o hidrofóbica es por lo menos un elemento seleccionado de entre un antígeno, un adyuvante, una molécula de transporte dirigido, un compuesto farmacéutico y un compuesto de tipo alimentario.
- 30 6. Nanopartículas según la reivindicación 5, en las que la molécula anfipática o hidrofóbica es por lo menos un elemento seleccionado de entre diterpeno DT, VLX40, busulfán, roscovitina y vitamina D3.
- 35 7. Composición que comprende una o más nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 40 8. Composición según la reivindicación 7, en la que se incorporan diferentes fracciones de saponina de *Quillaja* en diferentes nanopartículas.
- 45 9. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 para la utilización como fármaco, opcionalmente en una composición farmacéutica que comprende además tampones, diluyentes, excipientes, adyuvantes y/o portadores farmacéuticamente aceptables.
- 50 10. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 para la utilización como adyuvante.
- 55 11. Adyuvante farmacéutico según la reivindicación 10 para la utilización en combinación con una vacuna.
- 60 12. Nanopartícula según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 7 y 8 para la utilización como agente anticáncer.
13. Método para producir nanopartículas libres de fosfolípidos, que comprende las etapas siguientes:
- 45 a) proporcionar una superficie hidrofóbica,  
 b) poner en contacto la superficie hidrofóbica con una solución de esteroles, preferentemente colesterol, disueltos como monómeros en un solvente orgánico o detergente,  
 c) eliminar el solvente o detergente, formando una membrana de esteroles sobre la superficie,  
 d) proporcionar una solución acuosa de micelas de saponina de *Quillaja*,  
 50 e) añadir la solución acuosa que comprende las micelas de saponina a la membrana de esteroles, de manera que se forma un complejo entre las saponinas y los esteroides y se suspende en la solución acuosa, y en la que la proporción de colesterol a saponina de *Quillaja* puede ser de entre 1:10 y 10:1, preferentemente de entre 1:2 y 2:1.
- 55 14. Método para evaluar la aplicabilidad de un agente anticáncer según la reivindicación 12, que comprende:
- a) poner en contacto las células de cáncer de un paciente in vitro con nanopartículas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o una composición farmacéutica según la reivindicación 7 o 8,  
 b) medir por lo menos un efecto indicativo de efecto terapéutico de dichas nanopartículas o composición farmacéutica en dichas células de cáncer,  
 60 en el que se evalúa el agente anticáncer como aplicable a dicho paciente individual en el caso de que las nanopartículas o la composición farmacéutica muestre un efecto significativo sobre dichas células de cáncer.



**Figura 1A.**



**Figura 1B.**



**Figura 2.**

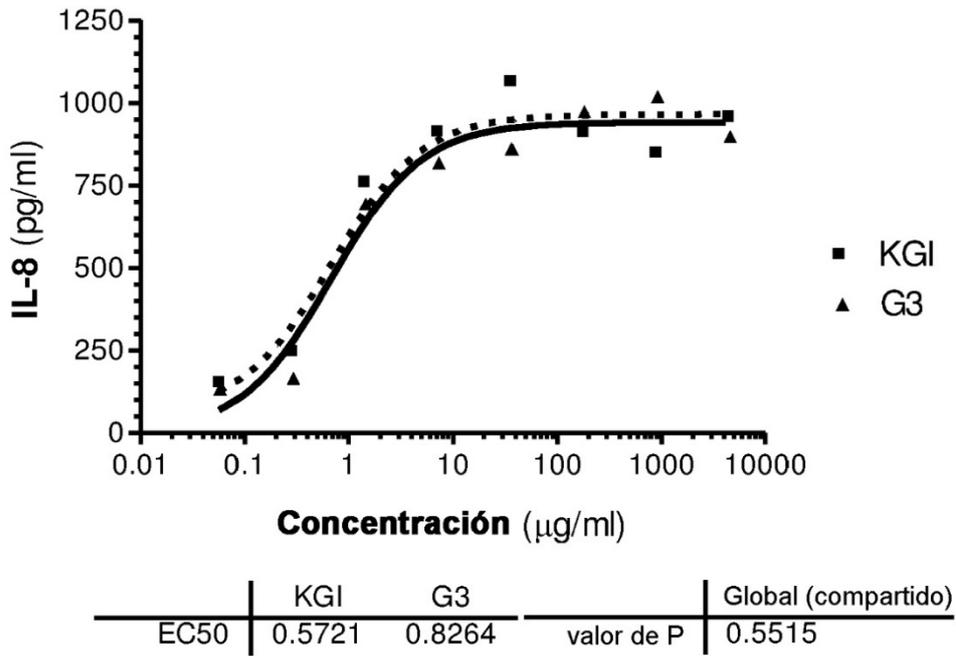


Figura 3.

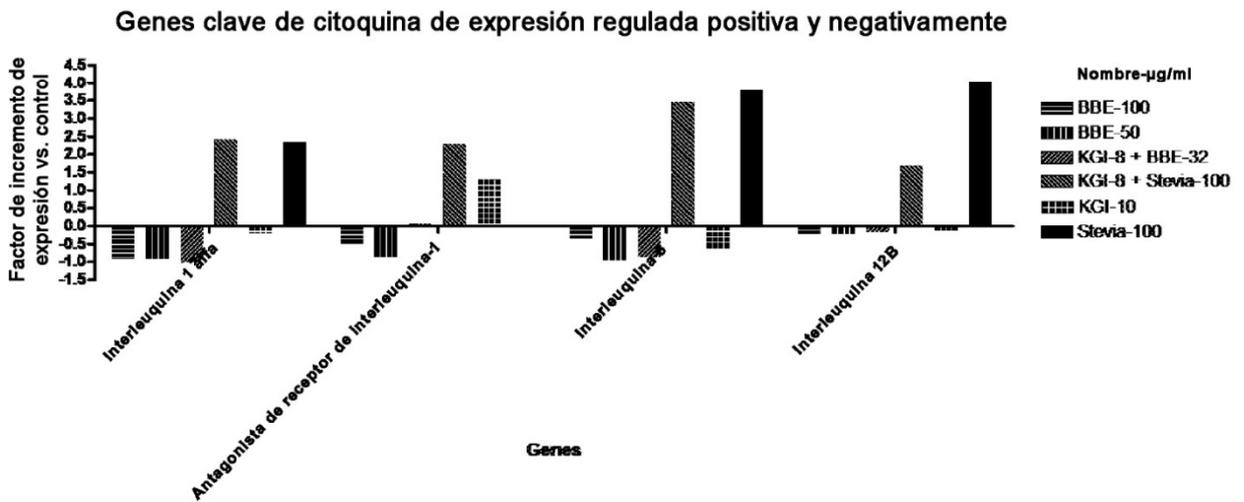


Figura 4A

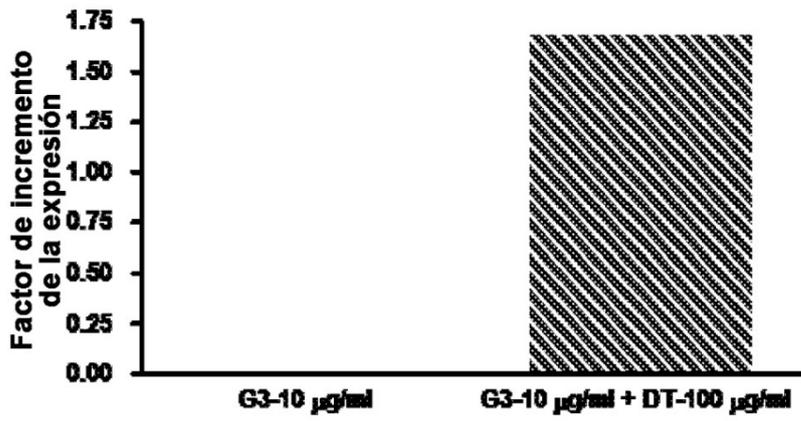


Figura 4B.

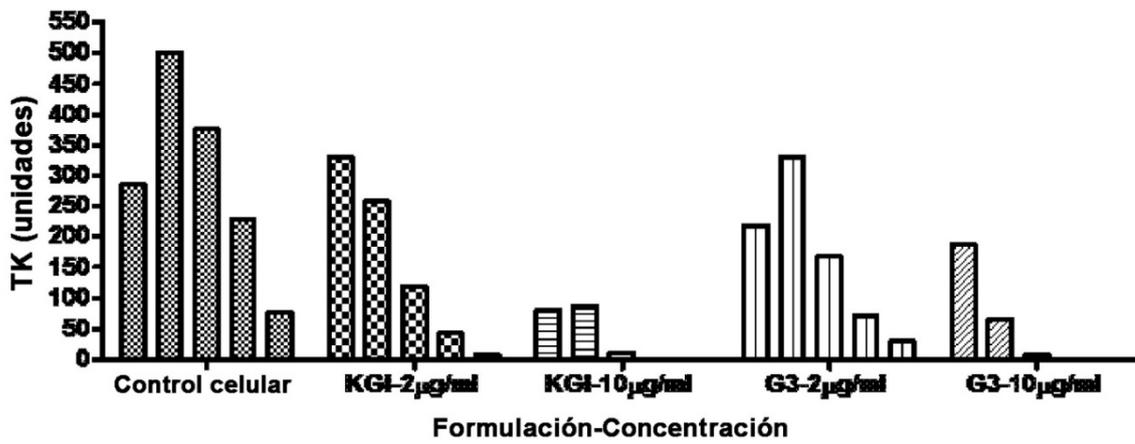


Figura 5.

**G3 sobre células de LMA HL-60**

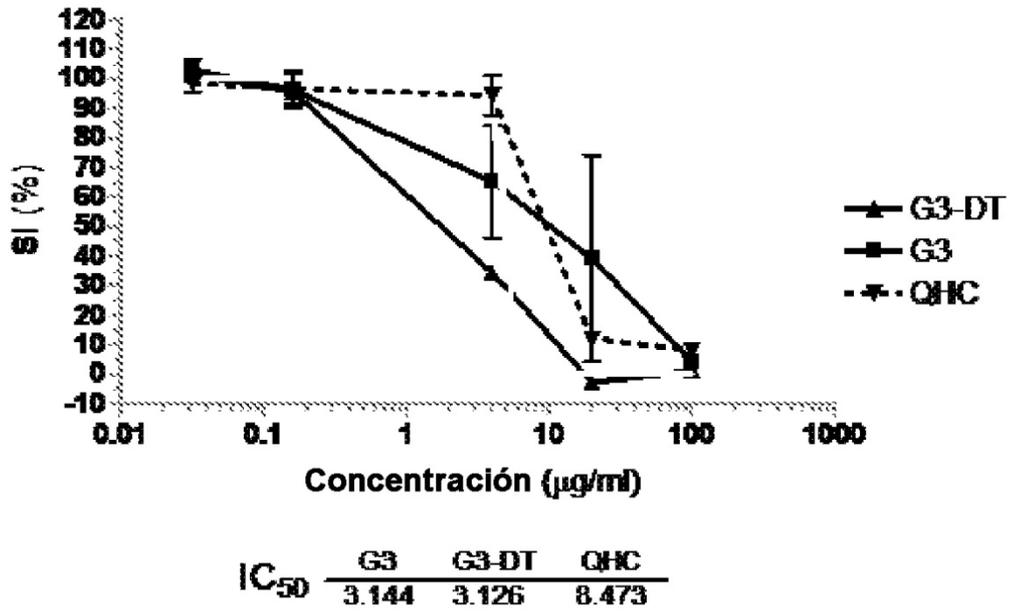


Figura 6.

**Efecto de la combinación de G3 y citarabina sobre las células de LMA HL-60**

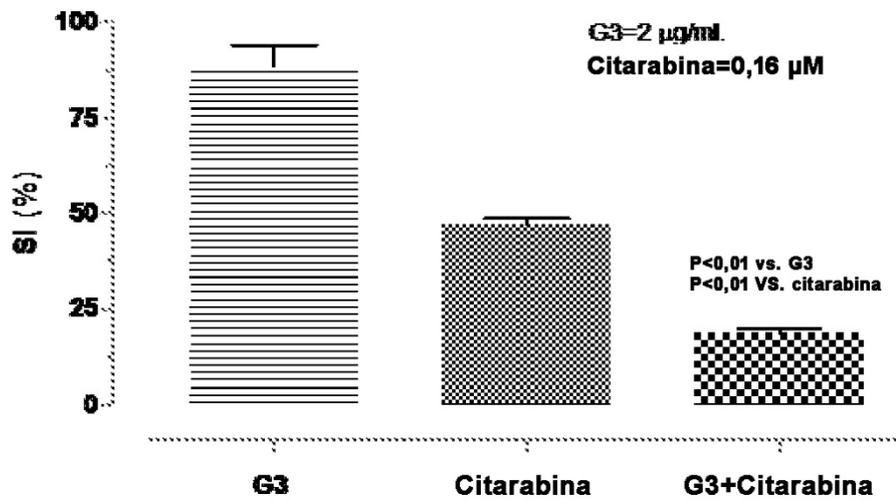


Figura 7

Efecto de combinación de G3 y daunorrubicina sobre las células de LMA HL-60

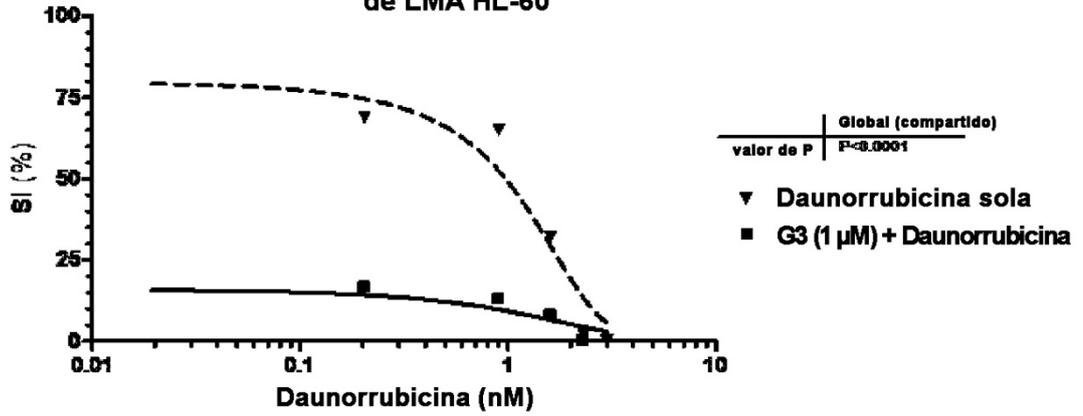
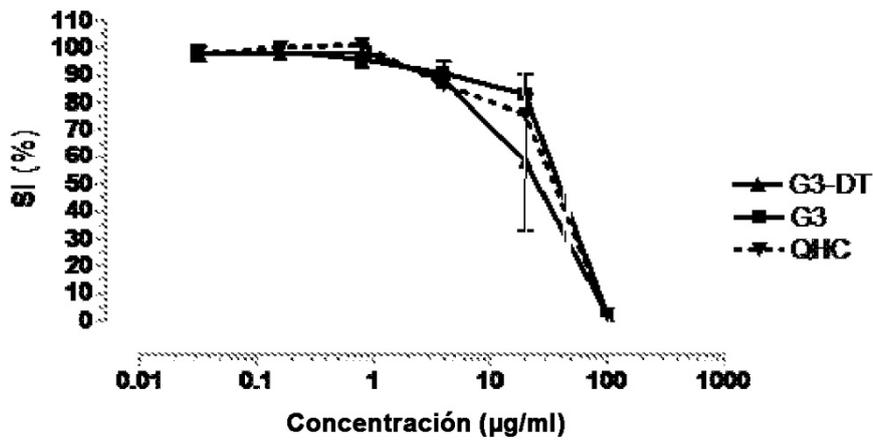


Figura 8.

G3 sobre células de cáncer de próstata PC-3



$IC_{50}$	G3	G3-DT	QHC
	2.750	1.662	3.388

Figura 9.

**Efecto de combinación de G3 y docetaxel sobre células de cáncer de próstata PC-3**

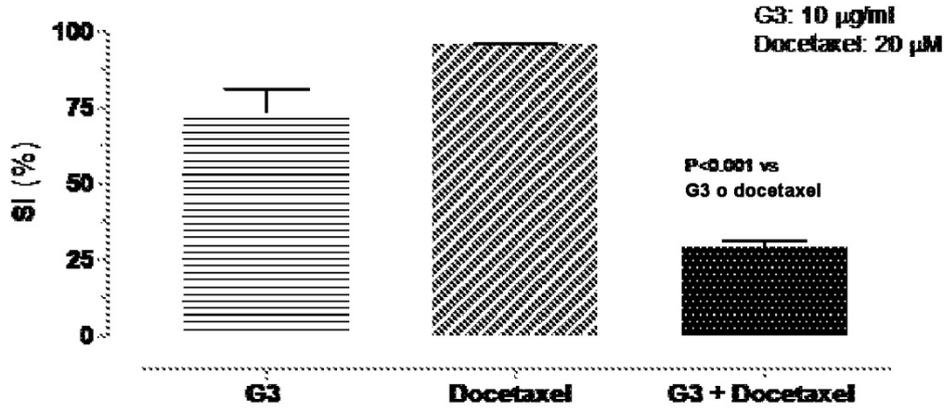


Figura 10.

**Efecto de combinación de G3 y cabazitaxel sobre células de cáncer de próstata PC-3**

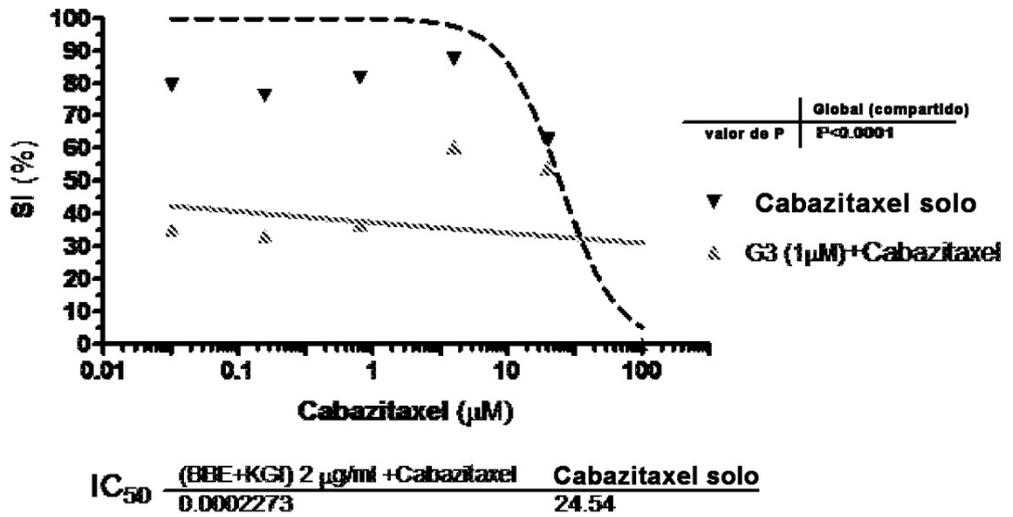


Figura 11.

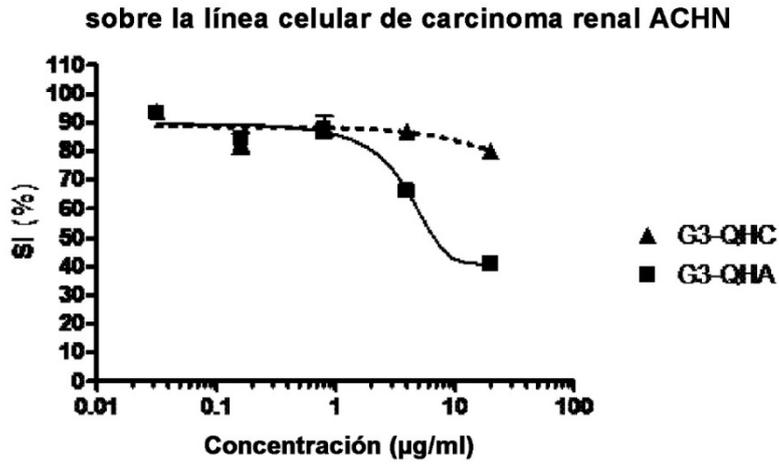
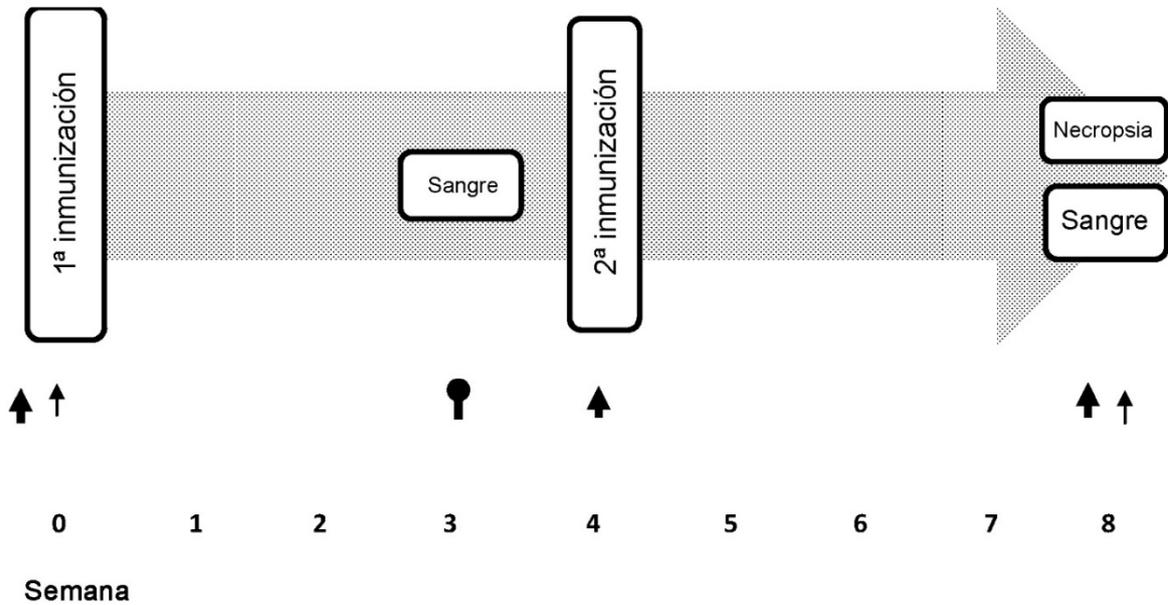


Figura 12.



(se extrajo sangre de control antes de la 1ª inmunización)

Figura 13A

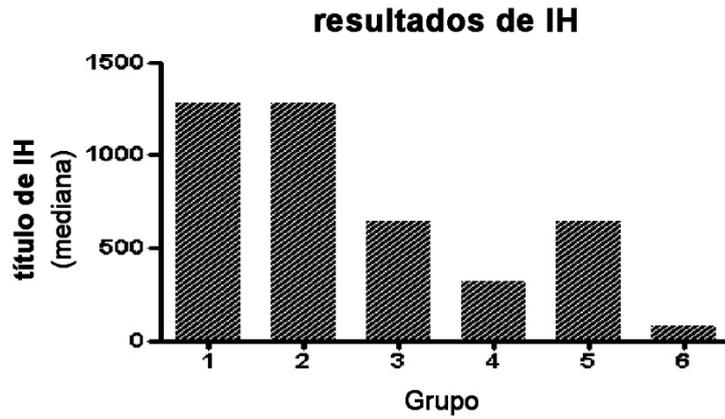


Figura 13B.

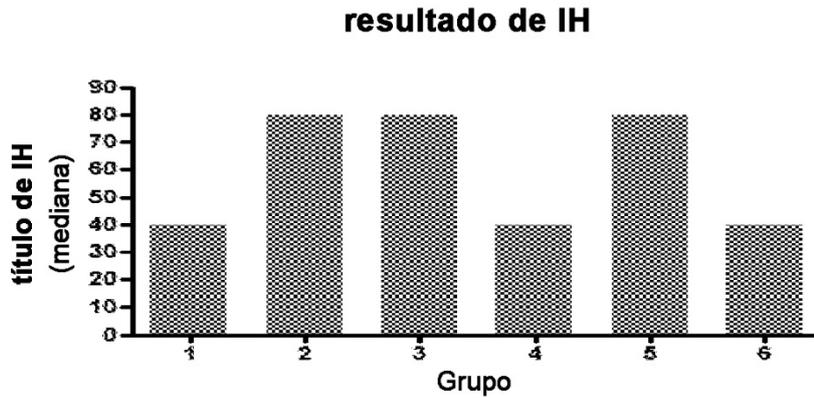


Figura 13C.

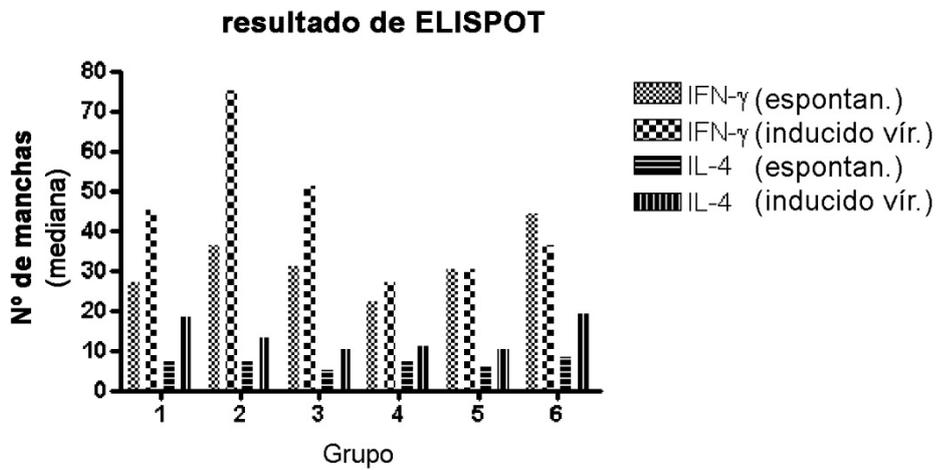


Figura 13D.

### Sobrenadantes sobre células U937-GTB

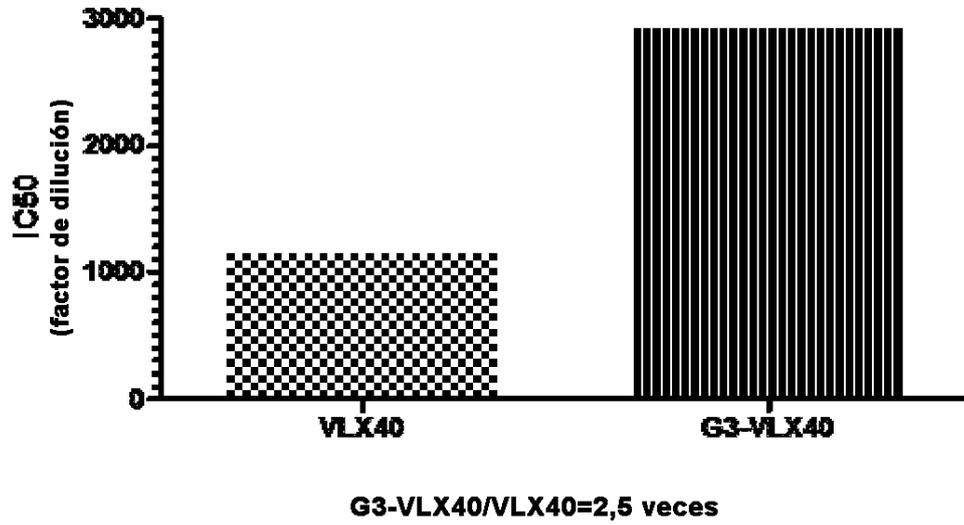


Figura 14A.

### Precipitados de células U937-GTB

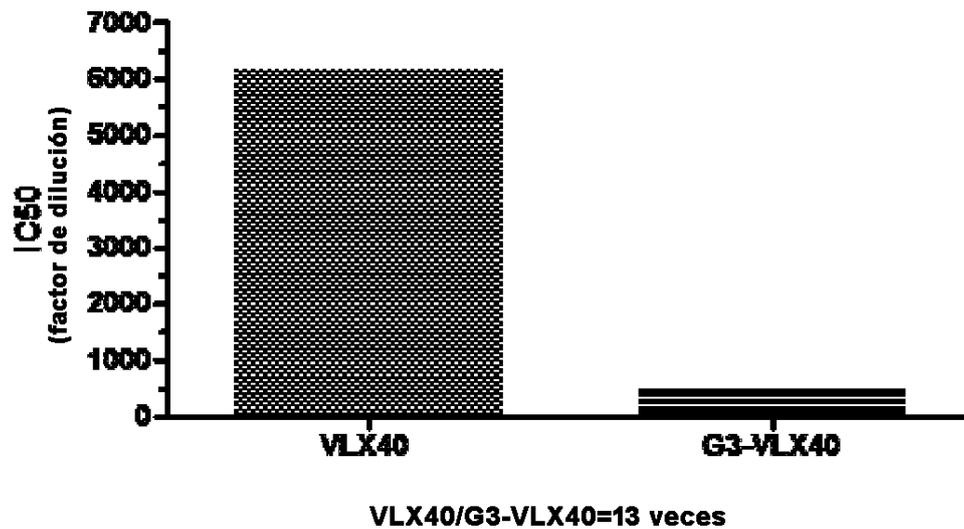


Figura 14B.