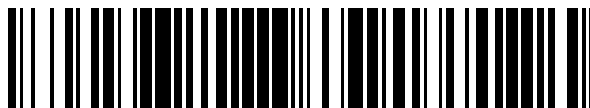


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 360 331**

21 Número de solicitud: 200930901

51 Int. Cl.:  
**C07H 15/256** (2006.01)  
**A61K 31/704** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**A61P 37/00** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **26.10.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **03.06.2011**

Fecha de la concesión: **22.06.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **04.07.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**04.07.2012**

73 Titular/es:  
**UNIVERSIDAD DE CASTILLA LA MANCHA  
EDIFICIO JOSE PRAT, PLAZA DE LA  
UNIVERSIDAD 2  
02071 ALBACETE, ES**

72 Inventor/es:  
**RUBIO MORAGA, ANGELA;  
FERNANDEZ PEREZ, JOSE ANTONIO y  
CASTRO DIAZ, NATHALY**

74 Agente/Representante:  
**Pons Ariño, Ángel**

54 Título: **SAPONINAS TRITERPÉNICAS PROCEDENTES DEL CORMO DE CROCUS SATIVUS COMO  
ADYUVANTE EN FORMULACIONES DE VACUNAS PROTEICAS.**

57 Resumen:

Saponinas triterpénicas procedentes del cormo de Crocus Sativus como adyuvante en formulaciones de vacunas proteicas.

La presente invención se refiere a unas nuevas saponinas triterpénicas procedentes del cormo del azafrán (Crocus sativus L.), a una composición que las comprende, a su uso como sustancias adyuvantes en vacunas proteicas así como en la elaboración de medicamentos, preferiblemente para el tratamiento del cáncer y más preferiblemente para el tratamiento del carcinoma cervical, y a un método de obtención de las mismas. El empleo de estas saponinas triterpénicas como adyuvantes en vacunas deriva en una respuesta inmune incrementada, funcional y duradera frente al antígeno, superior a la de otras sustancias con capacidad inmunopotenciadora tales como las sales de aluminio, IFA (adyuvante incompleto de Freund), CpG (secuencias cortas de DNA bacteriano de citosina, fosfato y guanina) e incluso otras saponinas como QuilA, sin presentar los efectos adversos que habitualmente se observan bajo la administración de estos otros adyuvantes.

ES 2 360 331 B1

## DESCRIPCIÓN

Saponinas triterpénicas procedentes del cormo de *Crocus sativus* como adyuvante en formulaciones de vacunas proteicas.

La presente invención se encuadra en el campo de la inmunología y de la farmacia, y específicamente se refiere a unas nuevas saponinas triterpénicas procedentes del cormo del azafrán (*Crocus sativus* L.), a una composición que las comprende, a su uso como sustancias adyuvantes en vacunas proteicas y a un método de obtención de las mismas. El empleo de estas saponinas triterpénicas como adyuvantes en vacunas deriva en una respuesta inmune incrementada, funcional y duradera frente al antígeno.

**Estado de la técnica anterior**

*Crocus sativus* o azafrán es una planta conocida por sus estigmas desecados ya que éstos constituyen una de las especias más caras del mundo (también conocida como azafrán). A pesar de los muchos estudios científicos que se han realizado con los estigmas, debido a su alto valor agronómico, pocos estudios se han llevado a cabo en otras partes de la planta. Dentro de estos pocos, en el cormo de azafrán (el órgano reproductivo de esta planta) se ha descrito la presencia de una fracción cromatográfica en fase reversa (C4), que además de presentar actividad antitumoral contra varias líneas celulares provoca, como se ha determinado en otros estudios, la activación de macrófagos mediante liberación de óxido nítrico (NO) bajo dosis no tóxicas. En un primer momento, la bioactividad se atribuyó a la presencia de un proteoglicano en esta fracción (Escribano, *et al.*, *Planta Médica*, 2000, 66(2):157-62). Posteriormente, se demostró que esta fracción estaba compuesta por un 5% de proteínas y un 95% de saponinas triterpénicas.

Actualmente, existe en el campo de la inmunología un interés creciente en la búsqueda de nuevas sustancias con actividad adyuvante/inmunopotenciadora. Los adyuvantes son sustancias que, usadas en combinación con el antígeno vacunal, logran superar los niveles de inmunidad alcanzados con el empleo del antígeno solo. Los adyuvantes, por tanto, son sustancias o preparados químicos que, incorporados al antígeno o inyectados simultáneamente con él, hacen más efectiva la respuesta inmune. Por lo que gracias a su empleo se logra una economía de antígeno y de tiempo, así como un mayor nivel de anticuerpos específicos.

Los avances experimentados en la última década en la síntesis de péptidos, la secuenciación de nucleótidos y la ingeniería genética han posibilitado el desarrollo de las denominadas “vacunas de nueva generación”; sin embargo, la aplicación exitosa de estas nuevas vacunas requiere de un esfuerzo de investigación sostenido encaminado a descubrir sustancias con actividad inmunopotenciadora (adyuvantes), eficaces en la estimulación de la respuesta inmune y desprovistas de propiedades biológicas adversas (Grupta, *et al.*, 1993, *Vaccine*, 11:293-306), ya que en la mayoría de los casos su inclusión en la vacuna es indispensable para lograr niveles significativos de respuestas inmunes específicas de antígeno.

Desde el punto de vista de su origen, naturaleza química y actividad biológica específica, los adyuvantes constituyen una familia muy heterogénea de compuestos, a los que se les atribuyen funciones fundamentales:

1. La estimulación de la resistencia no específica del huésped contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y,
2. La potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales y de la respuesta de los animales de laboratorio durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros.

Respecto al mecanismo de acción de estas sustancias, es muy variado, siendo uno de los más importantes el llamado “efecto depot”, por el que los adyuvantes de aluminio, las emulsiones oleosas y los liposomas o microesferas mantienen el antígeno atrapado en el sitio de la administración, impidiendo su liberación masiva y permitiendo un estímulo inmune prolongado.

Las investigaciones realizadas han demostrado que virtualmente todos los adyuvantes activan los macrófagos (Guerrero & Gattas, 1982, *Revista de Microbiología*, 13(2):110-115); que al ser activados estimulan la respuesta inmune por un incremento de la cantidad de antígeno expresado en la membrana celular y de la eficiencia de su presentación a los linfocitos. El macrófago también libera factores solubles estimulantes, que amplifican la proliferación de los linfocitos. Por otro lado, algunos adyuvantes poseen la capacidad de actuar específicamente sobre los linfocitos; pero, en general, éstos funcionan mejor si facilitan la liberación simultánea del antígeno y de sustancias inmunomoduladoras al tejido linfoide.

El número de productos naturales y derivados de la síntesis química con propiedades adyuvantes/inmunopotenciadoras es cada vez mayor. Sin embargo, sigue siendo necesario encontrar una sustancia con una adecuada relación eficiencia/seguridad. Así, aunque se conoce que los adyuvantes completo e incompleto de Freund (FCA y FIA) presentan una marcada toxicidad, han sido utilizados durante más de 50 años y aún son empleados con frecuencia en el campo de la investigación cuando se dispone de cantidades limitadas de antígenos o cuando éstos presentan una reducida inmunogenicidad (US 2003124709 A1). Para las vacunas veterinarias, los adyuvantes más ampliamente utilizados son las emulsiones de aceite mineral (del tipo aceite en agua o agua en aceite) (US 5109026 A), que si bien inducen una fuerte respuesta inmune presentan efectos no deseados, y las sales de aluminio (hidróxido y fosfato de aluminio) (US

2009/0202590 A1). También se emplean liposomas, la toxina colérica, la vitamina E, los complejos inmunoestimulantes (ISCOM<sub>s</sub>), el monofosforil-lípido A derivado de bacterias o las saponinas, como QuilA o QS21, o incluso una combinación de estos dos últimos (US 7147862 B1), así como diferentes emulsiones de aceites de origen vegetal o animal.

Respecto a la selección de adyuvantes para vacunas de uso humano, el criterio más importante es la bioseguridad y, en la práctica, los compuestos de aluminio son los más empleados. Otros compuestos empleados son los polisacáridos naturales y algunos derivados obtenidos por hidrólisis o modificación química, como los glucanos aislados de la pared celular de levaduras, el J-carragenano y el sulfato de dextrano.

Los adyuvantes se pueden clasificar como inmunoestimuladores, los cuales presentan un efecto estimulador directo sobre las células del sistema inmune, o como “vehículos”, si funcionan como portadores que facilitan el transporte y presentación del antígeno al sistema inmune. Adicionalmente, algunos adyuvantes pueden funcionar por una combinación de estos mecanismos. Los adyuvantes específicos se pueden utilizar para conducir una respuesta inmune hacia una característica particular deseada. Teóricamente, se han establecido dos tipos principales de mecanismos inmunes efectores. Uno es una respuesta predominantemente humoral, caracterizada por la generación de citoquinas y anticuerpos de tipo Th2; y el otro es una respuesta inmune predominantemente mediada por células, caracterizada por la generación de citoquinas de tipo Th1 y de células T citotóxicas. Sin embargo, en la práctica lo que se observa generalmente es un equilibrio entre los dos tipos de respuesta, describiéndose cualquier respuesta dada como predominantemente humoral (tipo Th2) o como predominantemente mediada por células (tipo Th1). Así, para cualquier patógeno particular, si se desea que una vacuna induzca una respuesta inmune de tipo Th1 predominantemente, entonces la vacuna debería formularse con un adyuvante conocido que induzca respuestas tipo Th1. Uno de los adyuvantes que se conoce por inducir un equilibrio entre las respuestas inmunes humoral y mediada por células, que puede incluir una potente respuesta mediada por células y también una potente respuesta humoral, son las saponinas procedentes de *Quijalla saponaria*. La fracción QS21, derivada de la mezcla de saponinas QuilA, es la fracción de saponinas de *Q. saponaria* más conocida y ampliamente utilizada como adyuvante en la preparación de vacunas (US 5057540 A).

Se ha demostrado que QS21 induce citoquinas Th1 y anticuerpos de isotipo IgG2a en ratones, lo cual es consistente con una respuesta de tipo Th1. Las saponinas se integran en las membranas celulares a través de su interacción con el colesterol, resultando en la formación de poros por donde el antígeno puede entrar. Posteriormente, los péptidos de esos antígenos pueden ser procesados y presentados vía complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I), estimulando de esta manera una respuesta de linfocitos T CD8+ citotóxicos. QuilA y sus derivados QS21 han sido ampliamente usados en vacunas veterinarias y evaluados en ensayos clínicos. De esta manera, QS21 ha sido incluido como adyuvante en formulaciones contra el HIV en cobayas y humanos, cáncer en humanos, malaria en micos *Aotus* y ratones, virus respiratorio sincitial (*respiratory syncytial virus*), citomegalovirus, *Toxoplasma gondii* y leishmaniasis visceral en perros y ratones. Ensayos clínicos en HIV-1, influenza, herpes y hepatitis B también se han llevado a cabo utilizando QS21. Finalmente, las saponinas de *Q. saponaria* también han sido usadas en formulaciones adyuvantes tales como los complejos inmunoestimuladores o ISCOMs.

Sin embargo, a pesar de su efectiva capacidad adyuvante, el uso de QS21 tiene serias limitaciones debido a sus efectos adversos: dolor severo en el lugar de la inyección, formación de granulomas y toxicidad reflejada en altos niveles de hemólisis de eritrocitos (RBC), principales desventajas que hacen que QS21 aún no pueda ser usado ampliamente y con confianza en el desarrollo de vacunas humanas profilácticas o terapéuticas. Por esta razón es de gran importancia la búsqueda de nuevas saponinas con efectos adyuvantes tan o mayores que los de las saponinas de *Q. saponaria*, pero con reducidos o ningún efecto adverso serio.

### Descripción de la invención

La presente invención proporciona una nueva mezcla de saponinas triterpénicas procedentes del cormo del azafrán (*Crocus sativus* L.), que pueden ser usadas como sustancias adyuvantes en vacunas proteicas, así como un método de obtención de las mismas. El empleo de estas saponinas triterpénicas como adyuvantes en vacunas deriva en una respuesta inmune incrementada, funcional y duradera frente al antígeno.

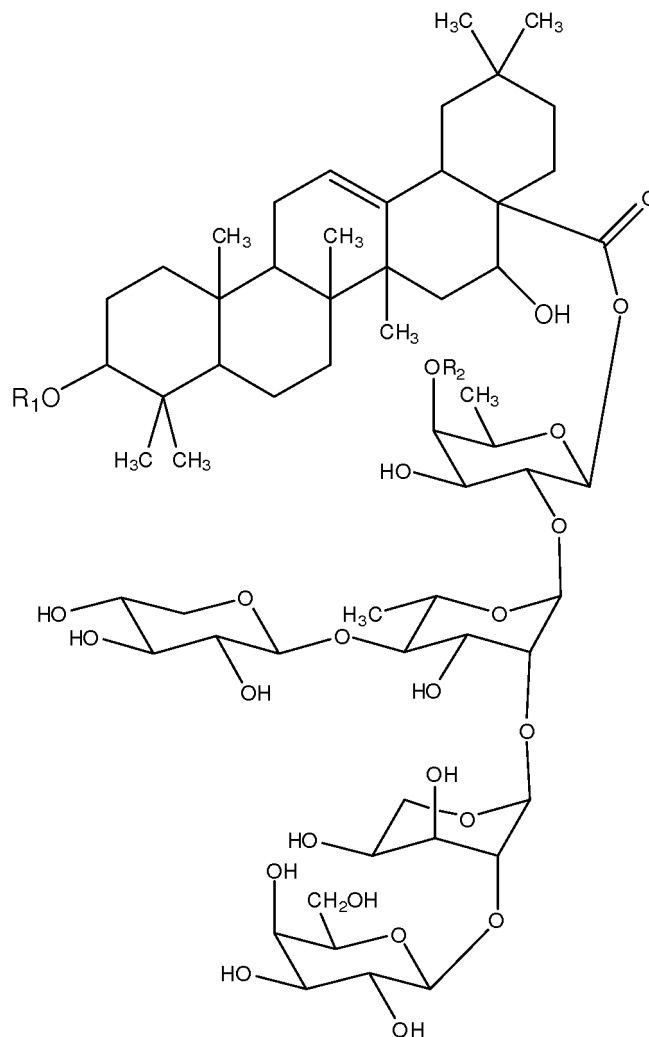
Se ha detectado en la zona externa o epidermis del cormo del azafrán la presencia de una mezcla de diferentes saponinas triterpénicas, denominada CS5. Los inventores han optimizado el proceso de extracción de CS5, de manera que este producto se ha obtenido puro y libre de proteínas. CS5 posee actividad citotóxica frente a células tumorales, presentando una IC<sub>50</sub> de 24 µg/mL, al igual que su fracción cromatográfica mayoritaria, CS5-1, cuya IC<sub>50</sub> es de 9 µg/mL. Esta fracción CS5-1 representa aproximadamente el 70% (m/m) del total de las saponinas de la mezcla CS5 y comprende Azafrina 1 y Azafrina 2.

Por otro lado, cuando CS5 es administrado al organismo junto con un antígeno, se puede observar que esta mezcla de saponinas presenta una actividad adyuvante superior a la de otras sustancias con capacidad inmunopotenciadora tales como las sales de aluminio, IFA (adyuvante incompleto de Freund), CpG (secuencias cortas de DNA bacteriano de citosina, fosfato y guanina) e incluso otras saponinas como QuilA, que se manifiesta a través de un incremento significativo de los niveles de anticuerpos y de linfocitos específicos de antígeno y de la inducción no sólo de la respuesta inmune de tipo Th1, sino también de la de tipo Th2. Además, la administración del adyuvante CS5 no provoca los efectos adversos derivados del empleo de otras saponinas como QuilA, lo que supone que CS5 es inmunoestimulante a dosis que se encuentran dentro del rango de dosis no tóxicas, permitiendo así su uso como adyuvante sin ningún

riesgo de producir la hemólisis que acompaña al empleo de otras saponinas. Este efecto adyuvante de CS5 no se limita exclusivamente a incrementar la respuesta inmune en un corto período de tiempo después de aplicar la vacuna, sino que también posee la capacidad de generar respuestas inmunológicas duraderas que pueden ser re-potenciadas con una futura exposición al antígeno.

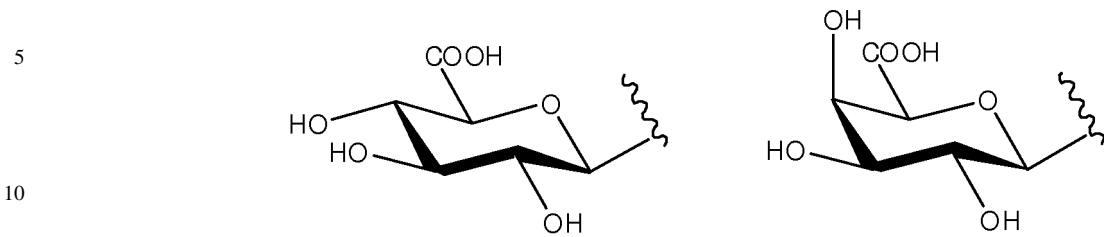
Otra de las ventajas asociadas a CS5, es que su localización tisular posibilita la utilización de cormos en dormancia con pesos menores a 5 gramos, ya que su menor tamaño implica una mayor superficie y por lo tanto un mayor rendimiento para la extracción de las saponinas, los cuales son inviábiles en campo ya que no generan flores y, por lo tanto, no son seleccionados durante el tamizado de los mismos para su venta. Además, la utilización de tierras de secano para la obtención de cormos de pequeño tamaño para la extracción de CS5 podría suponer un empuje en el sector agrícola, ya que debido a las restricciones en el uso del agua se está produciendo un abandono forzado de estas tierras.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a un compuesto, de ahora en adelante “compuesto de la invención”, de fórmula general (I):

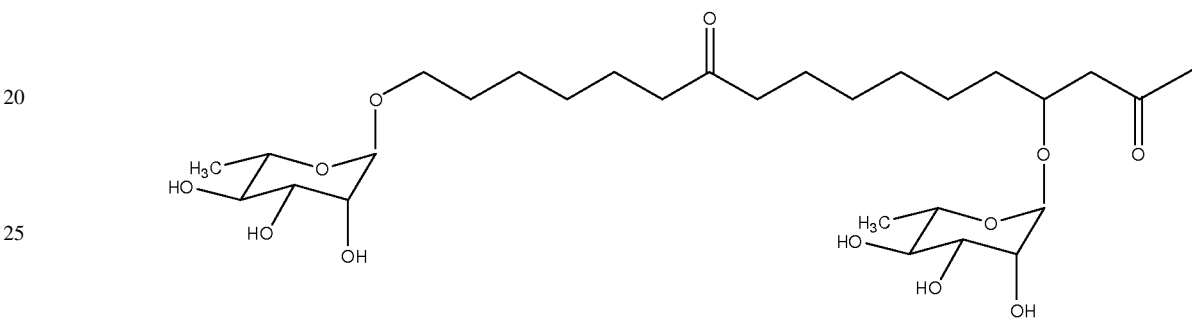


Fórmula (I)

donde R<sub>1</sub> se selecciona de entre los siguientes grupos:



y R<sub>2</sub> representa el siguiente grupo:



o cualquiera de sus isómeros o sus sales.

35 En una realización preferida de este aspecto de la invención, el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido, que corresponde al compuesto de fórmula general (I) cuando la sustitución en R<sub>1</sub> es el primero de los dos grupos que es posible seleccionar para esa posición R<sub>1</sub>. En otra realización preferida, el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido, que corresponde al compuesto de fórmula general (I) cuando la sustitución R<sub>1</sub> es el segundo de los dos grupos que es posible seleccionar para esa posición R<sub>1</sub>.

45 Otro aspecto de la invención se refiere a una composición, de ahora en adelante “composición de la invención”, que comprende un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus isómeros o sus sales. En una realización preferida, el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido. En otra realización preferida, el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido. En una realización más preferida, la composición de la invención comprende los isómeros ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido y ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

60 Preferiblemente, la composición de la invención comprende la fracción CS5-1, y más preferiblemente la composición de la invención comprende la fracción CS5. La fracción CS5 comprende, a su vez, derivados de los dos isómeros del compuesto de la invención y la fracción CS5-1, y esta última comprende ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido y ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido. La fracción CS5 puede obtenerse por el primer método de la invención que se explicará más adelante en la presente descripción.

En la presente descripción se hará referencia al isómero de fórmula química: ácido 3-*O*- $\beta$ -D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[4-*O*-di- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]- $\beta$ -D-fucopiranosido como “Azafrina 1” y al isómero de fórmula química: ácido 3-*O*- $\beta$ -D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[4-*O*-di- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]- $\beta$ -D-fucopiranosido como “Azafrina 2”. Estas dos saponinas bidesmosídicas son isómeros derivados del ácido equinocístico, cuya única diferencia es la presencia del ácido glucurónico o galacturónico en posición C3 del aglicón.

La caracterización de estos dos isómeros se puede llevar a cabo por la separación de ambos a partir de la composición de la invención, preferiblemente CS5-1 purificada a partir de CS5, mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, cromatografía en capa fina o TLC y posterior análisis estructural mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, la combinación de espectrometría de masas (GC-EI-MS, MALDI-TOF y ESI-MS) y espectroscopía de resonancia molecular (RMN incluyendo, pero sin limitarnos,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, ROESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, gHSQC TOCSY, DEPT y HMBC). Los datos espectrales de RMN de ambas saponinas, Azafrina 1 y Azafrina 2, son los que se recogen en las tablas 1, 2 y 3 de los ejemplos de la presente invención.

La Azafrina 1 es un sólido amorfo de color blanco, cuyo punto de ablandamiento es 70-75°C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -62.5 (*c* 0.016, piridina); TLC  $R_f$  = 0.80; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1965.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (MW 1942 Da); Modo positivo ESI-MS  $m/z$  1966.7  $[\text{C}_{92}\text{H}_{198}\text{O}_{40}+\text{Na}]^+$ ;  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (piridina-*d*<sub>5</sub>, 500 MHz/125 MHz) (Tablas 1 a 3 de los ejemplos).

La Azafrina 2 es un sólido amorfo de color blanco, cuyo punto de ablandamiento es 130-145°C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$  -12.9 (*c* 0.031, piridina); TLC  $R_f$  = 0.71; MALDI-TOF-MS  $m/z$  1965.5  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (MW 1942 Da); Modo positivo ESI-MS ( $m/z$ ): 1966.7  $[\text{C}_{92}\text{H}_{198}\text{O}_{40}+\text{Na}]^+$ .  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  NMR (piridina-*d*<sub>5</sub>, 500 MHz/125 MHz) (Tablas 1 a 3 de los ejemplos).

Así, la composición de la invención es, preferiblemente, una mezcla de diferentes saponinas triterpénicas derivadas principalmente del ácido equinocístico y minoritariamente del ácido oleanólico. Preferiblemente, la composición de la invención comprende CS5-1 y más preferiblemente comprende CS5. El análisis estructural de CS5 se podría llevar a cabo, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante HPLC-ESI-MS, análisis de azúcares por metanólisis y butanólisis por GC-MS y mediante hidrólisis ácida de las saponinas y purificación de los aglicones que a su vez pueden ser analizados, por ejemplo, pero sin limitarnos, por RMN (Resonancia Magnética Nuclear) mediante diferentes técnicas espectrales: 1D  $^1\text{H}$ , TOCSY, ROESY, DEPC, HSQC o HMBC. La fracción mayoritaria de CS5 es la denominada CS5-1, de la que se pueden extraer la Azafrina 1 y la Azafrina 2 una vez que ésta es purificada a partir de CS5 mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, un gradiente isocrático con acetonitrilo, preferiblemente, al 40% de acetonitrilo y más preferiblemente, al 40% de acetonitrilo con un 0,05% de ácido trifluoroacético.

El compuesto y la composición de la invención son útiles en la estimulación de la respuesta inmune del organismo frente a un antígeno cuando son administradas junto con el mismo, por lo que pueden ser aplicables en tratamientos de inmunización frente a patógenos. El compuesto y la composición de la invención presentan también actividad citotóxica frente a células tumorales, incluyendo, aunque sin limitarnos, células HeLa, línea celular procedente de un carcinoma cervical frecuentemente empleada en el ámbito biomédico para ensayos de citotoxicidad en cáncer. Ya que el compuesto y la composición de la invención presentan un efecto inhibitor de la proliferación en células tumorales HeLa, éstos pueden presentar asimismo efectos citotóxicos similares en la proliferación de células derivadas de otros tipos de cáncer.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, al compuesto de la invención para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer o, alternativamente, al compuesto de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En una realización preferida, el cáncer es carcinoma cervical. Otro aspecto de la invención se refiere al uso del compuesto de la invención como adyuvante para una vacuna.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento o, alternativamente, a la composición de la invención para su uso como medicamento. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer o, alternativamente, a la composición de la invención para su uso en el tratamiento del cáncer. En una realización preferida de este aspecto de la invención, el cáncer es carcinoma cervical. Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición de la invención como adyuvante para una vacuna.

Tal y como se emplea en la presente descripción, el término “adyuvante” se refiere a cualquier sustancia con actividad inmunopotenciadora cuya finalidad es la de incrementar la efectividad de la respuesta inmune. Un adyuvante inmunológico es cualquier sustancia o preparado químico que, incorporado al antígeno o inyectado simultáneamente con él, hace más efectiva la respuesta inmune.

Se define “medicamento” como cualquier sustancia usada para la prevención, el diagnóstico, el alivio, el tratamiento o la curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención se refiere a una preparación que comprenda, al menos, el compuesto de la invención o la composición de la invención, que

preferiblemente comprende Azafrina 1 o Azafrina 2 y más preferiblemente Azafrina 1 y Azafrina 2. Preferiblemente, la composición de la invención comprende CS5-1 y más preferiblemente CS5.

5 El medicamento comprende, al menos, el compuesto de la invención o la composición de la invención. El compuesto o la composición de la presente invención se formulan en una composición farmacéutica apropiada, en la cantidad terapéuticamente efectiva, preferiblemente junto con uno o más vehículos, adyuvantes o excipientes farmacéuticamente aceptables. El medicamento es útil para el tratamiento del cáncer, preferiblemente, carcinoma cervical y/o para la prevención de enfermedades infecciosas.

10 El término “tratamiento”, tal como se entiende en la presente invención, supone combatir los efectos causados como consecuencia del cáncer, preferiblemente, del carcinoma cervical, para estabilizar el estado de los individuos o prevenir daños posteriores. El término “prevención”, tal como se entiende en la presente invención, consiste en evitar la aparición de daños cuya causa sea la exposición a cualquier antígeno capaz de desencadenar una respuesta inmunológica en el cuerpo humano o animal, o bien cualquier tipo de cáncer, preferiblemente carcinoma cervical.

15 Se entiende por “cáncer” el conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas (células cancerígenas o cancerosas), con crecimiento descontrolado y división más allá de los límites normales, que en estadios avanzados conduce a la invasión del tejido circundante y, finalmente, a metástasis. Comprende cualquier enfermedad de un órgano o tejido en un mamífero, preferiblemente el hombre, caracterizada por una multiplicación pobremente controlada, o descontrolada, de células normales o anormales en dicho tejido, y su efecto en la totalidad del cuerpo. El término cáncer, dentro de esta definición, incluye las neoplasias benignas, malignas, displasias, hiperplasias, así como neoplasias que muestran metástasis, o cualquier otra transformación como por ejemplo, leucoplasias que a menudo preceden al brote del cáncer. Las células y los tejidos son cancerosos cuando crecen y se replican más rápidamente de lo normal, desplazándose o dispersándose en el tejido sano circundante o en cualquier otro tejido del cuerpo, lo que se conoce como metástasis, asume formas y tamaños anormales, muestra cambios en su ratio nucleocitoplasmático, policromasia nuclear, y finalmente cesa. Células y tejidos cancerosos pueden afectar al cuerpo como un todo causando síndromes paraneoplásicos, o puede ocurrir en un órgano o tejido vital, siendo interrumpida o dañada su función normal, con posibles resultados fatales. El resultado final de la evolución de un cáncer que involucra a un órgano vital, ya sea primario o metastático, es la muerte del mamífero afectado. Generalmente se dice que el cáncer se encuentra en uno de tres estados de crecimiento: temprano o localizado, cuando el tumor aún se encuentra confinado en el tejido de origen, o en su localización primaria; extensión directa, cuando las células cancerígenas del tumor han invadido el tejido adyacente o se ha extendido únicamente a los nódulos linfáticos regionales; o metástasis, cuando las células cancerosas han migrado a partes distantes del cuerpo desde la localización primaria, por medio del sistema circulatorio o linfático, y se ha establecido en localizaciones secundarias.

35 Se dice que un cáncer es maligno por su tendencia a causar la muerte si no es tratado. Los tumores benignos usualmente no causan la muerte, aunque pueden hacerlo si interfieren con la función normal del cuerpo por sus características o localización, tamaño o efectos paraneoplásicos. En general, las células cancerosas se dividen a una tasa mayor que las células normales, pero la distinción entre el crecimiento de los tejidos cancerosos y normales no es tanto que la división celular sea mucho más rápida, como la pérdida parcial o completa de la capacidad de detención de su crecimiento y diferenciación en un tejido útil y limitado, del tipo que caracteriza el equilibrio funcional de crecimiento del tejido normal.

45 El término “cáncer” en esta descripción, no se limita simplemente a neoplasias benignas, sino que comprende también otras neoplasias benignas o malignas como: 1) carcinoma, 2) sarcoma, 3) carcinosarcoma, 4) cánceres de los tejidos formadores de sangre, 5) tumores de tejidos nerviosos, incluyendo el cerebro, 6) cáncer de células de la piel. Algunos tipos de cáncer son, por ejemplo pero sin limitarnos, cáncer de mama, de próstata, de colon y recto, de pulmón, linfoma no Hodgkin, melanoma, de riñón (células renales), de estómago, de hígado, de páncreas, óseo, de timo, de endometrio o uterino o de cuello del útero. El “carcinoma cervical” o “cáncer de cuello de útero” o “cáncer de cérvix” es un tipo de cáncer que se forma en los tejidos del cérvix o cuello del útero. Por lo general, es un cáncer que crece lentamente, que puede no presentar síntomas, pero que puede detectarse por medio de pruebas de citología regulares (mediante el raspado de células del cérvix y posterior examen al microscopio).

55 El compuesto y la composición de la invención son útiles como adyuvantes en vacunas, debido a que tras ser administrados junto con el antígeno contra el que se pretende inmunizar al organismo, son capaces de provocar una respuesta inmune superior a la conseguida tras la administración del antígeno solo o junto con los otros adyuvantes conocidos en el estado de la técnica ensayados en la invención.

60 Tal y como aparece en la presente descripción, el término “vacuna” se refiere a un preparado que comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de uno o más antígenos que, una vez dentro del organismo, provoca una respuesta inmune. Esta respuesta inmune genera una memoria inmunológica. Se incluyen dentro de esta definición tanto las vacunas preparadas con toxoides, como las preparadas con antígenos vivos atenuados o con antígenos muertos o inactivos. Preferiblemente, las formulaciones de la vacuna contienen un antígeno o composición antigénica capaz de generar una respuesta inmune frente a un patógeno humano. Tales antígenos o composiciones antigénicas derivan preferiblemente de: VIH-1 (tal como tat, nef, gp120 o gp160), del virus del herpes humano, tal como gD o derivados del mismo o de la proteína Inmediata Temprana tal como ICP27 de VSH1 o VSH2, del citomegalovirus (tales como gB o derivados del mismo), del Rotavirus (que incluyen virus vivos atenuados), del virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados del mismo), del Virus de Varicella Zoster (tal como gpI, II y IE63), del virus de la hepatitis tal como virus de

la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de Superficie de la Hepatitis B o un derivado del mismo), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis C y virus de la hepatitis E, o de otros patógenos virales, tales como paramixovirus: virus Respiratorio Sincitial (tal como las proteínas F y G o derivados de las mismas), virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18,...), flavivirus (por ejemplo, Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, virus de la encefalitis Tick-borne, Virus de la Encefalitis Japonesa) o virus de la gripe, o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria* spp., que incluye *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo, polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *Streptococcus* spp., que incluye *S. pneumoniae* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, PsaA, PspA, estreptolisina, proteínas de unión a colina), *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *Haemophilus* spp., que incluye *H. influenzae* type B (por ejemplo PRP y conjugados del mismo), *H. influenza* no clasificable (por ejemplo, OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, lipoproteína D), *H. ducreyi*; *Moraxella* spp., que incluye *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo, adhesinas e invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella* spp., que incluye *B. pertussis* (por ejemplo, pertactina, toxina pertussis o derivados de la misma, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclasa, fimbriae), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., que incluye *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp., que incluye *L. pneumophila*; *Escherichia* spp., que incluye *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatógena (por ejemplo toxina similar a la toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio* spp., que incluye *V. cholera* (por ejemplo toxina colérica o derivados de la misma); *Shigella* spp., que incluye *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp., que incluye *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp., que incluye *C. jejuni* (por ejemplo toxinas, adhesinas e invasinas), y *C. coli*; *Salmonella* spp, que incluye *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., que incluye *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp, que incluye *H. pylori* (por ejemplo ureasa, catalasa, toxina de vacuolación); *Pseudomonas* spp que incluye *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp, que incluye *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., que incluye *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., que incluye *C. tetani* (por ejemplo toxina tetánica y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo toxinas de clostridium A y B y derivados de la misma); *Bacillus* spp., que incluye *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium* spp., que incluye *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina diftérica y derivados de la misma); *Borrelia* spp., que incluye *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., que incluye *E. equi* y el agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia* spp., que incluye *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., que incluye *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Lep-tospira* spp., que incluye *L. interrogans*; *Treponema* spp., que incluye *T. pallidum* (por ejemplo, proteínas raras de la membrana externa), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; o derivados de parásitos tales como *Plasmodium* spp., que incluye *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., que incluye *T. gondii* (por ejemplo, SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., que incluye *E. histolytica*; *Babesia* spp., que incluye *B. microti*; *Trypanosoma* spp., que incluye *T. cruzi*; *Giardia* spp., que incluye *G. lamblia*; *Leshmania* spp., que incluye *L. major*; *Pneumocystis* spp., que incluye *P. carinii*; *Trichomonas* spp., que incluye *T. vaginalis*; *Schistosoma* spp., que incluye *S. mansoni*, o derivados de levaduras tales como *Candida* spp., que incluye *C. albicans*; o *Cryptococcus* spp., que incluye *C. neoformans*.

Los derivados del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B se conocen bien en la técnica e incluyen entre otros, los antígenos establecidos PreS1 o PreS2.

La vacuna puede comprender, además, antígenos derivados de parásitos que causan la malaria. Por ejemplo, los antígenos de *Plasmodium falciparum* incluyen RTS, S y TRAP. Otros antígenos de plasmodia que son candidatos para ser componentes de una vacuna en múltiples etapas contra la malaria son los antígenos de *P. falciparum*: MSP1, AMA1, MSP3, EBA, GLURP, RAP1, RAP2, Secuestrina, PfEMP1, Pf332, LSA1, LSA3, STARP, SALSA, PfEXP1, Pfs25, Pfs28, PFS27/25, Pfs16, Pfs48/45, Pfs230 o sus análogos en *Plasmodium* spp.

Las formulaciones de la vacuna pueden contener, también, un antígeno antitumoral y ser útiles para el tratamiento inmunoterapéutico de cánceres. Ejemplos de estos antígenos incluyen MAGE1 y MAGE3 u otros antígenos MAGE para el tratamiento del melanoma, PRAME, BAGE o GAGE. Otros antígenos específicos de tumor que son adecuados para su utilización junto con el adyuvante de la presente invención incluyen, pero no se restringen a: antígeno específico del cáncer de próstata (PSA) o Her2/neu, KSA (GA377), MUC-1 o antígeno carcinoembrionario (CEA).

La vacuna se puede utilizar también para la profilaxis o terapia de alergia. Tales vacunas podrían comprender antígenos específicos del alérgeno (por ejemplo Der p1) y antígenos no específicos de un alérgeno (por ejemplo el decapéptido de Stanworth).

La cantidad de proteína en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que es inmunogénicamente efectiva sin los efectos colaterales adversos significativos en vacunaciones típicas. Tal cantidad variará dependiendo del antígeno o inmunógeno específico que se utilice y de cómo se presente. La cantidad óptima de una vacuna particular se determinará mediante estudios estándar que implican la observación de las apropiadas respuestas inmunes en individuos. Después de la vacunación inicial, los individuos pueden recibir una o varias inmunizaciones de recuerdo espaciadas adecuadamente.

Las formulaciones de la vacuna se pueden utilizar tanto para propósitos profilácticos como terapéuticos.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica, de ahora en adelante “composición farmacéutica de la invención”, que comprende al menos el compuesto de la invención. Otro aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido y ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido. En una realización preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización más preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende otro principio activo. En una realización aún más preferida, la composición farmacéutica de la invención además comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de un antígeno.

Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o que afecta a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.

Los “vehículos farmacéuticamente aceptables” se refieren a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluyen, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos. Los vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en la presente invención son los vehículos conocidos en el estado de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención pueden utilizarse en un método de tratamiento o de prevención de forma aislada o conjuntamente con otros compuestos farmacéuticos destinados al tratamiento o prevención de enfermedades infecciosas o de cáncer, preferiblemente, carcinoma cervical.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden formularse para su administración en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, parenteral, intraperitoneal, intravenosa, intradérmica, epidural, intraespinal, intraestromal, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intralesional, intraarterial, intracardiaca, intramuscular, intracraneal, subcutánea, intraorbital, intracapsular o intratumoral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a la cantidad del compuesto o de la composición de la invención que produzca el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de dicho compuesto o composición y el efecto terapéutico a conseguir. Se contempla que las composiciones de la presente invención puedan ser composiciones farmacéuticas, que comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva del antígeno, junto con una cantidad terapéuticamente efectiva del compuesto de la invención o de la composición de la invención.

En la presente descripción se entiende por “cantidad inmunogénicamente efectiva” aquella cantidad de antígeno o de composición antigénica o de adyuvante (compuesto o composición de la invención) que produzca una respuesta inmune capaz de proteger al organismo frente a la enfermedad provocada por el patógeno que contiene dicho antígeno. La respuesta inmune de un organismo a un antígeno o a una composición antigénica puede ser evaluada mediante la cuantificación del nivel de anticuerpos específicos de antígeno presentes en el organismo tras la administración del adyuvante junto con el antígeno o la composición antigénica, lo cual se podría realizar, por ejemplo, pero sin limitarnos, mediante inmunoensayos tipo ELISA; y/o mediante la medida del nivel de linfocitos T, incluyendo, pero sin limitarnos, los linfocitos T cooperadores o “helper” o CD4+, citotóxicos o CD8+, de memoria, reguladores o “natural killer”, lo cual podría llevarse a cabo mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, técnicas de inmunofluorescencia, y la posterior comparación de los niveles obtenidos con unos valores “control” correspondientes a un organismo en el que no se ha llevado a cabo dicha inmunización mediante la inoculación del antígeno.

La composición de la invención, que preferiblemente comprende Azafrina 1 o Azafrina 2 y más preferiblemente Azafrina 1 y Azafrina 2, se encuentra en una concentración de entre 0,5 y 21 μg, más preferiblemente de entre 0,5 y 6 μg y aún más preferiblemente de entre 4 y 6 μg, cantidades inmunogénicamente efectivas a las que se ha demostrado una inducción significativa de la respuesta inmune en respuesta al antígeno.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención de una composición que comprende Azafrina 1 y Azafrina 2, de ahora en adelante “primer método de la invención”, que comprende:

- a. separar la epidermis del corno de *Crocus Sativus*,

- b. liofilizar la epidermis obtenida en el paso (a),
- c. extraer las saponinas de la epidermis del paso (b) mediante isopropanol:agua 1:1,
- 5 d. concentrar el producto obtenido en el paso (c) mediante vacío, hasta obtener un producto oleoso y resuspenderlo en metanol hasta obtener una proporción producto oleoso:metanol 7:3,
- e. precipitar la suspensión obtenida en el paso (d) con acetona,
- 10 f. repetir los pasos (d) y (e) tres veces más, y
- g. fraccionar el precipitado obtenido en el paso (f) mediante cromatografía.

15 En una realización preferida de este aspecto de la invención, la cromatografía del paso (g) se realiza mediante una primera elución isocrática seguida de un gradiente de acetonitrilo. En una realización más preferida, la cromatografía del paso (g) se realiza mediante una primera elución isocrática seguida de un gradiente de acetonitrilo y una segunda elución en gradiente. En una realización aún más preferida, la cromatografía del paso (g) consiste en una cromatografía semipreparativa en fase reversa HPLC en columna C18.

20 Se entiende por “cormo” el órgano reproductivo del azafrán o *Crocus Sativus* cuya “epidermis” está localizada en la zona externa del mismo, la cual se puede separar de la zona interna o parénquima mediante disección. “*Crocus Sativus*” o “azafrán” es una planta perteneciente al género *Crocus* dentro la familia Iridaceae que se caracteriza por tener una flor color lila donde destacan el color rojo de los estigmas y el amarillo de los estambres. Como se muestra  
25 en los ejemplos de la presente invención, la composición de la invención se ha detectado únicamente en la zona externa (epidermis) del cormo de azafrán, determinándose que podría estar presente en un 0,5% (m/m).

Una vez separada la epidermis del cormo se procede a su liofilización en el paso (b) del primer método de la invención. Se entiende por “liofilizar” separar el agua de una sustancia, o de una disolución, mediante congelación y posterior sublimación a presión reducida del hielo formado, para dar lugar a un material esponjoso que se disuelve  
30 posteriormente con facilidad. Se utiliza en la deshidratación de los alimentos, materiales biológicos y otros productos sensibles al calor.

El término “saponinas” hace referencia a los glucósidos de esteroides o de triterpenoides, llamadas así por sus propiedades similares a las del jabón: cada molécula está constituida por un elemento soluble en lípidos (el esteroide o el triterpenoide) y un elemento soluble en agua (el azúcar), y forman una espuma cuando son agitadas en agua. Los inventores de la presente invención han descubierto que las saponinas de azafrán son poco solubles  
35 en los solventes característicos de la mayoría de los procesos de purificación de las saponinas (H<sub>2</sub>O, MeOH y n-butanol), y extremadamente solubles en isopropanol:agua 1:1 (isopropanol 50%). Por ello, la extracción de las saponinas del paso (c) del primer método de la invención, aunque podría realizarse mediante, por ejemplo, pero sin limitarnos, acetonitrilo:agua (1:1), se realiza, preferiblemente, tres veces durante 2 horas con 2-propanol al 50%. El producto obtenido se concentra en el primer método de la invención mediante un protocolo de precipitaciones y lavados que comprende los pasos (d) a (f) y que, preferiblemente, sigue los siguientes pasos: en el paso (d) se concentra el extracto obtenido en el paso (c) mediante vacío, lo cual puede realizarse preferiblemente, aunque sin  
40 limitarnos, mediante un rotavapor, más preferiblemente a 45°C, hasta obtener un residuo oleoso que se resuspende en metanol (MeOH) hasta obtener una disolución final del 30% (v/v), a continuación, en el paso (e) se precipita con acetona 1:1 dicha suspensión mediante centrifugación a, preferiblemente, 8.000 rpm durante 20 minutos. Posteriormente, este proceso de resuspensión y precipitado con MeOH y acetona se repite tres veces más en el paso (f) del primer método de la invención. Así se obtiene un producto amarillento que se disuelve en acetonitrilo al 50% (v/v).  
50

El producto obtenido en el paso (f) del primer método de la invención se fracciona mediante cromatografía en el paso (g). La “cromatografía” consiste en un método de separación para la caracterización de mezclas complejas. Es un conjunto de técnicas basadas en el principio de retención selectiva, cuyo objetivo es separar los distintos componentes de una mezcla, permitiendo identificar y determinar las cantidades de dichos componentes. Las técnicas cromatográficas son muy variadas, pero en todas ellas hay una fase móvil que consiste en un fluido (gas, líquido o fluido supercrítico) que arrastra a la muestra a través de una fase estacionaria que se trata de un sólido o un líquido fijado en un sólido. Los componentes de la mezcla interaccionan en distinta forma con la fase estacionaria. De este modo, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades y se van separando. Después de que los componentes hayan pasado por la fase estacionaria, separándose, pasan por un detector que genera una señal que puede depender de la concentración y del tipo de compuesto. Ejemplos de cromatografía son, sin limitarnos, cromatografía en papel, de gases, en capa fina, líquida en fase reversa, líquida en fase normal, líquida de intercambio iónico, líquida de exclusión, líquida de adsorción o de fluidos supercríticos.  
60

La “cromatografía en fase reversa” o de “interacción hidrofóbica (HIC)” es una técnica que permite separar moléculas en base a su polaridad. En este tipo de cromatografía la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos, lo que convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares,  
65

tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos. En general, esta técnica se ha empleado para substituyentes y matrices compatibles con fluidos biológicos. Por tanto, el termino HIC es común cuando se habla de purificación de proteínas y carbohidratos. La cromatografía en fase reversa se puede llevar a cabo por técnicas conocidas mediante el empleo de columnas de afinidad. Un ejemplo de cromatografía en fase reversa es, pero sin limitarnos, el sistema de alto desempeño (HPLC o “High Performance Liquid Chromatography”), un tipo de cromatografía en columna utilizada frecuentemente en bioquímica y química analítica, también denominada “Cromatografía líquida de alta presión” o *High pressure liquid chromatography* (HPLC). El HPLC es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla basándose en diferentes tipos de interacciones químicas entre las sustancias analizadas y la columna cromatográfica. Esta técnica utiliza una alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación. El cromatograma obtenido proporciona un perfil de picos correspondientes a las diferentes moléculas, relacionados según su tiempo de retención con los estándares, lo que permite identificar las moléculas presentes en la mezcla.

En la presente invención, la cromatografía del paso (g) consiste, preferiblemente, en una cromatografía en fase reversa HPLC, más preferiblemente, la cromatografía del paso (g) se realiza mediante HPLC en una columna C18 (9,5 x 250 mm) llevando a cabo un primer paso de elución isocrática (utilización de una fase móvil de composición constante), preferiblemente seguida de un gradiente de acetonitrilo como solvente y un segundo paso de elución en gradiente, utilizando, preferiblemente, aunque sin limitarnos, el método de análisis especificado en la tabla 4 de los ejemplos de la presente invención, usando como patrón preferiblemente la fracción CF. Se entiende por “C18”, la resina (en columna) más comúnmente empleada para saponinas que posee una cadena lineal de 18 carbonos.

Como fase móvil en la cromatografía se puede utilizar un solo disolvente, “elución isocrática”, que en caso de la invención es acetonitrilo preferiblemente al 10%, o dos o más disolventes de diferente polaridad cuya relación cambia a lo largo de la elución cromatográfica, “elución en gradiente”, que mejoran la eficacia. En este último caso, la mezcla de disolventes puede ser muy variada. Los equipos adecuados para llevar a cabo estas técnicas constan de dispositivos que introducen los disolventes de dos o más recipientes en una cámara de mezcla a distintas velocidades, con ello se alcanza la relación más idónea de los mismos.

El procedimiento a seguir en la cromatografía para purificar la composición de la invención, es preferiblemente el que se recoge en la tabla 5 de los ejemplos de la presente invención.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método de obtención del compuesto de la invención, de ahora en adelante “segundo método de la invención”, que comprende todos los pasos del primer método de la invención y además:

- h. separar el producto obtenido en el paso (g) mediante cromatografía en capa fina.

Se entiende por “cromatografía en capa fina” o “TLC” (*Thin-Layer Chromatography*), la técnica cromatográfica utilizada, entre otros posibles usos, para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla. Es una técnica basada en la preparación de una capa, uniforme, de un adsorbente mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte. Los requisitos esenciales son, pues, un adsorbente, placas de vidrio u otro tipo de soporte, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. Es preciso también poder guardar con facilidad las placas preparadas y una estufa para activarlas. La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. El proceso de siembra se realiza tocando con la punta del capilar (micropipeta, jeringuilla, etc.) sobre la placa preparada. La elección del eluyente dependerá lógicamente del componente que se va a separar y del material en que la separación se lleva a cabo. Ejemplos de eluyentes válidos para su uso en esta técnica son, aunque sin limitarnos, éter de petróleo, éter dietílico, ciclohexano, acetato de etilo, tetracloruro de carbono, piridina, benceno, etanol, cloroformo, metanol, diclorometano, agua o ácido acético.

Las concentraciones de cualquiera de los compuestos empleados en cualquiera de los pasos de los dos métodos de la invención deben aproximarse a las especificadas en la presente descripción, no obstante, los errores de medida en la práctica justificarían que un experto en la materia las modificase para llevar a cabo dichos métodos, siempre que el producto obtenido, es decir, la composición y el compuesto de la invención, presentasen las mismas propiedades estructurales y funcionales (adyuvantes y citotóxicos) que en la presente invención.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra “comprende” y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## Descripción de las figuras

Fig. 1. Muestra la localización de CS5 en la zona externa (epidermis) del cormo del azafrán, extracción mediante cromatografía en fase reversa C18 y análisis por HPLC.

Fig. 2. Representa el esquema del proceso de purificación de CS5, donde sólo aparece un paso cromatográfico.

Fig. 3. Muestra el efecto de CS5 sobre la respuesta específica de anticuerpos anti-OVA.

Fig. 4. Muestra el efecto de CS5 sobre la respuesta inmune específica primaria de: A) linfocitos T CD4+ OVA-específicos y B) linfocitos T CD8+ OVA-específicos. C) Efecto de CS5 sobre la respuesta inmune específica secundaria de linfocitos T CD4+ péptido-específicos.

## Ejemplos

A continuación se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que ponen de manifiesto la efectividad de la nueva mezcla de saponinas triterpénicas, CS5, como adyuvante útil en formulaciones de vacunas. Estos ejemplos específicos que se proporcionan sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención y se incluyen solamente con fines ilustrativos, por lo que no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que aquí se reivindica. Por tanto, los ejemplos descritos más adelante ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

### Ejemplo 1

Extracción de la mezcla de saponinas triterpénicas CS5 a partir del cormo de *Crocus Sativus*

#### 1.1 Material vegetal

Los cormos de *C. sativus* fueron recolectados en agosto y guardados a -80°C hasta su uso.

#### 1.2 Extracción y Aislamiento

Aplicando un proceso cromatográfico en una C18 (característico para saponinas) se separó la parte proteica de los glicoconjugados. Una vez purificadas las saponinas de azafrán se realizó un ensayo de solubilidades, detectándose que las saponinas de azafrán, eran poco solubles en H<sub>2</sub>O, MeOH y n-butanol, solventes característicos en la mayoría de los procesos de purificación de las saponinas, y extremadamente solubles en isopropanol:agua 1:1 (isopropanol 50%).

Con el objetivo de optimizar el proceso de extracción se realizó una disección separando la zona externa o epidermis y la zona interna o parénquima del cormo para llevar a cabo el proceso de extracción y análisis por HPLC (Figura 1). La presencia de CS5 solo se detectó en la epidermis.

En este momento, CS5 se purificó mediante el proceso de extracción (esquemático en la Figura 2) descrito en detalle a continuación y que consta de los siguientes pasos:

- i. Disección de la zona externa del cormo y liofilización,
- ii. Extracción de las saponinas mediante isopropanol:agua 1:1 (isopropanol 50%),
- iii. Precipitaciones y lavados con MeOH:Acetona 1:1, y
- iv. Fraccionamiento por cromatografía semipreparativa en fase reversa mediante HPLC.

Tanto la zona externa (epidermis) como interna (parénquima) del cormo se liofilizaron por separado. En paralelo se extrajeron las saponinas 3 veces durante 2 horas a temperatura ambiente con 2-propanol al 50%. El extracto se concentró mediante vacío con un rotavapor a 45°C para eliminar el disolvente, hasta obtener un residuo oleoso que se resuspendió en MeOH hasta obtener una disolución final del 30% (V/V). Dicha suspensión se precipitó con acetona (1:1) mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 20 minutos. El precipitado (CS15) se resuspendió en MeOH para precipitarlo de nuevo con acetona (1:1) por centrifugación y obtener un residuo amarillento (Csap) que se disolvió en acetonitrilo al 50% (v/v). Csap, se analizó mediante cromatografía en fase reversa en HPLC (Figura 1) en una Zorbax C18 (9,5 x 250 mm, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) utilizando un método de análisis (Tabla 4) que se puso a punto utilizando como patrón la fracción CF (Escribano *et al.*, 1999).

Se determinó que CS5 de cormo de azafrán podría estar presente en un 0,5% (m/m). Este nuevo producto libre de proteínas, es citotóxico contra células tumorales HeLa con una IC<sub>50</sub> de 24 µg/mL.

CS5 se purificó con un método semipreparativo (Tabla 5) mejorando el método previamente descrito al incluir una etapa de 5 minutos de lavado al 10% de acetonitrilo o ACN (con un 0,05% ácido trifluoroacético) justo después de cargar la muestra. La fracción mayoritaria presente en CS5, CS5-1, se purificó utilizando un gradiente isocrático al 40% de ACN (con un 0,05% ácido trifluoroacético). Tanto CS5 como CS5-1 se liofilizaron y guardaron a 4°C hasta el momento de su uso.

El poder rotatorio se determinó a 20°C en un polarímetro (Perkin-Elmer 241 MC polarimeter). MALDI-TOF-MS (*Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*) se llevó a cabo en un instrumento Voyager-DE (PerSeptive Biosystems, Manchester, UK) utilizando ácido sinapínico como matriz. Los espectros en modo positivo se registraron en un LCQ DecaXP equipado con una fuente de ionización de electrospray (Thermo Finnigan, San Jose, CA). Las muestras se disolvieron en 50% de 2-propanol/agua (v/v) en una concentración aproximada de 10-30 µg/µL e introducida con un flujo de 5 µL/min. La temperatura del capilar fue de 225°C. Los espectros se adquirieron tanto en modo positivo como negativo en un rango de 50-2000 (*m/z*) con un voltaje de spray de 4,8 kV y variando el voltaje del capilar de 31,5 a 46,0 V (Guo *et al.*, 2009). Los espectros de NMR (*Nuclear Magnetic Resonance*) se registraron en un espectrómetro DRX-500 (Bruker) y en un espectrómetro SYSTEM 500 (Varian) equipado con sonda fría (500 MHz para <sup>1</sup>H, 125 Mz para <sup>13</sup>C). Las muestras se disolvieron en 600 µL de piridina-*d*<sub>5</sub> y se analizaron a 300K. Los experimentos que se llevaron a cabo fueron: TOCSY (20-200 ms), <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HSQC, gHSQCTOCSY, HMBC, DEPT y ROESY (300 ms). El desplazamiento químico ( $\delta$ ) se expresó en ppm utilizando como referencia la piridina-*d*<sub>5</sub> (<sup>1</sup>H, 7.19 ppm; <sup>13</sup>C, 123.15 ppm). Los análisis de metilación (Ciucanu y Kerek, 1984), el análisis cuantitativo/cualitativo (Kamerling y Vliegthart, 1989) y la determinación de la configuración absoluta (Gerwig *et al.*, 1979) de los monosacáridos se llevaron a cabo en un GC-MS (*Gas-liquid Chromatography-Mass Spectrometry*) utilizando un sistema Fisons Instruments GC 8060/MD 800 (Interscience) con una columna capilar AT-1 (30 m x 0.25 mm, Alltech, Flemington, NJ). El aislamiento y purificación se llevó a cabo en un sistema 1100 HPLC (Hewlett Packard, Palo Alto, CA) conectado en línea con un detector de fotodiodos (190-800 nm).

Las Azafrinas 1 y 2 se obtuvieron a partir de CS5-1 mediante cromatografía en capa fina en láminas de sílica gel 60 F254 (Merck) utilizando CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (56:37:7) como fase móvil. Las bandas se visualizaron mediante tinción con 0,2% de orcinol en 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y revelado mediante calor a 150°C durante 5 min. Las bandas se recortaron y extrajeron con CHCl<sub>3</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O (14:6:1). La fase orgánica se eliminó bajo flujo de N<sub>2</sub> y la fracciones extraídas se purificaron de nuevo mediante HPLC con el gradiente isocrático descrito anteriormente para obtener Azafrina 1 y Azafrina 2, ambos compuestos con el mismo tiempo de retención (10,9 min).

La hidrólisis ácida de CS5 y posterior purificación de las saponinas (ácido equinocístico y oleanólico) se llevó a cabo de acuerdo con la bibliografía (Melek *et al.*, 2002).

### 1.3 Análisis estructural de CS5

Los datos químicos obtenidos para las dos Azafrinas de CS5 son:

#### Azafrina 1

Sólido amorfo de color blanco, punto de ablandamiento 70-75°C; [ $\alpha$ ]D<sub>20</sub>-62.5 (c 0.016, piridina); TLC R<sub>f</sub> = 0.80; MALDI-TOF-MS *m/z* 1965.5 [M+Na]<sup>+</sup> (MW 1942 Da); Modo positivo ESI-MS *m/z* 1966.7 [C<sub>92</sub>H<sub>198</sub>O<sub>40</sub>+Na]<sup>+</sup>; <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR (piridina-*d*<sub>5</sub>, 500 MHz/125 MHz): ver Tablas 1-3.

#### Azafrina 2

Sólido amorfo de color blanco, punto de ablandamiento 130-145°C; [ $\alpha$ ] D<sub>20</sub>-12.9 (c 0.031, piridina); TLC R<sub>f</sub> = 0.71; MALDI-TOF-MS *m/z* 1965.5 [M+Na]<sup>+</sup> (MW 1942 Da); Modo positivo ESI-MS (*m/z*): 1966.7 [C<sub>92</sub>H<sub>198</sub>O<sub>40</sub>+Na]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C NMR (piridina-*d*<sub>5</sub>, 500 MHz/125 MHz): ver Tablas 1-3.

CS5 es una mezcla de diferentes saponinas triterpénicas derivadas principalmente del ácido equinocístico y minoritariamente del ácido oleanólico. El análisis estructural se llevó a cabo mediante HPLC-ESI-MS, análisis de azúcares por metanólisis y butanólisis por GC-MS y mediante hidrólisis ácida de las saponinas y purificación de los aglicones que a su vez fueron analizados por NMR mediante diferentes técnicas espectrales (1D <sup>1</sup>H, TOCSY, ROESY, DEPC, HSQC, HMBC).

La fracción cromatográfica mayoritaria de CS5, CS5-1, representa aproximadamente un 70% (m/m) del total de las saponinas y al igual que CS5 de la cual procede, es citotóxica contra las células tumorales HeLa con una IC<sub>50</sub> de 9 µg/mL. CS5-1, está constituida por Azafrina 1 (1) y Azafrina 2 (2) caracterizadas como (1) ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido y (2) 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido. Estas dos saponinas bidesmosídicas, son isómeros derivados del ácido equinocístico, cuya única diferencia es la presencia del ácido glucurónico o galacturónico en posición C3 del aglicón.

## ES 2 360 331 B1

La separación de estos dos isómeros se obtuvo mediante cromatografía en capa fina (según lo explicado en el apartado anterior) y su análisis estructural (Tablas 1-3) se realizó mediante la combinación de espectrometría de masas (GC-EI-MS, MALDI-TOF y ESI-MS) y espectroscopia de resonancia molecular (NMR incluyendo  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY, ROESY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC, gHSQCTOCSY, DEPT y HMBC).

TABLA 1

*Datos espectrales de RMN ( $\delta$  en  $\beta\text{ppm}$ ) del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del aglicón o sapogenina de Azafrina 1 (1), Azafrina 2 (2) y el ácido equinocístico (3) obtenido a partir de la hidrólisis ácida de 1 y 2. Los datos químicos se dan tomando como referencia la piridina- $d_5$  (7.19 ppm para  $^1\text{H}$  y 123.15 ppm para  $^{13}\text{C}$ ) y en base a los resultados obtenidos con los siguientes experimentos: TOCSY, DEPT, HSQC y HMBC*

Posición	$1\delta_{\text{H}}$	$2\delta_{\text{H}}$	$3\delta_{\text{H}}$	HMBC $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$	$1\delta_{\text{C}}$	$2\delta_{\text{C}}$	$3\delta_{\text{C}}$	HMBC $^{13}\text{C} \rightarrow ^1\text{H}$
1	1.44/0.89	1.50/0.97	1.58/1.04		38.2	38.3	37.9	9, 25
2	2.23/1.83	2.45/1.86	1.85		25.9	25.8	26.7	-
3	3.45	3.45	3.46	4, 23, 24, 1*	88.6	88.7	77.1	1, 1, 23, 24
4	-	-	-		38.6	38.5	38.5	5, 23, 24
5	0.79	0.80	0.80		55.2	55.3	55.7	23, 24, 25
6	1.45/1.29	1.48/1.32	1.56/1.38		18.5	18.5	17.9	$J_{\text{H6-C6}}$ , 5
7	1.68/1.47	1.69/1.48	1.64/1.40		32.6	32.7	32.3	6, 26
8	-	-	-		39.1	39.0	39.0	9, 26, 27
9	1.75	1.77	1.83		47.2	47.1	47.0	12, 25, 26
10	-	-	-		37.0	37.1	36.8	9, 25
11	1.96	1.97	2.02		23.1	23.0	22.9	9
12	5.62	5.63	5.60	9, 14, 18	121.7	121.9	121.3	$J_{\text{H11-C11}}$ , H: 18
13	-	-	-		144.4	144.3	144.4	15, 18, 19, 27

ES 2 360 331 B1

14	-	-	-		42.3	42.2	42.3	9, 12, 16, 26, 27
15	2.35/1.74	2.36/1.74	2.40/1.77		35.4	35.5	35.4	27
16	5.23	5.24	5.25	14, 17, 18	74.2	74.1	74.0	J <sub>H16-C16</sub> , 15, 18, 22
17	-	-	-		49.1	49.0	49.0	15, 16, 18, 19
18	3.60	3.60	3.63	12, 13, 16, 17	40.7	40.7	40.8	J <sub>H18-C18</sub> , 29, 30
19	2.80/1.37	2.80/1.38	2.83/1.41		46.5	46.5	46.6	19, 29, 30
20	-	-	-		30.5	30.5	30.5	29, 30
21	2.49/1.34	2.50/1.35	2.50/1.37		35.8	35.9	35.9	29, 30
22	2.40/2.23	2.42/2.24	2.41/ 2.25		32.3	32.1	31.7	-
23	1.28	1.30	1.25	4, 5, 24	28.0	28.0	27.9	J <sub>H23-C23</sub> , 24
24	0.95	0.92	1.01	4, 5, 23	16.9	16.8	16.6	J <sub>H24-C24</sub> , 23
25	0.88	0.85	0.93	1, 5, 9, 10	15.5	15.5	15.8	J <sub>H25-C25</sub> , 5, 25
26	1.10	1.14	1.06	7, 8, 9, 14	16.7	16.8	16.7	J <sub>H26-C26</sub> , 5, 25
27	1.78	1.78	1.85	8, 13, 14, 15	27.4	27.4	27.1	J <sub>H27-C27</sub> , 9
28	-	-	-		175.2	175.3	180.0	18, 22
29	1.02	1.04	1.04	19, 20, 21	33.4	33.4	33.3	J <sub>H29-C29</sub>
30	1.14	1.16	1.17	19, 20, 21	24.8	24.7	24.6	J <sub>H30-C-30</sub> , 18

TABLA 2

Datos espectrales de RMN ( $\delta$  en  $\beta$ ppm) del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los azúcares que aparecen tanto en Azafrina 1 (1) como en Azafrina 2 (2). Los datos químicos se dan tomando como referencia la piridina- $d_5$  (7.19 ppm para  $^1\text{H}$  y 123.15 ppm para  $^{13}\text{C}$ ) y en base a los resultados obtenidos con los siguientes experimentos: TOCSY, ROESY, HSQC y HMBC

Posición	1 $\delta_{\text{H}}$	1 $\delta_{\text{C}}$	2 $\delta_{\text{H}}$	2 $\delta_{\text{C}}$
Azúcares unidos al C3 del aglicón				
GlcA(1)/ GalA(2)				
1	5.00	106.6	4.90	106.6
2	4.11	74.8	4.48	72.0
3	4.31	77.6	4.26	74.5
4	4.55	72.7	5.01	71.1

ES 2 360 331 B1

5	5	4.63	77.7	4.78	75.2
	6	-	172.7	-	171.8
	Azúcares unidos al C28 del aglicón				
10	Fuc				
	1	5.98	93.7	5.99	93.8
	2	4.49	73.2	4.50	73.2
15	3	4.31	73.0	4.32	73.0
	4	5.52	73.9	5.53	73.9
20	5	4.02	69.8	4.03	69.8
	6	1.29	15.8	1.30	15.8
25	Rha3				
	1	6.47	98.7	6.47	98.7
	2	4.68	79.3	4.69	79.3
30	3	4.63	71.2	4.64	71.2
	4	4.35	81.8	4.35	81.8
35	5	4.42	67.5	4.43	67.5
	6	1.73	17.9	1.74	17.9
40	Ara				
	1	5.27	103.1	5.27	103.1
	2	4.58	80.0	4.58	80.0
45	3	4.18	72.5	4.18	72.5
	4	4.20	67.4	4.20	67.4
50	5	4.20/3.62	64.7	4.20/3.62	64.7
	Gal				
55	1	4.99	105.4	5.00	105.4
	2	4.45	72.3	4.45	72.3
60	3	4.00	74.4	4.00	74.4
	4	4.43	68.9	4.43	68.9
65	5	3.90	76.5	3.90	76.5

ES 2 360 331 B1

5  
10  
15  
20  
25  
30  
35  
40  
45  
50  
55  
60  
65

6	4.36/4.36	61.0	4.38/4.38	61.0
Xyl				
1	5.44	105.0	5.44	105.0
2	3.99	75.5	3.99	75.5
3	4.18	77.4	4.18	77.4
4	4.13	70.5	4.13	70.5
5	4.24/3.85	66.5	4.24/3.85	66.5
Azúcares unidos al C <sup>3</sup> del ácido graso				
Rha2				
1	5.50	100.3	5.50	100.3
2	4.54	71.8	4.54	71.8
3	4.39	71.9	4.39	71.9
4	4.42	73.7	4.42	73.7
5	4.21	69.5	4.21	69.5
6	1.60	17.7	1.61	17.7
Azúcares unidos al C <sup>16</sup> del ácido graso				
Rha1				
1	5.24	100.8	5.24	100.8
2	4.51	71.6	4.51	71.6
3	4.46	72.1	4.45	72.1
4	4.25	73.3	4.24	73.3
5	4.16	68.9	4.16	68.9
6	1.64	17.9	1.65	17.9

TABLA 3

Datos espectrales de RMN ( $\delta$  en  $\beta$ ppm) del  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del ácido graso unido tanto a Azafrina 1 (1) como a Azafrina 2 (2) a través de una unión entre  $\text{C}'1$  del ácido graso y C-4 de la mucosa. Los datos químicos se dan tomando como referencia la piridina- $d_5$  (7.19 ppm para  $^1\text{H}$  y 123.15 ppm para  $^{13}\text{C}$ ) y en base a los resultados obtenidos con los siguientes experimentos: TOCSY, DEPT, gHSQCTOCSY, HSQC y HMBC

Posición C'	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	171.1
2	2.6/2.78	38.7
3	4.42	73.7
4	1.73	34.6
5	1.42	24.6
6	1.29	28.2
7	1.21/1.29	28.7
8	1.57/1.59	23.3
9	2.36	42.0
10	-	209.4
11	2.36	42.0
12	1.57/1.59	23.4
13	1.21/1.29	28.6
14	1.3	25.7
15	1.53	29.2
16	3.81/3.45	66.8

TABLA 4

Método cromatográfico de análisis para la detección de CS5 en la zona exterior del corno.  
La fase móvil contiene un 0,05% de ácido trifluoroacético

Duración 45 min.	Tiempo (min.)	ACN%	Flujo (mL/min.)
1	0.00	10	2.500
4	21.00	48	2.500
5	31.00	90	2.500
6	32.00	90	2.500
7	36.00	10	2.500
8	37.00	10	2.500

TABLA 5

*Método cromatográfico semipreparativo para la purificación de CS5.  
La fase móvil contiene un 0,05% de ácido trifluoroacético*

Duración 37 min.	Tiempo (min.)	ACN%	Flujo (mL/min.)
1	0.00	10	2.500
2	5.00	10	2.500
3	6.00	39	2.500
4	21.00	48	2.500
5	22.00	90	2.500
6	26.00	90	2.500
7	27.00	10	2.500
8	31.00	10	2.500

## Ejemplo 2

### Ensayos de citotoxicidad

Las células tumorales (línea HeLa) se obtuvieron de la colección americana de cultivos tipo (Rockville, MD). El ensayo antitumoral se llevó a cabo a partir de la bibliografía descrita (Escribano *et al.*, 1996), viéndose que CS5 es citotóxico contra células tumorales HeLa con una IC<sub>50</sub> de 24 µg/mL. Su fracción mayoritaria, CS5-1, es también citotóxica contra estas células con una IC<sub>50</sub> de 9 µg/mL.

## Ejemplo 3

### Ensayos de la actividad adyuvante de CS5

#### 3.1. Material y Métodos

##### 3.1.1. Ratones

Los ratones C57BL/6 y C57BLCD45.1 fueron obtenidos originalmente de los laboratorios Harlan (Holanda, B.V) y Charles River (L'arbresle cedex, Francia), respectivamente. Los ratones transgénicos P14, que expresan un TCR (receptor de linfocitos T) específico para el péptido 33-41 (gp33) de la glicoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV, por sus siglas en inglés) fueron obtenidos en el propio instituto de los inventores. La tipificación de las crías y parentales fue llevada a cabo mediante la tinción de linfocitos de sangre periférica (PBL's) con el tetrámero gp33 conjugado con el fluorocromo PE (PE-gp33) durante 30 minutos a temperatura ambiente, lisando los eritrocitos con solución para lisis de células rojas (BD biosciences, San José, CA) y consecuente análisis por citometría de flujo. Los ratones transgénicos OT-I y OT-II transgenic mice, que expresan un TCR específico para los péptidos restringidos a H-2<sup>b</sup>, SIINFELK y ISQ respectivamente, fueron también obtenidos en el propio instituto de los inventores y tipificados mediante la tinción de sus linfocitos T CD8+ y T CD4+ con las proteínas conjugadas APC-Vα2 y PE-Vβ5. Para todos los experimentos se utilizaron ratones macho de entre 6 y 12 semanas. Todas las cepas de ratones se mantuvieron en el animalario del Ludwig Institute for Cancer Research, bajo condiciones estériles y a una temperatura de 25±2°C. Todos los procedimientos aplicados a los ratones están aprobados por el respectivo comité de ética en animales.

##### 3.1.2. Antígenos y adyuvantes

Los péptidos Gp33-41 (KAVYNFATC), ISQ y SIINFELK fueron sintetizados en el Ludwig Institute for Cancer Research, diluidos en agua ultrapura (Gp33-41) ó PBS-DMSO (ISQ y SIINFELK) y almacenados a -80°C a una concentración de 1 mg/mL. La Ovalbúmina libre de endotoxinas (EndoGrade Ovalbumin, conc. de endotoxinas. < 1 EU/mg, >98% de pureza) fue comprada a Hyglos AG (Regensburg, Alemania). El aluminio (Alum) usado en los experimentos consiste en una mezcla de hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio y la solución stock se preparó en solución salina a una concentración de 15,73 µg/µl. Las secuencias CpG-ODN-1826 (<0,2 ng/mL de endotoxinas de acuerdo al test *limulus*) fueron gentilmente proveídas por A. Krieg, Coley Pharmaceutical Group (Wellesley, MA). QuilA es una mezcla de saponinas extraídas de la corteza del árbol suramericano *Quillaja saponaria*, y fueron gentilmente donadas por la compañía Brenntag Nordic A/S, Dinamarca. El adyuvante Incompleto de Freund (IFA) fue comprado a la compañía Sigma-Aldrich, Inc.

### 3.1.3. Ensayos *in vivo* de activación y proliferación de células T

#### *Transferencia adoptiva de células específicas de antígeno*

5 Se prepararon suspensiones de células en PBS a partir del bazo y nódulos linfáticos de ratones transgénicos P14 *CD45.1<sup>+/+</sup>*, OT-I *CD45.1<sup>+/+</sup>* ó OT-II *CD45.1<sup>+/+</sup>*. Posteriormente, las células fueron marcadas o no, según fuera el caso, con CFSE y finalmente, transferidas adoptivamente intravenosamente (en la vena de la cola) a ratones vírgenes C57BL/6 *CD45.1<sup>-/-</sup>*.

10 Para las inmunizaciones con el péptido gp33-41, 24 horas antes de la inmunización se transfirieron adoptivamente en los ratones vírgenes  $20 \times 10^6$  células marcadas con CFSE, provenientes de ratones transgénicos. Para la evaluación de la expansión de células T de memoria específicas, se transfirieron adoptivamente  $1,4 \times 10^6$  linfocitos T CD4+ purificados. Para los ensayos *in vivo* de proliferación, las células se marcaron con CFSE y se transfirieron adoptivamente en ratones vírgenes C57BL/6. Según los requerimientos del experimento, se transfirieron  $5 \times 10^6$  OT-I células/ratón ó  $5 \times 10^6$  OT-II más  $5 \times 10^6$  OT-II células/ratón. Todas las inyecciones se realizaron en un volumen de  $200 \mu\text{L}$ .

#### *Marcaje con CFSE*

20 Para rastrear la proliferación de células T *in vivo*, las células se marcaron con CFSE antes de ser transferidas adoptivamente en los ratones recipientes. Las suspensiones de células se lavaron dos veces con PBS 0,1% BSA, se resuspendieron a  $10 \times 10^6$  células/mL y luego se incubaron con CFSE  $5 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich, Buchs, Suiza) en PBS-BSA durante 8 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, las células se lavaron dos veces con PBS-BSA 0,1% y una vez con PBS solo. Finalmente, las células se resuspendieron en PBS a la concentración apropiada para ser transferidas en los ratones vírgenes.

#### *Purificación de células T CD4+*

25 La purificación de células T CD4+ se llevó a cabo mediante aislamiento de las mismas por depleción de células T CD4- (selección negativa), las cuales fueron marcadas indirectamente con un cóctel de anticuerpos monoclonales conjugados con biotina como reactivo de marcaje primario, y con anticuerpos monoclonales anti-biotina conjugados con perlas magnéticas (Microbeads) como reactivo de marcaje secundario. Las células T CD4- marcadas magnéticamente fueron excluidas de la solución de células al ser retenidas en una columna MACS<sup>®</sup> cuando pasaron por el campo magnético de un separador MACS<sup>®</sup> (Miltenyi, Biotec), mientras que las células T CD4+ pasaron a través de la columna y se recogieron en un tubo.

### 3.1.4. Inmunización de los ratones

35 Después de la transferencia adoptiva, los ratones se dejaron en reposo durante 24 h y se dividieron en grupos consistentes en 3 ó 4 ratones cada uno. Posteriormente, todos los ratones fueron inyectados subcutáneamente en la base de la cola, con solución salina como control negativo (placebo) o bien fueron vacunados de acuerdo con los protocolos que se describirán más adelante. El volumen de todas las inyecciones fue de  $100 \mu\text{L}$ /ratón. Para el uso de CS5 en las inmunizaciones, primero se evaporó la solución de Isopropanol 50% en el cual el stock se encontraba resuspendido, y finalmente CS5 se resuspendió en solución salina a la concentración apropiada de acuerdo con el protocolo de vacunación.

#### *Vacunación con el péptido gp33-41*

40 Después de transferir adoptivamente células provenientes de ratones transgénicos P14 en ratones vírgenes C57BL/6, los ratones recipientes fueron inmunizados una vez con  $50 \mu\text{g}$  de gp33-41 diluido en  $100 \mu\text{l}$  de solución salina (PBS) solamente o con gp33-41 diluido en solución salina con CpG ( $50 \mu\text{g}$ ), QuilA ( $20 \mu\text{g}$ ) o CS5 ( $10, 25, 50$  ó  $100 \mu\text{g}$ ). 5 días después de la inmunización, los ratones fueron sacrificados para evaluar la proliferación de células T CD8+ específicas y no específicas en nódulos linfáticos de drenaje. La evaluación se realizó mediante citometría de flujo.

#### *Vacunación con el péptido SIINKFEL*

55 Ratones C57BL/6, en los cuales se transfirieron previamente células marcadas con CFSE provenientes de ratones transgénicos OT-I, fueron inmunizados una vez con el péptido SIINKFEL ( $50 \mu\text{g}$ ) diluido en solución salina solamente o con SIINKFEL diluido en solución salina conteniendo CpG ( $50 \mu\text{g}$ ), QuilA ( $20 \mu\text{g}$ ) o CS5 ( $1, 5$  ó  $10 \mu\text{g}$ ). 4 días después de la inmunización, se evaluó la proliferación y activación de linfocitos T CD8+ específicos en nódulos linfáticos de drenaje mediante citometría de flujo.

#### *Vacunación con la proteína Ovalbúmina (OVA)*

60 Para los ensayos de proliferación *in vivo*, ratones transferidos adoptivamente con células OT-I y OT-II marcadas con CFSE fueron inmunizados una vez con la proteína OVA ( $1 \mu\text{g}$ ) disuelta en solución salina (PBS) solamente o con OVA disuelta en PBS conteniendo Aluminio ( $200 \mu\text{g}$ ), CpG ( $50 \mu\text{g}$ ), QuilA ( $20 \mu\text{g}$ ) o CS5 ( $1, 5, 10$  ó  $20 \mu\text{g}$ ). 4 días después se evaluó la proliferación y activación de células T CD4+ y CD8+ específicas en nódulos linfáticos de drenaje mediante FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting*).

Para la evaluación de la respuesta de anticuerpos específica anti-OVA, ratones transferidos con células OT-II fueron inmunizados con OVA (100  $\mu\text{g}$ ) diluida en solución salina (PBS) solamente o con OVA diluida en PBS conteniendo Aluminio (200  $\mu\text{g}$ ), QuilA (20  $\mu\text{g}$ ) o CS5 (1, 5, 10 ó 20  $\mu\text{g}$ ) un día después de la transferencia adoptiva. Al día 14, se les dio a los ratones una inyección de refuerzo basada en el mismo protocolo de la primera inmunización. Finalmente, se colectaron muestras de suero independientes para cada uno de los ratones, a los días 14 (antes de la inyección de refuerzo), 21 y 28.

Para la evaluación de la expansión de células T CD4+ específicas de memoria, los ratones fueron inmunizados como se ha descrito arriba y al día 28 se reestimularon con una emulsión de PBS/IFA (1:1) conteniendo péptido ISQ. 4 días después del reestímulo, los ratones fueron sacrificados y la expansión de células péptido-específicas fue evaluada en nódulos linfáticos de drenaje, mediante la detección de células T CD4+ CD45.1+/+ por FACS.

### 3.1.5. Marcaje de células y citometría de flujo (FACS)

#### Tinción con anticuerpos fluorocromados

La expresión de marcadores de activación y fenotípicos en la superficie de las células fue evaluada mediante inmunofluorescencia. En resumen, las células fueron incubadas durante 5 minutos con el anticuerpo 24G2 para bloquear la unión inespecífica al receptor FcR. Posteriormente, fueron incubadas con los respectivos anticuerpos fluorocromados diluidos en PBS 2% FCS 0,01% Azida y EDTA 2 mM. Las células del donante (exógenas) fueron discriminadas de las del recipiente (endógenas) mediante tinción de las mismas con anticuerpos monoclonales anti-CD45.1 o anti-CD45.2 (CD45.1 para células exógenas; CD45.2 para células endógenas). Las células exógenas OT-I y OT-II fueron detectadas mediante tinción con las combinaciones de anticuerpos monoclonales anti-V $\alpha$ 2, anti-V $\beta$ 5 y anti-CD8 $\alpha$ ; o anti-V $\alpha$ 2, anti-V $\beta$ 5 y anti-CD4 respectivamente. La activación de células T fue evaluada mediante tinción de la superficie celular con anti-CD44, anti-CD62L y anti-CD69.

#### Tinción con tetrámeros

Las células T CD8+ específicas para Gp33-41 fueron detectadas mediante tinción con el tetrámero H<sub>2</sub>-Db LCMV gp33-41 conjugado con PE, en combinación con tinción con anticuerpo anti-CD8 $\alpha$ . La tinción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 40 min, antes de proceder a la tinción con anticuerpos a 4°C.

#### Citometría de flujo

La fluorescencia de anticuerpos, tetrámeros y CFSE fue evaluada con un FACScalibur (Becton Dickinson) y cuando la tinción era de más de cuatro colores, se utilizó un FACScanto (Becton Dickinson). Los datos fueron analizados utilizando el programa FlowJo (Tree Star, Inc).

#### Medición de la respuesta específica de anticuerpos anti-OVA

Los niveles de IgG, IgG1, IgG2a e IgG2b específicos contra OVA fueron detectados mediante inmunoensayo ELISA. En resumen, placas multipocillo (Nunc Immuno) sensibilizaron con OVA mediante incubación de las mismas con 50  $\mu\text{l}$  de OVA resuspendida en PBS a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y posterior incubación a 4°C durante toda la noche. A continuación, las placas se lavaron con PBS 0,05% (v/v) Tween 20 (PBS/Tween) y luego se bloquearon con leche al 5% en PBS/Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de realizar cuatro lavados, diluciones seriadas en PBS-T 2,5% leche de las muestras de suero se añadieron a los pocillos y las placas se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente las placas se lavaron con PBS/Tween y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en presencia del anticuerpo secundario respectivo: anti-Inmunoglobulina G (anti-IgG, 1:6000) de ratón (producida en cabra y conjugado con HRP), anti-IgG1 1:4000, anti-IgG2a 1:5000 o anti-IgG2b 1:2000 (Southern Biotechnology Associates). Después de cuatro lavados adicionales, las placas fueron incubadas con el sustrato para HRP, SIGMAFAST™ OPD (*o*-Phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma Aldrich, Buchs, Suiza) durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se midió la absorbancia a 450 nm o a 492 nm (en el caso de que la reacción se bloqueara previamente con HCl 3M) en un lector de microplacas.

#### Análisis estadístico

Los datos se expresaron como la media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) y la significancia estadística de las diferencias entre grupos de datos fue calculada usando un *t*-test estándar, con un intervalo de confianza del 95%. Los valores  $P < 0,05$  fueron considerados como estadísticamente significantes.

### 3.2. Resultados de las actividades adyuvantes de CS5

La actividad adyuvante de las saponinas puede determinarse por varios métodos. El incremento en el título de anticuerpos contra un antígeno específico bajo la administración conjunta de este con un adyuvante es un criterio para evaluar la actividad adyuvante de un compuesto (Dalsgaard, K., 1978, Acta Veterinaria Scandinavica 69, 1-40; Scott, M. T., Gross-Samson, M., and Bomford, R., 1985, Int. Archs. Allergy Appl. Immun. 77, 409-412). Para evaluar el efecto adyuvante de CS5, ratones C57BL/6 fueron inmunizados subcutáneamente con el antígeno OVA (Ovalbúmina, una proteína del huevo) mezclado con diferentes dosis del potencial adyuvante. Dos semanas después, el suero de

los ratones fue colectado y la presencia de anticuerpos específicos anti-OVA fue evaluada mediante inmunoensayo ELISA. La inmunización con el antígeno solamente no causó ningún incremento en el nivel de anticuerpos anti-OVA en comparación con el nivel observado en ratones no inmunizados. En contraste, la administración de CS5 claramente condujo a un incremento significativo de los niveles de anticuerpos (Figura 3. Respuesta de anticuerpos). La actividad adyuvante de CS5 y otros adyuvantes como el extracto de saponinas “QuilA” y sales de aluminio (Aluminio) fue comparada, encontrando que CS5, Quil A y Aluminio inducen niveles similares de IgG1 (respuesta tipo Th2) pero solamente CS5 y QuilA incrementaron significativamente los niveles de IgG2a e IgG2b (respuesta tipo Th1). Colectivamente, *estos resultados demuestran la actividad adyuvante de CS5 y su superioridad en comparación con el aluminio, ya que tiene capacidad para inducir no solamente una respuesta inmune de tipo Th1, sino también de tipo Th2.*

Con el objetivo de determinar el efecto adyuvante de CS5 en la respuesta de linfocitos T, se evaluó la activación primaria de los linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos para el antígeno OVA. Ratones C57Bl/6 fueron inmunizados subcutáneamente con OVA solamente o mezclado con diferentes dosis de CS5 como potencial adyuvante, o con QuilA, CpG y Aluminio como controles. Cuatro días después se evaluó el nivel de expansión y proliferación de linfocitos específicos para OVA. CS5, a dosis de 1 y 5  $\mu\text{g}$ , incrementó la proliferación y expansión de la población de células T CD4+ específicas para OVA, siendo 5  $\mu\text{g}$  la dosis a la cual se observó el mayor efecto (Figura 4A, proliferación CD4).

### 3.2.1. CS5 incrementa la respuesta inmune mediada por células

La activación primaria de los linfocitos T CD8+ también se vio aumentada por el uso de CS5 como adyuvante. La inmunización con OVA y CS5 indujo proliferación de la población de linfocitos T CD8+, la cual se vio reflejada en una expansión de ésta hasta 8-10 veces más en comparación con el control (OVA solamente). QuilA tuvo un efecto similar al de CS5. Por el contrario los adyuvantes CpG, IFA/CpG y Aluminio, a pesar de incrementar la proliferación de la población de linfocitos T CD8+ específicos para OVA, no tuvieron ningún efecto en la expansión de la misma, lo cual sugiere que las células proliferan pero no logran mantenerse viables. *Este resultado sugiere que CS5 tiene una capacidad adyuvante superior a la de otros adyuvantes como Aluminio, IFA ó CpG para inducir una respuesta inmune mediada por linfocitos T citotóxicos* (Figura 4B, proliferación CD8).

Una de las principales características de un buen adyuvante, es su capacidad no solo de incrementar la respuesta inmune frente a un antígeno, sino también de que esta respuesta inducida sea funcional y duradera. Una manera de evaluar si un potencial adyuvante presenta esta capacidad, sería evaluar la respuesta inmune secundaria generada después de un reestímulo, en un organismo que ha sido inmunizado en el pasado con el mismo antígeno. Para este fin, se evaluó la respuesta secundaria de linfocitos T CD4+ en ratones C57Bl/6. En resumen, linfocitos T CD4+ específicos para un péptido de OVA fueron transferidos adoptivamente a ratones C57Bl/6, los cuales fueron posteriormente inmunizados dos veces (día 1 y 14) con OVA solamente o en presencia de CS5 u otros adyuvantes. Quince días después de la segunda inmunización, todos los ratones fueron reestimulados con el péptido de OVA y la expansión de la población de linfocitos T CD4+ péptido-específicos fue evaluada al cuarto día después del reestímulo. Los ratones inmunizados con QuilA y CS5 mostraron grandes poblaciones de linfocitos T CD4+ péptido-específicos en nódulos linfáticos de drenaje (cercaos al sitio de la inyección), mientras que en aquellos inmunizados con OVA solamente o en presencia de aluminio no fue posible detectar ninguna respuesta después del reestímulo, a pesar de haber observado una respuesta primaria después de la primera inmunización. *Lo anterior muestra que el efecto adyuvante de CS5 no se limita exclusivamente a incrementar la respuesta inmune en un corto lapso de tiempo después de aplicar la vacuna, sino que también tiene la capacidad de generar respuestas duraderas que pueden ser re-potenciadas con una futura exposición al antígeno.* (Figura 4C, expansión CD4 de “memoria”).

### 3.2.2. Actividades hemolíticas de CS5

La hemólisis de eritrocitos (RBC) causada por toxicidad en la mayoría de los animales incluyendo los humanos es una desventaja relevante para el desarrollo clínico de las saponinas como adyuvantes. Con el objetivo de determinar si las dosis de CS5 evaluadas para la formulación de vacunas tenían un efecto tóxico en los eritrocitos, se realizó un test hemolítico *in vivo* usando ratones como modelo, y no se detectó hemoglobina libre en el suero sanguíneo de ratones inmunizados a ninguna de las dosis de CS5 evaluadas. *CS5 mostró ser inmunoestimulante a dosis que se encuentran dentro del rango de dosis no tóxicas, lo cual permite su uso como adyuvante sin ningún riesgo de hemólisis.*

### 3.2.3. Implicaciones agronómicas de la invención

Una consecuencia directa de la localización tisular de CS5 desde el punto de vista agronómico es la posibilidad de poder utilizar cormos en dormancia con pesos menores a 5 gramos, ya que su menor tamaño implica una mayor superficie y por lo tanto un mayor rendimiento para la extracción de saponinas. Estos cormos son inviábiles en campo ya que no generan flores y, por lo tanto, no son seleccionados durante el tamizado de los mismos para su venta. Además, la utilización de tierras de secano para la obtención de cormos de pequeño tamaño para la extracción de CS5 podría suponer un empuje para muchos agricultores que debido a las restricciones en el uso del agua se están viendo forzados al abandono de estas tierras.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto de fórmula general (I):

5

10

15

20

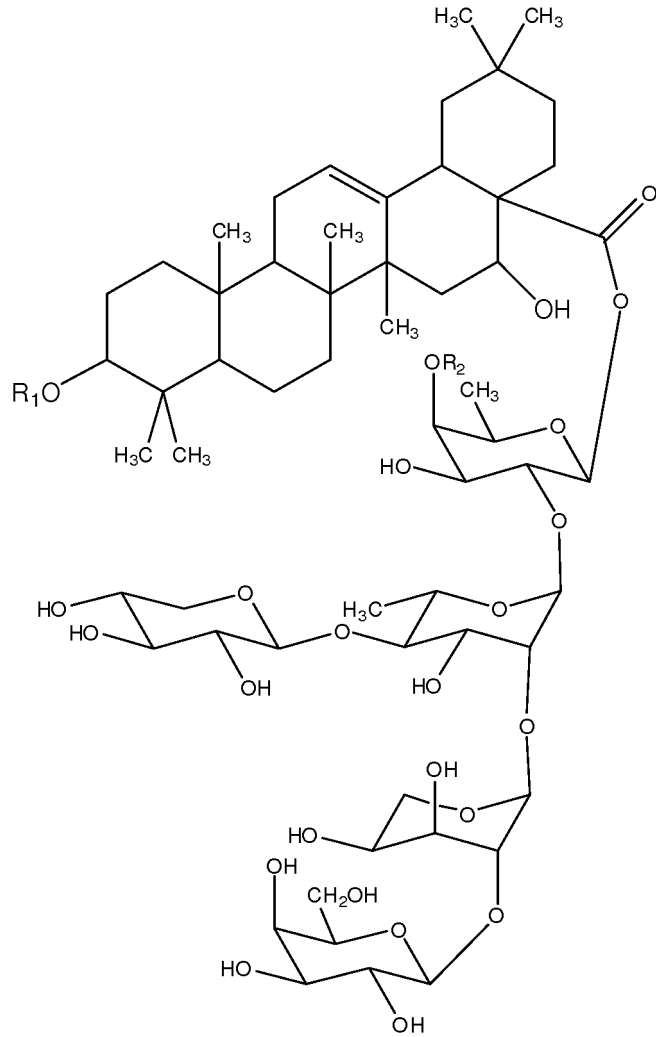
25

30

35

40

45



50

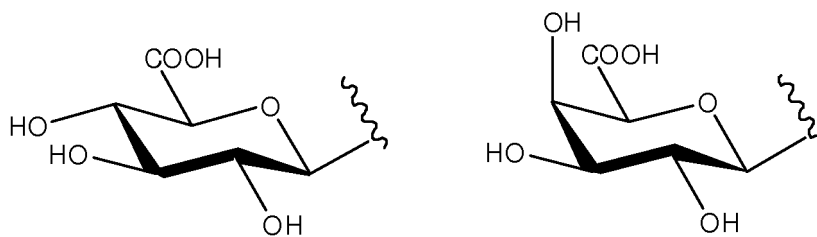
Fórmula (I)

donde R<sub>1</sub> se selecciona de entre los siguientes grupos:

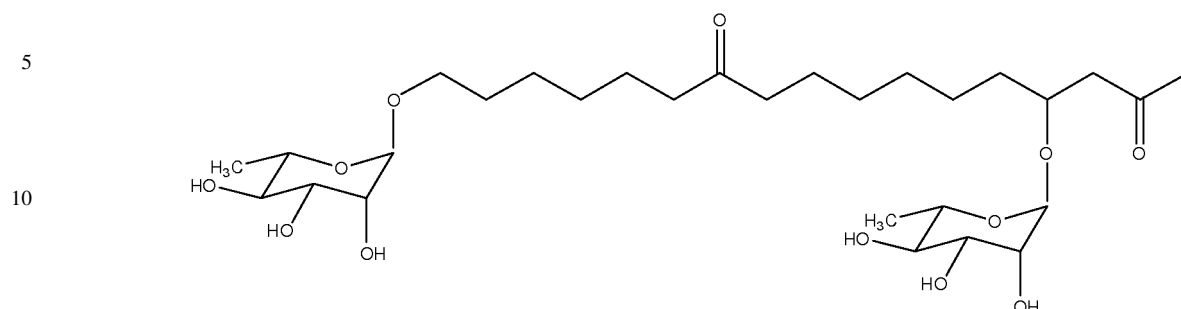
55

60

65



y R<sub>2</sub> representa el siguiente grupo:



o cualquiera de sus isómeros o sus sales.

20 2. Compuesto según la reivindicación 1 donde el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

25 3. Compuesto según la reivindicación 1 donde el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

4. Composición que comprende un compuesto de fórmula general (I) o cualquiera de sus isómeros o sus sales.

30 5. Composición según la reivindicación 4 donde el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

35 6. Composición según la reivindicación 4 donde el isómero es el ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

40 7. Composición según la reivindicación 4 que comprende los isómeros ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido y ácido 3-*O*-β-D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-*O*-di-α-L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]-β-D-fucopiranosido.

45 8. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la elaboración de un medicamento.

9. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

50 10. Uso del compuesto según la reivindicación 9 donde el cáncer es carcinoma cervical.

11. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como adyuvante para una vacuna.

55 12. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para la elaboración de un medicamento.

13. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para la elaboración de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

60 14. Uso de la composición según la reivindicación 13 donde el cáncer es carcinoma cervical.

15. Uso de la composición según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 como adyuvante para una vacuna.

65 16. Composición farmacéutica que comprende al menos el compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

17. Composición farmacéutica que comprende al menos ácido 3-*O*-β-D-glucuronopiranosil-equinocístico-28-*O*-[β-D-galactopiranosil-(1→2)-α-L-arabinopiranosil-(1→2)-[β-D-xilopiranosil-(1→4)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-[4-

*O*-di- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]- $\beta$ -D-fucopiranósido y ácido 3-*O*- $\beta$ -D-galacturonopiranosil-equinocístico-28-*O*-[ $\beta$ -D-galactopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[4-*O*-di- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-3,16-dihidroxi-10-oxo-hexadecanoil]- $\beta$ -D-fucopiranósido.

5 18. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16 ó 17 que además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

19. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 18 que además comprende otro principio activo.

10 20. Composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 que además comprende una cantidad inmunogénicamente efectiva de un antígeno.

21. Método de obtención de una composición según la reivindicación 7 que comprende:

- 15 a. separar la epidermis del cormo de *Crocus Sativus*,
- b. liofilizar la epidermis obtenida en el paso (a),
- 20 c. extraer las saponinas de la epidermis del paso (b) mediante isopropanol:agua 1:1,
- d. concentrar el producto obtenido en el paso (c) mediante vacío, hasta obtener un producto oleoso y resuspenderlo en metanol hasta obtener una proporción producto oleoso:metanol 7:3,
- 25 e. precipitar la suspensión obtenida en el paso (d) con acetona,
- d. repetir los pasos (d) y (e) tres veces más, y
- g. fraccionar el precipitado obtenido en el paso (f) mediante cromatografía.

30 22. Método según la reivindicación 21 donde la cromatografía del paso (g) se realiza mediante una primera elución isocrática seguida de un gradiente de acetonitrilo.

35 23. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22 donde la cromatografía del paso (g) se realiza mediante una primera elución isocrática seguida de un gradiente de acetonitrilo y una segunda elución en gradiente.

24. Método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 donde la cromatografía del paso (g) consiste en una cromatografía semipreparativa en fase reversa HPLC en columna C18.

40 25. Método de obtención del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende todos los pasos del método según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24 y además:

- h. separar el producto obtenido en el paso (g) mediante cromatografía en capa fina.

45

50

55

60

65

FIG. 1

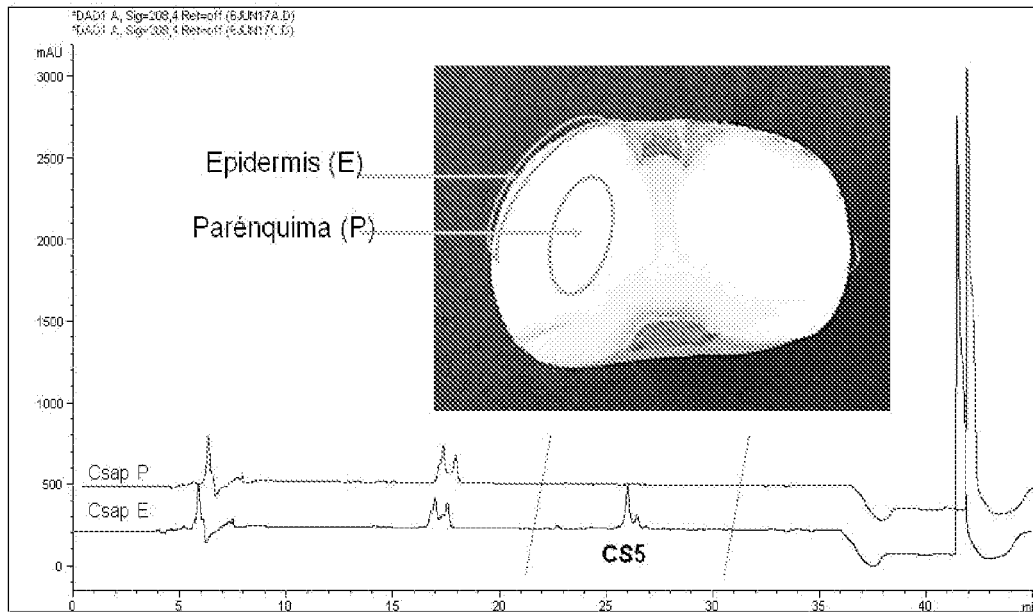


FIG. 2

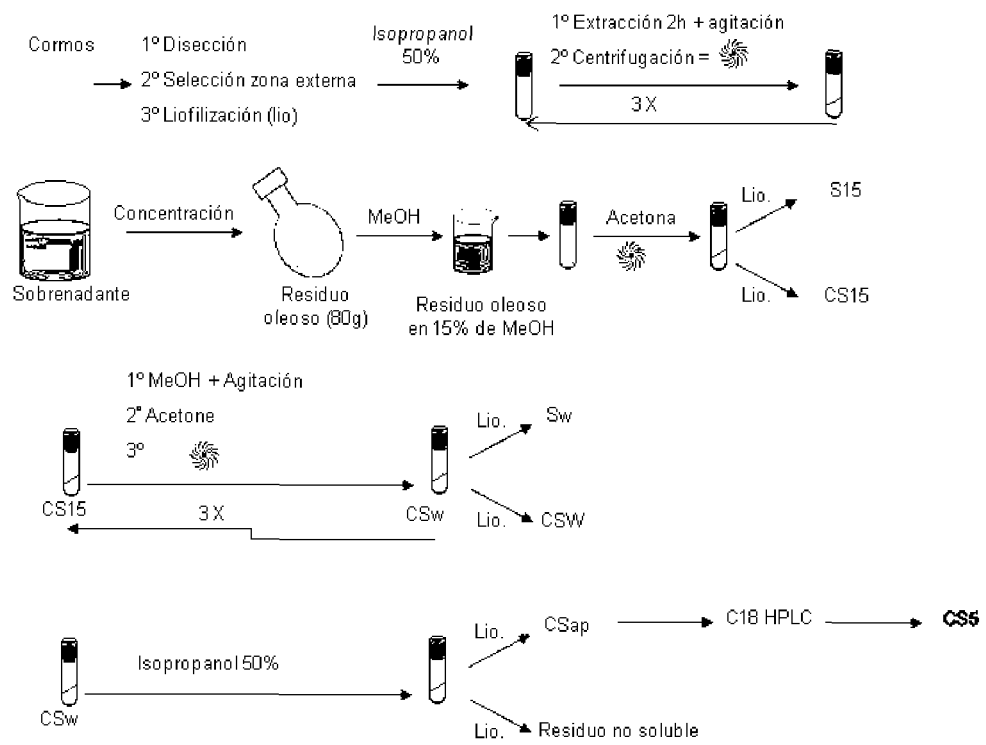


FIG. 3

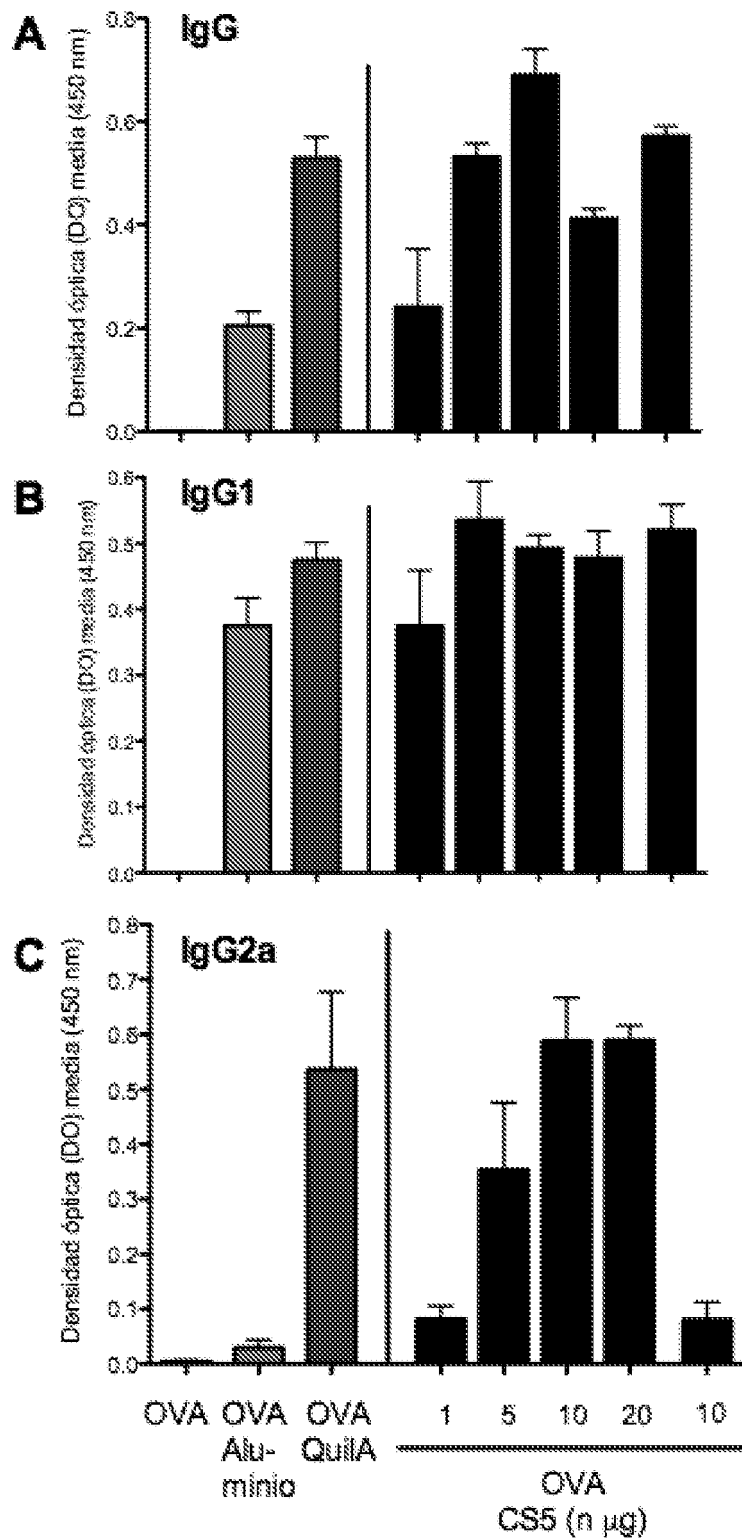
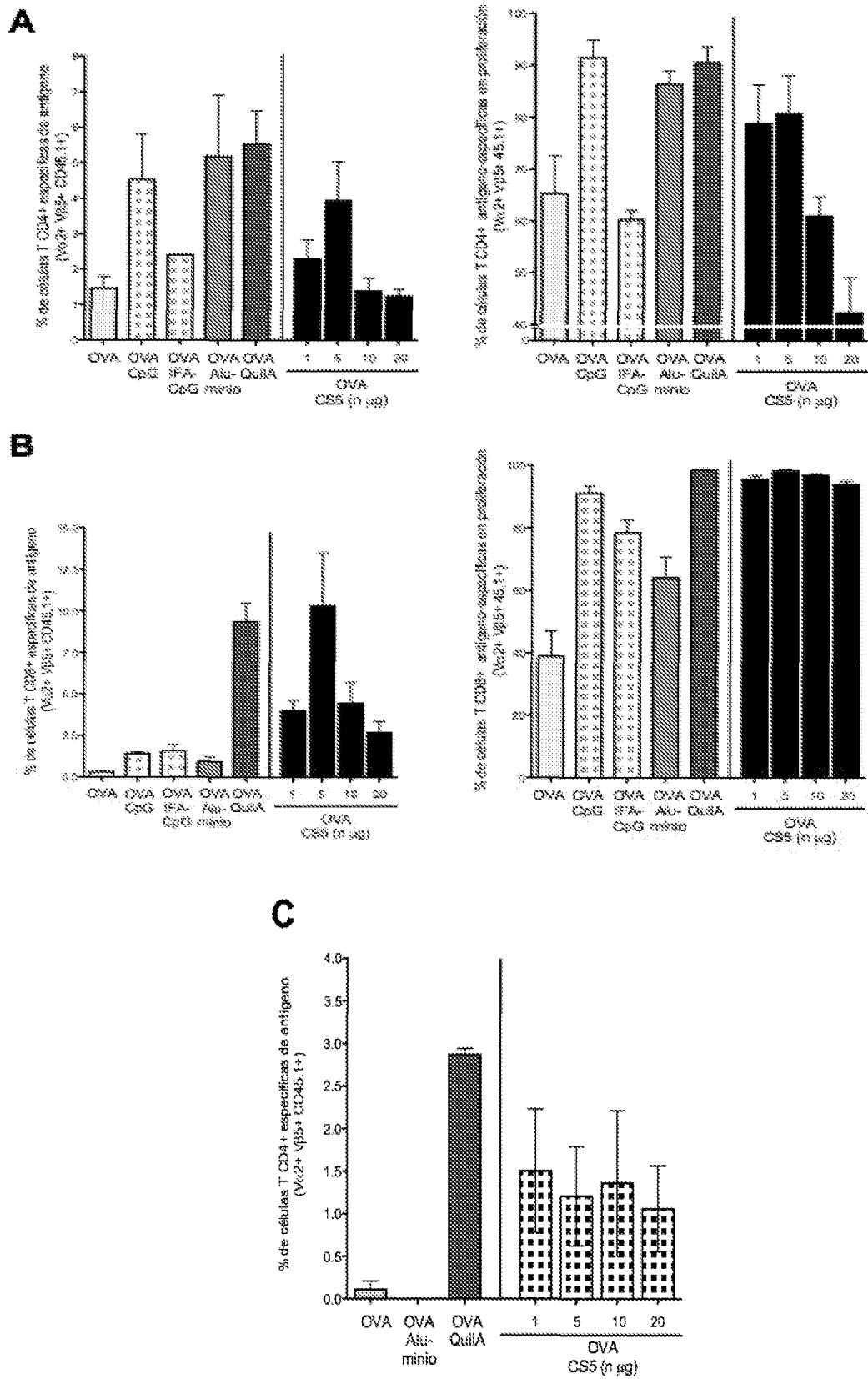


FIG. 4





OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930901

②② Fecha de presentación de la solicitud: 26.10.2009

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SUN, H.-X. et al. "Advances in saponin-based adjuvants". Vaccine 2009, Volumen 27, Número 12, páginas 1787-1796. [Disponible en línea el 07.02.2009]. Ver página 1787, resumen; página 1789, figura 1.	1-25
A	WO 2000009075 A2 (PRESS, J.B. & MARCIANI, D.J.) 24.02.2000, página 7, líneas 1-8; páginas 9-12.	1-25
A	MARCIANI, D.J. et al. "Development of semisynthetic triterpenoid saponin derivatives with immune stimulating activity". Vaccine 2000, Volumen 18, Número 27, páginas 3141-3151. Ver página 4141, resumen; página 3145, figura 1.	1-25
A	GAO, Z.-Z. et al. "A new triterpenoid saponin from <i>Gleditsia sinensis</i> and structure-activity Relationships of inhibitory effects on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production". Natural Product Research 2008, Volumen 22, Número 4, páginas 320-332. [Disponible el 18.03.2008]. Ver página 321, figura 1.	1-25

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

**El presente informe ha sido realizado**

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
31.01.2011

Examinador  
G. Esteban García

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C07H15/256** (01.01.2006)

**A61K31/704** (01.01.2006)

**A61P35/00** (01.01.2006)

**A61P37/00** (01.01.2006)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07H, A61K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, REGISTRY, CAPLUS, MEDLINE, BIOSIS, PUBMED, XPESP, NPL, EMBASE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.01.2011

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones 1-25	<b>SI</b>
	Reivindicaciones	<b>NO</b>

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

**Base de la Opinión.-**

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

**1. Documentos considerados.-**

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	SUN, H.-X. et al. Vaccine 2009, Vol. 27, Nº 12, pp. 1787-1796	07.02.2009
D02	WO 2000009075 A2	24.02.2000
D03	MARCIANI, D.J. et al. Vaccine 2000, Vol. 18, Nº 27, pp. 3141-3151	2000
D04	GAO, Z.Z. et al. Natural Product Research 2008, Vol. 22, Nº 4, pp. 320-332	18.03.2008

**2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**

El objeto de la invención es un compuesto de fórmula general (I), con estructura de saponina triterpénica, el uso del compuesto de fórmula (I) para la elaboración de un medicamento y como adyuvante en una vacuna; una composición que comprende dicho compuesto, su uso para la elaboración de un medicamento y como adyuvante en una vacuna, y un método de obtención de dicha composición a partir de la epidermis del cormo de *Crocus sativus*.

El documento D01 divulga la utilización de una serie de saponinas triterpénicas como adyuvantes en vacunas, debido a su capacidad para activan el sistema inmune en mamíferos (ver página 1787, resumen). En concreto se divulga la saponina QS-21, obtenida a partir de *Quijalla saponaria*, que presente similitudes estructurales con los compuestos de la invención, como es la presencia de una cadena alifática como sustituyente en el azúcar que esterifica el grupo carboxílico del ácido equinocístico (posición 28 del núcleo triterpénico; R<sub>2</sub> en la fórmula general I de la invención) (ver página 1789, figura 1).

Sin embargo, este compuesto se diferencia de los de la invención, además de en la estructura de dicho grupo alifático, en la naturaleza de los radicales glicósidos presentes y en la existencia de un grupo aldehído en el núcleo triterpénico.

El documento D02 divulga derivados de saponinas que comprenden un aglicón triterpénico sustituido en las posiciones 3 y 18 con un monosacárido u oligosacárido, y con un grupo aldehído preferentemente en posición 4 (ver página 7, líneas 1-8). Estos compuestos presentan un grupo éster alifático como sustituyente en el oligosacárido que se halla en posición 28, aunque de naturaleza diferente al que se encuentra en los compuestos de la invención (R<sub>2</sub>), como también son diferentes los radicales glicósidos presentes (ver páginas 9-12).

El documento D03 divulga igualmente derivados de saponinas triterpénicos semisintéticos, análogos de las saponinas procedentes de *Quijalla saponaria*, y que, como éstas, contienen un grupo aldehído y presentan propiedades adyuvantes (ver página 4141, resumen). Como ocurre con los compuestos divulgados en los documentos D01 y D02, las saponinas divulgadas en D03 presentan similitudes estructurales con los compuestos de la invención, pero también algunas diferencias (ver página 3145, figura 1).

El documento D04 divulga saponinas triterpenoides derivadas de *Gleditsia sinensis*, entre las que se encuentra el compuesto 1, que presenta una estructura análoga a los compuestos de la invención, con un sustituyente monosacárido en posición 3 (R<sub>1</sub> en los compuestos de la invención) y un tetrasacárido en posición 28, que se encuentra sustituido por un resto alifático (ver página 321, figura 1). A pesar de estas similitudes, el compuesto divulgado se diferencia de los de la invención en la naturaleza del resto alifático y de los grupos monosacárido y oligosacárido presentes en las posiciones 4 y 28.

Los documentos citados D01-D04 muestran sólo el estado de la técnica del campo al que pertenece la invención. Ninguno de ellos tomado solo o en combinación con los otros contiene divulgación ni sugerencia alguna que pudiera dirigir al experto en la materia hacia un compuesto de fórmula general (I) (reivindicación 1), y por tanto, tampoco hacia su uso para la elaboración de un medicamento y como adyuvante en una vacuna (reivindicación 8), las composiciones que comprende dicho compuesto (reivindicaciones 4 y 16), el uso de éstas para la elaboración de un medicamento y como adyuvante en una vacuna (reivindicación 12), y un método de obtención de dicha composición a partir de la epidermis del cormo de *Crocus sativus* (reivindicación 21).

Por tanto, se considera que el objeto de las reivindicaciones 1-25 reúne los requisitos de novedad y actividad inventiva exigidos en los artículos 6.1 y 8.1 de la Ley de Patentes.