

(duração do tratamento, frequência de aplicação, massagem, vigilância de efeitos adversos).

Conclusão

- A cafeína, como substância cosmetologicamente activa, exerce a sua acção no tecido adiposo subcutâneo, através da inibição da fosfodiesterase, tendo um efeito lipolítico.
- Para que esta molécula transponha a principal barreira à penetração cutânea - o estrato córneo pode ser veiculada através de lipossomas e em conjunto com promotores de absorção cutânea.
- Sendo a PEE uma disfunção com uma origem multifactorial, as formulações deverão incluir diversos ingredientes activos, numa tentativa de actuar nos diferentes mecanismos envolvidos.
- Dada a complexidade da PEE e o seu carácter crónico e progressivo, nenhum tratamento pode ser considerado definitivo.
- Modificações de estilo de vida podem ter também efeitos benéficos nesta situação.

- Having OFP multifactor causes, formulations should have several active ingredients, to act in the different mechanisms involved.
- Given the complexity of OFP and its chronic and progressive character, no treatment is considered definitive.
- Lifestyle modifications can be effective in this situation.

Bibliografia / References

- [1] Rao J, Gold MH, Goldman MP, A two-center double blinded randomized trial testing the tolerability and efficacy of a novel therapeutic agent for cellulite reduction. *Journal of Cosmetic Dermatology* 2005; 4: 93-102.
- [2] Rossi AB, Vergnanini AL, Cellulite: a review. *European Academy of Dermatology and Venereology JEADV* 2000; 14: 251-262.
- [3] Sandt J J M, Burgsteden J A, Cage S, Carmichael P L, Dick I, Kenyon S, Korinth G, Larese F, Limasset J C, Maas W J M, Payan J P, Robinson E, Sartorelli P, Schaller K H, Wilkinson S C, Williams FM, *In vitro* absorption of caffeine, testosterone, and benzoic acid: a multi-centre comparison study, *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004; 39: 271-281.
- [4] Swarbrick J, Boylan J C, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, vol.6, Marcel Dekker Inc., 1992.
- [5] Moser K, Kriwet K, Naik A, Kalia Y N, Guy R H, Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*, *European Journal of Pharmaceutics*, 2001, 52: 103-112.
- [6] Micromedex Online (Caffeine) <http://www.thomsonhc.com/hcs/librarian/PFPUI/hu4T5pt1gdoaeB>
- [7] Doris Hexsel, Orlandi C, Prado D Z, Botanical Extracts Used in The Treatment of Cellulite, *Dermatol Surg*, 2005, 31:866-872.
- [8] Tim Lesser, Ritvo E, Moy L S, Modification of Subcutaneous Adipose Tissue by a Methylxanthine Formulation: A Double-Blind Controlled Study, *Dermatologic Surgery*, 1999, 25:455-462.
- [9] Tholon L, Neliat G, Chesne C, Saboureau D, Perrier E, Branka J E, An *in vitro*, ex vivo, and *in vivo* demonstration of the lipolytic effect of slimming liposomes: An unexpected alpha(2)-adrenergic antagonism, *Journal of Cosmetic Science*, 2002, 53 (4): 209-218.
- [10] Santos O, Treu C, Semenovitch I, Bouskela E, Therapeutic Evaluation of a Topical Composition with Caffeine in the Treatment of Gynoid Lipodystrophy With the Orthogonal Polarization Spectral Method, *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2005, 52(3) P94-P94.
- [11] Sainio E L, Rantanen T, Kanerva L, Ingredients and Safety of Cellulite Creams, *European Journal of Dermatology*, 2000, 10(8):596-603.
- [12] Campos MSMP; Influência do Ultra-Som na Permeação Cutânea da Cafeína: Estudo em Fragmentos de Pele e em Adipócitos Isolados de Suínos; Universidade Estadual de Campinas Instituto de Biologia; Campinas 2004.

Síntese e Avaliação Biológica de Novas Saponinas Imunoactivas

Syntheses and Biological Evaluation of Novel Immunoactive Saponins

M. C. Costa¹, I. Eleutério,³ S. Ramos,¹ S. Alves,² S. Ley,² F. Cardoso¹ and R. R. Schmidt³

¹Instituto Nacional de Engenharia, Tecnologia e Inovação, Estrada do Paço do Lumiar, Ed. F, 1649-038 Lisboa, Portugal

²Cambridge University, Cambridge UK, ³University of Konstanz, Germany

Resumo

A saponina QS21 é uma saponina natural extraída da casca das árvores endémicas da América do Sul conhecida por desempenhar um papel importante como adjuvante de vacinas. O objectivo deste estudo foi determinar se os análogos sintéticos mais simples da QS-21 podem induzir respostas imunes com igual vantagem. Para isso, foram desenhados e sintetizados os ácidos 3-β-O-(β-D-xilopiranosil)-(1→3)-[(β-D-galactopiranosil)-(1→2)]-6-β-D-glucurónicos derivados de colestanol e amirina **1** e **2**, respectivamente, ligando primeiro resíduos glucósidos ao terpeno e estendendo depois a cadeia de açúcar. A sua actividade adjuvante foi avaliada *in vitro* através da secreção de mediadores pró-inflamatórios de células IL-6 e IL-1, TNF-α e NO e os níveis de IgG no soro depois da estimulação *in vivo* das células apresentadoras de antígeno (APCs). Os compostos **1** e **2** foram bastante mais citotóxicos para as células tumorais J744A.1 de murino do que a QS21 e mostraram menos actividade hemolítica indesejada nos glóbulos vermelhos do que a QS-21, mas não induziram respostas citotóxicas CD8 fortes após uma única injeção, o que aconteceu no processo de imunização com ovalbumina e QS-21. Apesar de os análogos **1** e **2** apresentarem boa actividade adjuvante *in vitro*, a ausência do grupo aldeído e da cadeia acilo é provavelmente o que afecta negativamente as propriedades das saponinas simplificadas para induzir células T citotóxicas activas em ratinhos.

Palavras chave: saponina *Quillaja* QS21, análogos hemi-sintéticos, adjuvante de vacina, imunoestimulação.

Abstract

QS21 is a natural saponin extracted with water from the bark of endemic trees of South America which has been shown to play a key role as vaccine adjuvant. The aim of this study was to determine if simpler synthetic analogues of QS-21 could induce similar advantageous immune responses. For this purpose we designed and synthesized both the cholestanyl- and amiranyl-3-β-O-(β-D-xylopyranosyl)-(1→3)-[(β-D-galactopyranosyl)-(1→2)]-6-β-D-glucuronic acid **1** and **2**, respectively, by first attaching the glucoside residues to the terpene and then extending the sugar chain. The secretion of the pro-inflammatory cell mediators IL-6 and IL-1, TNF-α and NO and the IgG serum levels after *in vivo* stimulation of APCs with **1** and **2**, were used to assess their adjuvant activity *in vitro*. Compounds **1** and **2** were stronger cytotoxic for murine J744A.1 tumor cells than QS21 and showed less undesired hemolytic activity on red blood cells than QS-21, but did not induce strong cytotoxic CD8 responses after a single injection, while immunization with ovalbumin and QS-21 did. Although synthetic analogues **1** and **2** show good adjuvant activity *in vitro* it is probably the lack of the aldehyde group and the acyl chain that negatively affects the simplified saponins properties to induce active cytotoxic T cells in mice.

Keywords: *Quillaja* saponin QS21, hemisynthetic analogues, vaccine adjuvant, immunostimulation.

Recebido em 21/11/2006

Aceite em 29/11/2006

Rev. Lusófona de Ciências e Tecnologias da Saúde, 2005; (3) 2: 191-207

Versão electrónica: <http://revistasaude.ulusofona.pt6>

Introdução

A indução de uma resposta imune depende de o antígeno conseguir atingir e instalar-se nos órgãos linfóides, onde ocorre a resposta imune através de interações entre APCs e células T, permitindo completar as respostas imunes que dependem da célula T. As células *naïves* não entram em áreas do corpo não-linfóides, por isso o transporte, retoma e apresentação de antígeno no gânglio linfático pela APC efectua-se por células dendríticas (CDs) captadoras de antígeno, que captam antígeno, quer seja por endocitose mediada por receptores ou por pinocitose de fase fluida. Após a activação, movem-se da periferia em direcção ao gânglio linfático de drenagem mais próximo. A activação das CDs ocorre devido a infecções microbianas, produtos microbianos, stress, e adjuvantes de vacinas. Estes últimos podem agir, de preferência, envolvendo o tipo apropriado de célula dendrítica competente (APC profissional), capaz de internalizar o antígeno, para migrar em direcção à zona da célula T e apresentar o antígeno às células T ou B *naïves*. Desta forma, a imunoestimulação causada por adjuvantes pode resultar de: aumento de atracção de CDs em direcção ao local de injeção; aumento de carga de APCs; ou aumento de transporte de APCs carregadas de antígeno em direcção ao gânglio linfático. A capacidade adjuvante continuada proporcionada pela replicação de micro-organismos/vectores deve-se à produção de quantidades suficientes de antígeno para o tecido linfático, à medida que a replicação prossegue. As citocinas inflamatórias produzidas no local da injeção podem ser comunicadores essenciais de actividade adjuvante. A sua produção por macrófagos activados ou células Th reguladoras é essencial para o desenvolvimento de anticorpos e para respostas CTL a um antígeno estranho. Após a injeção, os antígenos da vacina podem seguir três caminhos diferentes^[1] (ver Figura 1), que dependem das características do antígeno, mas que podem também ser influenciados pela presença de adjuvantes. O antígeno absorvido por células apresentadoras de antígeno (APCs), nomeadamente macrófagos ou monócitos, é processado em péptidos determinantes e conduzido por dois caminhos em direcção às moléculas de classe I e II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), que apresentam péptido para interacção com células T CD8⁺ ou CD4⁺, respectivamente. As células T estimuladas podem segregar citocinas ou moléculas co-estimuladoras com vista a regular a resposta imune, ou actuar como linfócitos T citotóxicos (CTL). Estes últimos são necessários para combater células malignas ou determinados agentes infecciosos. São produzidos anticorpos pelas células B, com a ajuda das citocinas produzidas pelas células T CD4⁺. Estas

Introduction

The induction of an immune response depends on the antigen reaching and being available in lymphoid organs, where the initiation of immune responses takes place by interactions between the antigen-loaded APCs and T cells, allowing the completion of T cell dependent immune responses. Naive cells are not effective in entering non-lymphoid areas of the body, thus the antigen transport, uptake, and presentation by APC in the lymph node is done by antigen-capturing dendritic cells (DCs), which capture antigen either by receptor-mediated endocytosis or fluid-phase pinocytosis. Upon activation they move from periphery towards the nearest draining lymph node. DC activation occurs by microbial infections, microbial products, stress and vaccine adjuvants. The later may act preferentially involving the appropriate type of competent DC (professional APC), able to internalize the antigen, to migrate towards the T cell zone and present antigen to naive T or B cells. Thus immunostimulation by adjuvants may result from: increased attraction of DCs towards the injection site; increased loading of APCs; or increased transport of antigen-loaded APCs towards the lymph node. Continued adjuvanticity provided by replicating micro-organisms/vectors is based on provision of sufficient amounts of antigen to the lymphoid tissue, as long as the replication proceeds. Inflammatory cytokines produced at the injection site may be essential communicators of adjuvant activity. Their production by activated macrophages or regulatory Th cells is essential for the development of antibody and CTL responses to foreign antigen. Following injection, vaccine antigens may take three different pathways^[1] (see Figure 1), which are dependent on the characteristics of the antigen, although may also be influenced by the presence of adjuvants. The antigen taken up by antigen-presenting cells (APCs), namely macrophages or monocytes, is processed into peptide epitopes and directed through two pathways to major histocompatibility complex (MHC) molecules class I and II, which present peptide for interaction with either CD8⁺ or CD4⁺ T cells, respectively. The stimulated T cells may secrete cytokines or costimulatory molecules to upregulate the immune response, or act as cytotoxic T lymphocytes (CTL). The later are required to combat malignant cells or particular infectious agents. Antibodies are produced by B cells with help provided by the cytokines produced by CD4⁺ T cells. The later have two major subsets Th1 and Th2 that can be identified based on their secretion of different cytokine patterns.^[1] A Th1 immune response, which is mediated by Th1 helper cells, is characterized by the induction of delayed-type hypersensitivity responses and the secretion of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-2

possuem dois subconjuntos principais Th1 e Th2 que se distinguem pela secreção de diferentes padrões de citocinas.^[1] Uma resposta imune do tipo Th1, que é mediada por células T “helper” Th1, caracteriza-se pela indução de respostas de hipersensibilidade retardada e pela secreção do interferão- γ (IFN- γ), da interleucina-2 (IL-2), IL-12, e factores de necrose tumoral- α e β (TNF- α , β) e por uma produção intensificada de IgG2a,^[1] IgG2b e IgG3 em ratinhos. Uma resposta imune do tipo Th2, mediada por células T “helper” Th2, caracteriza-se pela indução de anticorpos circulantes ou secretores e pela secreção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, e por uma produção intensificada de IgG1 e de IgA secretor. É necessária uma resposta do tipo Th1 para a produção de CTL e, portanto, necessária também para a imunidade protectora contra agentes infecciosos intracelulares, tais como certos vírus, bactérias e protozoários e, presumivelmente contra células cancerígenas. Por seu turno, a imunidade do tipo Th2 é eficaz pela sua protecção contra muitas bactérias e também determinadas infecções virais, mas ineficaz na necrose de células intermediada por anticorpos.

(IL-2), IL-12, and tumour necrosis factor- α and β (TNF- α , β) and an enhanced production of IgG2a,^[1] IgG2b and IgG3 in mice. A Th2 immune response, mediated by Th2 helper cells, is characterized by the induction of circulating or secretor antibodies and the secretion of IL-4, IL-5, IL-6 and IL-10, and an enhanced production of IgG1 and secretor IgA. A Th1 response is a requisite for CTL production, and hence required for protective immunity against intracellular infectious agents, such as certain viruses, bacteria and protozoa, and presumably against cancer cells. On the other hand, Th2 immunity is effective for protection against most bacteria as well as certain viral infections, but ineffective in antibody mediated cell killing.

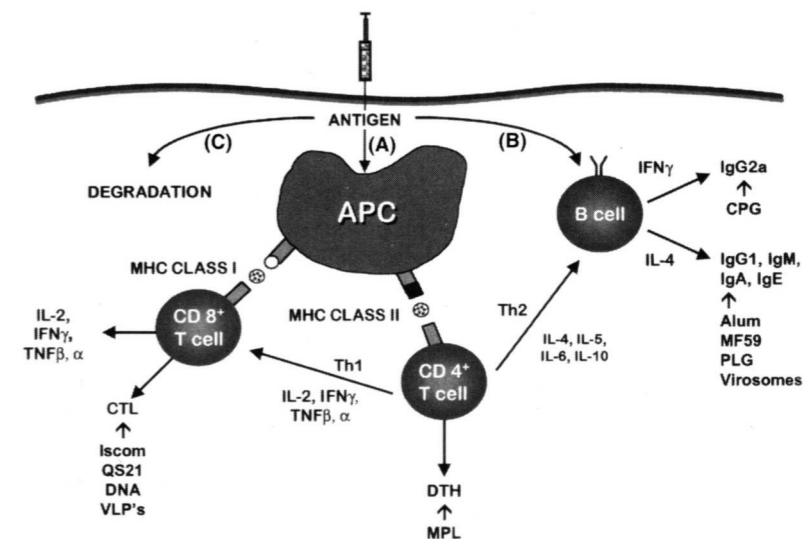


Figura 1 - Representação simplificada da resposta imune a um antígeno injectado por meio de vacina. (A) antígeno absorvido directamente por células apresentadoras de antígeno (APC), (B) liga-se ao anticorpo de superfície nas células B, (C) ocorre degradação^[1].

Figure 1 - Simplified representation of the immune response to an injected vaccine antigen. (A) antigen directly taken up by antigen presenting cells (APC), (B) bind to the surface antibody on B cells, (C) undergo degradation^[1].

A questão mais importante no desenvolvimento de adjuvantes é a da segurança, facto que limitou esse mesmo desenvolvimento desde que os sais minerais baseados em alumínio (alum) foram introduzidos pela primeira vez, há mais de 50 anos. Estes são os únicos adjuvantes que actualmente têm a aprovação da US Food & Drug Administration. Muitos outros adjuvantes experimentais avançaram para ensaios

The most important issue in adjuvants development is safety, which has restricted their development since aluminium-based mineral salts (alum) were first introduced more than 50 years ago. The latter, are the only adjuvants currently approved by the US Food & Drug Administration. Many other experimental adjuvants have advanced to clinical trials and some have demonstrated high potency, but most have proved

clínicos e muitos demonstraram ter alta potencialidade, mas muitos outros mostraram-se demasiado tóxicos para efeitos de uso clínico de rotina (adjuvantes de Freund CFA e IFA completos e incompletos, respectivamente). Os alum, apesar de registarem um bom nível de segurança, são adjuvantes fracos tanto no que respeita à indução de anticorpos nas subunidades de proteínas como na imunidade mediada por células.^[1] Uma das limitações evidentes é a incapacidade de evocarem células T “helper” produtoras de IL-2 e IFN- γ .^[2] Além disso, os adjuvantes alum podem induzir respostas de anticorpos de imunoglobulina E (IgE), mas são ineficazes relativamente a alguns antígenos e foram associados a algumas reacções alérgicas em seres humanos.^[1] Outras condições adicionais que são importantes para o desenvolvimento dos adjuvantes são a biodegradabilidade, a estabilidade, a facilidade de fabrico, o custo e a sua aplicabilidade a uma vasta gama de vacinas. O ideal, pela facilidade de administração e de consentimento por parte do paciente, seria que um adjuvante permitisse que a vacina fosse administrada por via mucosa. De entre os diversos adjuvantes avaliados em testes clínicos^[3], a fracção purificada de saponina designada *Quillaja* QS21 continua a ser a única que apresenta segurança e o único adjuvante imunoestimulador eficaz, com capacidade para estimular uma resposta do tipo Th1 através da produção de células CTL específicas para os antígenos.

A constatação de que os extractos naturais de saponinas não purificadas se mostravam pouco fiáveis na actividade adjuvante resultaram no desenvolvimento de preparações refinadas de mistura de saponinas que vieram a ter uma ampla aplicação em vacinas veterinárias^[4], em particular contra a febre aftosa e, mais recentemente, em vacinas contra a raiva, contra a malária, a babesiose e a tripanossomíase^[7] e em vacinas experimentais contra doenças dos protozoários.^[8] No entanto, a fonte natural foi quase extinta e a cultura celular fornece misturas complexas que têm de ser purificadas extensivamente para se tornarem viáveis em vacinas a administrar aos seres humanos.

O objectivo deste estudo foi provar que os análogos mais simples designados por glucósidos terpenóides, tomando como modelo unidades estruturais farmacóforos das saponinas *Quillaja* (QS) e as características principais de outras saponinas imunoestimulantes naturais conhecidas, constituem um sistema eficaz e acessível que apresenta antígenos potencialmente semelhantes ao QS, induzindo, assim, respostas imunes vantajosas. Recorreu-se à secreção de mediadores celulares no meio de cultura após a estimulação de células apresentadoras de antígeno com análogos de QS para avaliar a sua actividade adjuvante.

too toxic for routine clinical use (complete and incomplete Freund's adjuvants CFA and IFA respectively). Alum, although having a good safety record, it is a weak adjuvant for both antibody induction to protein subunits and cell mediated immunity.^[1] A notable limitation is their incapacity to evoke IL-2 and IFN- γ -producing T-helper cells.^[2] Moreover, alum adjuvants can induce immunoglobulin E (IgE) antibody responses but are ineffective for some antigens and have been associated with some allergic reactions in human subjects.^[1] Additional issues that are important for adjuvant development include biodegradability, stability, ease of manufacture, cost, and applicability to a wide range of vaccines. Ideally, for ease of administration and patient compliance, an adjuvant should allow a vaccine to be given by a mucosal route. Among the several adjuvants which have been evaluated in clinical trials^[3], *Quillaja* saponin QS21 remains a unique safe and effective immunostimulatory adjuvant capable of stimulating a Th1 type response through the production of antigen specific CTL cells.

The realization that crude saponin extracts provided unreliable sources of adjuvant activity resulted in the development of refined preparations as saponin mixtures which found a wide application in veterinary vaccines^[4], particularly against foot-and-mouth disease and more recently in rabies vaccines^[5,6], antiparasite vaccines for malaria, babesiosis and trypanomiasis^[7] and experimental vaccines against protozoal diseases.^[8] However, the natural source has been nearly extinct and the cell culture provide complex mixtures which have to be extensively purified in order to be viable for human vaccine.

The aim of this study was to determine how could simpler analogues designed as terpenoid glycosides taking as template repetitive structural pharmacofor markers of *Quillaja* saponins (QS) and main features of other known natural immunoadjuvant saponins, constitute an effective and accessible system of antigens presentation potentially similar to QS thus inducing advantageous immune responses. The secretion of cell mediators in the culture medium after stimulation of antigen presenting cells with the QS analogues was used to assess their adjuvant activity.

For that purpose we prepared for the first time the structurally related triterpene aglycones, cholestanyl- and amiriny-3- β -O-(β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-glucuronic acid **1** and **2** (Figure 2). For the 3-O-glycosylation of the aglycones a linear strategy (i.e. construction of the trisaccharide moiety at the aglycone) was chosen because a convergent strategy (i.e. glycosylation of the aglycone with a preprepared trisaccharide donor^[23]) did not lead to satisfactory anomeric selectivities.^[23] This way, with the help of anchimeric assistance,^[25] good

Para tal, foram preparados pela primeira vez utilizando estruturas químicas relacionadas, isto é, agliconas triterpenóides, os ácidos colestanyl- e amiriny-3- β -O-(β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-glucurónico **1** e **2** (Figura 2). Para a 3-O-glicosilação das agliconas, optámos por uma estratégia linear (i.e. a construção de uma fracção de trissacarídeos^[23] previamente preparado) não conduziu a selectividade anomérica^[23] satisfatória. Deste modo, com a ajuda de assistência anquimérica,^[25] esperava-se que a glicosilação originasse bons resultados. O sucesso deste empreendimento deveria ainda, no futuro, facilitar grandemente a síntese total de QS 21 e de análogos mais completos.

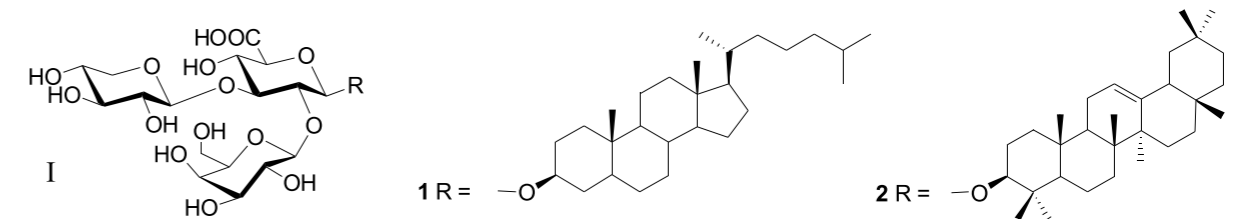


Figura 2 - Colestanil-3- β -O-(β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-ácido glucurónico **1** e amiriny-3- β -O-(β -D-xilopiranosil)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopiranosil)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-ácido glucurónico **2**^[23,25,28].

Figure 2 - Cholestanyl-3- β -O-(β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-glucuronic acid **1** and amiriny-3- β -O-(β -D-xylopyranosyl)-(1 \rightarrow 3)-[(β -D-galactopyranosyl)-(1 \rightarrow 2)]-6- β -D-glucuronic acid **2**^[23,25,28].

Métodos e Materiais

Testes de imunostimulação *in vivo*

Foi usado um modelo bem estabelecido para determinar se as Formulações de novas saponinas **1** e **2** potencialmente imunoestimuladoras, em conjunto com hidróxido de alumínio, poderia constituir adjuvantes imunológicos otimizados. Resumidamente, foram efectuadas experiências para comparar estas Formulações de saponinas e a saponina QS-21 imunoestimuladora de referência foi usada em separado. A nova saponina imunoestimuladora seleccionada para servir como adjuvante foi a saponina de β -amirina **2** e a saponina de colestanol **1** de Fórmula I geral. A saponina de referência seleccionada para servir de adjuvante foi a QS-21.

Foi efectuada uma experiência para verificar se as saponinas **1** e **2** podiam potenciar a produção de anticorpos específicos para antígenos e/ou influenciar o perfil isotípico de resposta de anticorpos específicos

glycosylation results were expected. Success in this endeavour should also greatly facilitate the total synthesis of QS 21 and more complete analogues in the future.

Materials and Methods

Immunostimulation tests *in vivo*

A well established model was used to determine if the Formulations of a new potentially immunostimulating saponins **1** and **2** together with aluminium hydroxide could work as optimised immunological adjuvant. Briefly, experiences to compare these Formulations of the saponins were performed and the reference immunostimulating saponin QS-21 was used separately. The new immunostimulating saponin that was selected to serve as an adjuvant was saponin of β -amiryn **2** and cholestanol saponin **1** of general Formula I. The reference saponin that was selected to serve as an adjuvant was QS-21.

An experience to determine if **1** and **2** could potentiate the production of specific antibodies to antigens, and/or to influence the isotype profile of the response of specific antibodies to antigens and of the response of functional antibodies to a subunitary antigen,

para antígenos e de resposta de anticorpos funcionais para um antígeno subunitário, a ovalbumina (OVA). Foi efectuada uma segunda experiência para determinar se as saponinas **1** e **2** podiam servir como adjuvantes para uma vacina subunitária, a ovalbumina (OVA), em ratinhos, na indução de respostas CTL e/ou respostas a anticorpos. Nesta experiência, foram testados dois adjuvantes imunitários consistindo nas saponinas **1** e **2** com doses subóptimas de QS-21 (< 2.5 µg) para determinar se a saponina **2** pode afectar o efeito adjuvante de QS-21 nestas doses mais baixas.

Determinação de resposta global a anticorpos

Ratinhos

Foram usados ratinhos BALB/C com 8 semanas de vida, provenientes do Instituto Gulbenkian de Ciência. Foram usados 4 ratos por variação.

Antígeno:

Como antígeno, foi usada ovalbumina de ovo de galinha (Sigma A2512), preparada na concentração de 1 mg/mL em PBS, 25 µg por cada ratinho.

Adjuvantes

Os adjuvantes usados foram o Inject Alum (Pierce 77161 constituído por 3-5% (p/v) de hidróxido de alumínio = Al(OH)₃ em água e pelo Adjuvante Incompleto de Freund (Sigma F-5505).

Imunomoduladores

Foram usados os seguintes compostos: QS21: *Quillaja*, Fracção 21 (purificada de GSK), na concentração de: 2 µg/mL em H₂O. Saponina **1** e saponina **2**, na concentração de 50 µg/mL em PBS.

Imunizações

Foram usados grupos de 4 ratos, tendo sido imunizados com injeções intraperitoneais, com 125 µL das Formulações descritas na Tabela 1:

ovalbumine (OVA) was performed.

A second experience to determine if **1** and **2** could serve as adjuvants for a subunitary vaccine, ovalbumine (OVA), in mice, in the induction of responses CTL and/or responses to antibodies was performed. In this experience, two immune adjuvants were tested consisting of **1** and **2** with suboptimal doses of QS-21 (< 2.5 µg) to determine if **2** can affect the adjuvant effect of QS-21 at these lower doses.

Determinations of global response to antibodies

Mice

Male BALB/C mice 8 weeks old were used, obtained from the Instituto Gulbenkian de Ciência. 4 mice were used by variation.

Antigen:

As antigen, Ovalbumine of chicken egg (Sigma A2512), prepared at the concentration of 1 mg/ml in PBS, 25 µg per mouse was used.

Adjuvants

The used adjuvants were the Inject Alum (Pierce 77161 constituted by 3-5% (p/v) of aluminium hydroxide = Al(OH)₃ in water and by Freund's Incomplete Adjuvant (Sigma F-5505).

Immunomodulators:

The following compounds were used: QS21: *Quillaja*, Fraction 21 (purified from GSK), in a concentration: of 2 µg/mL in H₂O. Saponin **1** and saponin **2** were at 50 µg/mL in PBS.

Immunisations

Groups of 4 mice, having been immunized with intraperitoneal injections, with 125 µL of the Formulations described in the following Table 1 were used:

Tabela 1 - Formulações de imunização intraperitoneal (valores em microlitros).

Table 1- Intraperitoneal immunisation formulations (values in microlitres).

Variation	PBS	Hidróxido de Alumínio Aluminium Hydroxide	QS21	F4 T4T	Adjuvante de Freund Freund's Adjuvant	OVA	Volume Total Total Volume
1	100	0	0	0	0	25	125
2	50	50	0	0	0	25	125
3	48.75	50	1.25	0	0	25	125
4	47.5	50	2.5	0	0	25	125
5	25	50	0	25	0	25	125
6	0	50	0	50	0	25	125
7	50	0	0	0	50	25	125
8	40	50	10	0	0	25	125

Datas das imunizações e da colheita de sangue:

As imunizações foram realizadas com intervalos de 15 dias e a colheita de sangue foi efectuada 3 dias antes de cada imunização. A colheita de sangue foi realizada através de um corte na zona terminal da cauda, tendo sido recolhidos 200 a 500 µL de sangue em cada animal.

Preparação do soro

O sangue colhido foi mantido a 4 °C durante 2 horas tendo sido depois centrifugado a 12,000 g durante 10 minutos a 4°C. O soro colhido foi mantido a -20 °C para ser analisado posteriormente.

Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - ELISA

Foi escolhido o teste de imunidade ELISA (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). O teste foi realizado do seguinte modo: foi preparada uma mistura em volumes iguais de amostras de soro (combinadas) para cada (mesma) variação. Foram realizados testes ELISA para verificar a produção de anticorpos após a administração de vacinas contendo as saponinas **1** e **2**. Foram usadas placas de poliestireno de 96 poços, tendo-lhe sido aplicado um volume de 50 µl do antígeno na concentração de 10 µg/mL. Em todas as variações e diluições do soro foi sempre usado um poço com um controlo no qual o antígeno não foi aplicado. A incubação foi efectuada durante 1 hora, a 37 °C. a placa foi lavada com tampão TBS (10 mM Tris-HCl e 125 mM NaCl, pH=7.5). A placa foi de seguida bloqueada com 100 µl de gelatina (BIORAD 170-6537) na concentração de 10 mg/mL, durante 1 hora à temperatura ambiente (20°C). Em seguida, a gelatina foi retirada e foram adicionados 50 µl do soro combinado de 4 ratinhos por variação. Foram efectuadas as seguintes diluições em TBS com gelatina na concentração de 1 mg/mL de série 2 (primeira diluição: 1/100, última diluição: 1/204,800). As placas foram incubadas durante 1 hora, a 30°C. decorrido esse tempo, as placas foram lavadas com TBS-T, que corresponde a TBS contendo Tween-20 (Sigma P-1379) na concentração final de 0.05% (v/v). De seguida, foram adicionados 50 µl de uma mistura de 3 soros conjugados com fosfatase alcalina: : anti-IgA (Sigma A-4937), anti-IgG (Sigma A-3438) e anti-IgM (Sigma A-9688) na diluição final de 1/10,000 cada uma. As placas foram então incubadas a 30°C, durante 1 hora. Após a incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com TBS-T e 1 vez com água destilada. Em seguida, foi adicionado o substrato *p*-nitrofenilfosfato (JT Baker 3351) na concentração de 1 mg/mL, no tampão com a seguinte composição: dietanolamina 10 mM (Merck 16205), 100 mg/l de cloreto de zinco e 100 mg/l (Merck 116763) de cloreto de magnésio hexahidratado (Merck 1,05833). As placas foram colocadas a 4°C e foram efectuadas as leituras espectrofotométricas.

Dates of immunisations and blood collection:

The immunisations were performed at intervals of 15 days and the blood collection was done 3 days before each immunisation. Collection of blood was performed starting from a cut in the terminal zone of the tail being collected from 200 to 500 µL of blood from each animal.

Preparation of the serum

The collected blood was maintained for 2 hours at 4°C, and next centrifuged at 12,000 g for 10 minutes at 4°C. The collected serum was kept at -20 °C for later analyses.

ELISA immunoassay

The chosen immunotest was the ELISA (EnzymeLink Immunoassay) test. The test was performed in the following way: A mixture in equal volumes of serum samples (combined) for each (same) variation was prepared. ELISA tests were performed to verify the production of antibodies after the administration of vaccines containing the saponins **1** and **2**. Polystyrene plates of 96 wells were used in which a volume of 50 µl of the antigen at the concentration of 10 µg/mL was applied in the plate. In all the variations and dilutions of the serum it was always used a well with a control in which the antigen was not applied. The incubation was made for 1 hour at 37 °C. The plate was washed with TBS buffer (10 mM Tris-HCl and 125 mM NaCl, pH=7.5). The plate was next blocked with 100 µl of gelatin (BIORAD 170-6537) at the concentration of 10 mg/ml, for 1 hour at room temperature (20°C). Next the gelatin was removed and 50 µl of the combined serum of 4 mice by variation was added. The following dilutions in TBS with gelatin at 1 mg/ml of series 2 were made (first dilution: 1/100, last dilution: 1/204,800). The plates were incubated for 1 hour at 30°C. After that time the plates were washed 3 times with TBS-T, that corresponds to TBS containing Tween-20 (Sigma P-1379) in the final concentration of 0.05% (v/v). Next 50 µl of a mixture of 3 serums conjugated with alkaline phosphatase was added: anti-IgA (Sigma A-4937), anti-IgG (Sigma A-3438) and anti-IgM (Sigma A-9688) in the final dilution of 1/10,000 each one. The plates were next incubated at 30°C, for 1 hour. After this incubation the plates were washed 3 times with TBS-T and 1 time with distilled water. Next the *p*-nitrophenylphosphate substratum was added (JT Baker 3351) at the concentration of 1 mg/ml in the following buffer: diethanolamine 10 mM (Merck 16205), 100 mg/l of zinc chloride and 100 mg/l (Merck 116763) of magnesium chloride hexa-hydrated (Merck 1.05833). The plates were placed at 4°C and the spectrophotometric readings were performed with the 405 nm filter.

métricas com o filtro 405 nm.

Ensaio

Foi usado o soro colhido 2 semanas após a última imunização. Foi usada uma placa de 96 poços por cada variação, onde foram efectuadas as diluições da série 2 para determinar o título dos anticorpos. Foram efectuadas 3 réplicas por cada diluição, tendo cada réplica controlo sem antígeno (Ovalbumina) e o teste foi repetido 2 vezes. É considerado positivo o resultado de um valor de absorção 3 vezes mais elevado do que o valor de absorção do controlo (poços sem antígeno) para a mesma variação e diluição do soro. Os valores estão expressos em Log_{10} do título da mistura de soro de 4 animais em cada grupo: Formulação 1, apenas com PBS; Formulação 2: com hidróxido de alumínio como único adjuvante; Formulação 3 e 4: com QS 21/SKB nas concentrações de 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 5 e 6: Saponina 2 = T4T nas concentrações de 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 7 e 8: Saponina 1 = T3T nas concentrações de 1,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 9 e 10: controlos positivos (Figura 3).

Assay

The serum collected 2 weeks after the last immunisation was used. A plate of 96 wells was used by each variation and where the dilutions of series 2 were made in order to determine the title of the antibodies. For each dilution 3 replicas were made, each replica has control without antigen (Ovalbumine) and the test was 2 times repeated. A result of an absorbance value 3 times higher than the absorbance value of the control (wells without antigen) for the same variation and dilution of the serum is considered as positive. The values are expressed as the Log_{10} of the title of the mixture of serum of 4 animals in each group: Formulation 1, just with PBS; Formulation 2: with aluminium hydroxide as the sole adjuvant; Formulation 3 and 4: with QS 21/SKB at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 5 and 6: Saponin 2 = T4T at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 7 and 8: Saponin 1 = T3T at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 9 and 10: positive controls (Figure 3).

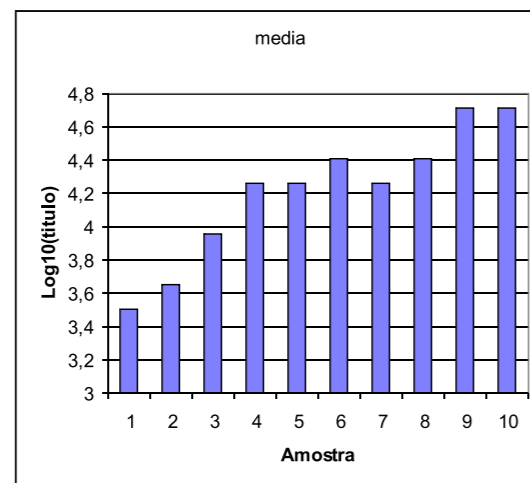


Figura 3 - Valores médios dos títulos do teste 1 e do teste 2. Os valores encontram-se expressos como Log_{10} do título de mistura de soro de 4 animais em cada grupo. O soro foi recolhido no prazo de 2 semanas após a última imunização e foi usado um volume equivalente de cada soro recolhido de cada grupo. Os valores correspondem ao valor médio mais elevado (título) de 3 réplicas para cada Formulação. Formulação 1, apenas com tampão fosfato salino (PBS); Formulação 2: com hidróxido de alumínio como único adjuvante; Formulação 3 e 4: com QS 21/SKB nas concentrações de 1.25 e 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 5 e 6: Saponina 2 = T4T nas concentrações de 1.25 e 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 7 e 8: Saponina 1 = T3T nas concentrações de 1.25 e 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulação 9 e 10: controlos positivos).

Figure 3 - Comparison between the average values of the titles of the test 1 and test 2. The values are expressed as the Log_{10} of the title of 4 animals sera mixture in each group. The serum was collected up 2 weeks after the last immunisation and an equivalent volume of each collected serum of each group was used. The values correspond to the highest average value (title) of 3 replicas for each Formulação. Formulation 1, just with PBS; Formulation 2: with aluminium hydroxide as the sole adjuvant; Formulation 3 and 4: with QS 21/SKB at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 5 and 6: Saponin 2 = T4T at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 7 and 8: Saponin 1 = T3T at the concentrations of 1.25 and 2.5 $\mu\text{g/mL}$; Formulation 9 and 10: positive controls (Figure 3).

Actividade lítica *in vitro*

Foi avaliada a actividade lítica da saponina 1 (T3T) e da saponina 2 (T4T). Nestas experiências, observou-se a existência de lise de glóbulos vermelhos com as concentrações de T3T ou T4T mais elevadas do que a QS21. Essas moléculas revelam, efectivamente, uma actividade lítica inferior à da QS21. A saponina 1 foi solubilizada a 500 $\mu\text{g/mL}$ PBSmod pH7.4.

A saponina 2 foi solubilizada a 250 $\mu\text{g/mL}$ de PBS mod pH7.4. A experiência foi efectuada 3 vezes. O primeiro teste foi efectuado com o intuito de obter uma ideia clara sobre a actividade lítica dos dois compostos (Tabela 2).

In vitro lytic activity

Lytic activity of was evaluated for the saponin 1 (T3T) and saponin 2 (T4T). In these experiments, lysis of red blood cells was observed with concentrations of T3T or T4T higher than the one of QS21. Those molecules do indeed display a lower lytic activity than QS21. Saponin 1 was solubilized at 500 $\mu\text{g/mL}$ PBSmod pH7.4.

Saponin 2 was solubilized at 250 $\mu\text{g/mL}$ PBS mod pH7.4. The experiment has been done three times. The first test was done to have a broad idea of the lytic activity of the 2 compounds (Table 2).

Tabela 1 - Actividade lítica *in vitro*

Table 2 - *In vitro* lytic activity

μg QS21	OD QS21	μg T3T	OD T3T	μg T4T	OD T4T
0	0	5	0.172	2.5	0
0.5	0	10	1.57	5	0.006
1	0.253	15	1.826	7.5	0.692
2	1.246	20	1.874	10	0.919
3	1.598	25	1.904	12.5	1.097
5	1.776				
H2O	1.767				

Teste de citotoxicidade *in vivo*

Os ratinhos C57Bl6 foram imunizados via IM,, com 5 μg de antígeno ovalbumina combinado com 5 μg ou 1 μg de QS21, moléculas T3T ou T4T (PIMS 20030304).

Foi efectuado um teste *in vivo* para monitorizar a actividade citotóxica, no seguimento de estudos anteriormente publicados através de de um teste bastante rápido, sensitivo e específico, que evita polarização devido à restimulação *in vitro*. Este teste baseia-se na injeção de duas populações de células - células-alvo de controlo e células-alvo pulsadas com o peptido de ligação de classe I dominante derivado do antígeno na corrente sanguínea dos animais vacinados.^[16] A percentagem de actividade citotóxica é calculada observando o número de alvos positivos de antígenos sobreviventes comparado com os alvos negativos de antígenos. Este método é, de longe, o teste mais sensível disponível até hoje^{ref}. Apresenta a vantagem de medir directamente a actividade citotóxica *in vivo* sem qualquer manipulação das células efectoras. Na prática, são injectadas duas populações de células marcadas CFSE - células-alvo de controlo e células-alvo pulsadas com SIINFEKL, o peptido de ligação de classe I dominante da ovalbumina via IV nos ratinhos, 5 dias após a vacinação. Os ratos são sacrificados 24 horas depois, são colhidas amostras sanguíneas e os PBLs são analisados mediante citometria de fluxo. A

In vivo testing of cytotoxicity

C57Bl6 mice have been immunised IM, with 5 μg of ovalbumin antigen combined with 5 μg or 1 μg of QS21, T3T or T4T molecules (PIMS 20030304).

In vivo assay has been used to monitor cytotoxic activity since we have previously demonstrated that it is a very fast, sensitive and specific assay, which avoid bias due to *in vitro* restimulation. This assay relies on the injection of two cell populations control target cells and target cells pulsed with the dominant class I binding peptide derived from the antigen- in the blood streams of vaccinated animals.^[16] The percentage cytotoxic activity is calculated by looking at the number of surviving antigen positive targets compared to the antigen negative targets. This method is by far the more sensitive assay available to date. It has the advantage of directly measuring *in vivo* cytotoxic activity without any manipulation of the effector cells. Practically, two CFSE labelled cell populations control target cells and target cells pulsed with SIINFEKL, the dominant class I binding peptide from ovalbumin are injected IV in the mice 5 days after vaccination. 24H later, the mice are sacrificed, blood samples are collected and PBLs are analysed using flow cytometry. The percentage cytotoxic activity is calculated by looking at the number of surviving targets pulsed with SIINFEKL peptide compared to the antigen negative targets (Figure 4).

percentagem de actividade citotóxica é calculada observando o número de alvos pulsados com peptido SIINFEKL sobreviventes, comparados com os alvos negativos de antígeno (Figura 4).

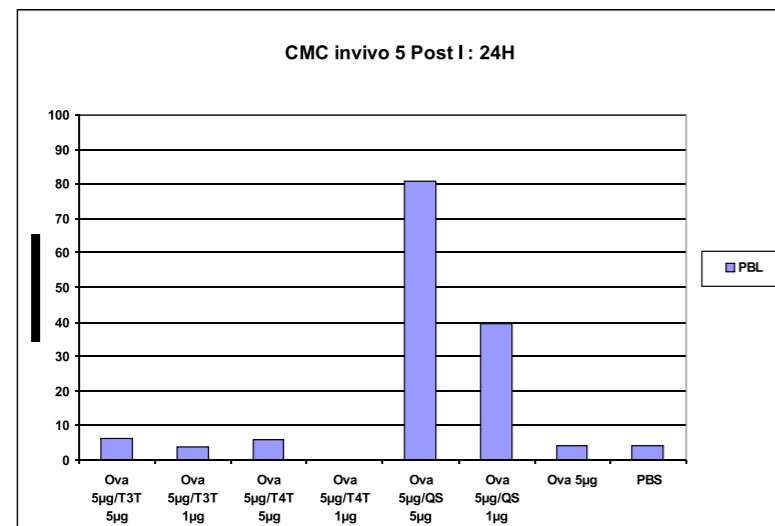


Figura 4 - Actividade citotóxica para T3T \diamond saponina 1 e T4T é a saponina 2.
Figure 4 - Cytotoxic Activity for T3T \diamond saponin 1 and T4T is saponin 2.

Resultados e Discussão

As saponinas de *Quillaja* imunoactivas naturais obtêm-se por extracção aquosa do córtex da árvore da América do Sul, *Quillaja saponaria* Molina, da família das Rosaceae. Esta árvore, descoberta no Chile, no Peru e na Bolívia, foi descrita pela primeira vez em 1782, por Juan Ignatius Molina^[17, 18] e mantém-se alvo de interesse especial devido à sua casca (casca de sabão, madeira do Panamá). O seu nome genérico deriva da palavra chilena *quillean*, que significa “lavar”. A casca da *Quillaja* é conhecida como um fármaco saponina e é usada comercialmente na indústria alimentar^[19] como agente espumante (“sapon” = sabão) nomeadamente como detergente, dentífrico e expectorante^[20]. Para além disso, a mistura de saponinas da casca possui propriedades antibióticas, anti-inflamatórias e imunoajuvantes bem como efeito retardador do colesterol plasmático.^[21] A actividade adjuvante das saponinas foi conhecida pela primeira vez quando Epinet incluiu saponinas nas vacinas veterinárias, em 1951. Mais tarde, Dalsgaard analisou saponinas provenientes de diversas espécies de plantas com vista a determinar a sua actividade adjuvante e descobriu que os adjuvantes mais potentes derivavam da *Quillaja saponaria*^[22]. Bomford *et al.*^[23], efectuaram uma comparação entre diversas saponinas extraídas de diferentes espécies de plantas que mostrou que as melhores respostas

Results and Discussion

The natural immunoactive *Quillaja* saponins are derived by aqueous extraction from the cortex of the South American tree *Quillaja saponaria* Molina, a member of the family of Rosaceae. This tree, found in Chile, Peru and Bolivia, was first described in 1782 by Juan Ignatius Molina^[17, 18] and has remained of special interest because of its bark (soap bark, Panama wood). The generic name is from Chilean word *quillean*, to wash. *Quillaja* bark is known as a saponin crude drug and has been commercially used in food industry^[19] and as foaming agent (“sapon” = soap) namely as detergent, dentifrice and expectorant^[20]. Moreover, the saponin mixture possesses antibiotic, anti-inflammatory and immunoajuvant activities as well as a plasma cholesterol lowering effect.^[21] The adjuvant activity of saponins has been known at first from the Epinet’s^[22] inclusion of saponins into veterinary vaccine in 1951. Later Dalsgaard analysed saponins from several plant species for adjuvant activity and found that the most potent adjuvants were derived from *Quillaja saponaria*^[22]. A comparison of adjuvant activities by Bomford *et al.*^[23], among several saponins extracts from different plant species showed that optimum primary antibody responses were most marked with the *quillaja* saponins, whereas secondary responses were nearly equivalent for saponins from *Quillaja saponaria* and *Gypsophilla paniculata*, lower

primárias de anticorpos eram marcadas principalmente pelas saponinas de *Quillaja*, enquanto que as respostas secundárias eram quase equivalentes para as saponinas da *Quillaja saponaria* e *Gypsophilla paniculata*, mais baixas mas detectáveis com as da *Saponaria officinalis*, e ausentes com outros extractos de saponinas (saponina da soja, alfalfa, *Chenopodium quinoa*, *Glycyrrhiza radix*). Devido ao facto de a actividade adjuvante mais forte se ter verificado com as saponinas da *Quillaja saponaria*, foi aplicado um número consideravelmente mais elevado de métodos de purificação dessas saponinas, na tentativa de separar os componentes com actividade adjuvante e os componentes tóxicos. Outra tentativa de ultrapassar a toxicidade foi a incorporação da saponina em partículas de lípidos conhecidas como ISCOMs.

A actividade imunoajuvante *in vitro* dos análogos de saponina 1 e 2 foi avaliada através de métodos bem conhecidos.^[24] Foi usada a secreção de mediadores celulares no meio de cultura após a estimulação de células apresentadoras de antígeno, mediante as moléculas 1 e 2, para avaliar a sua actividade adjuvante. O método requer a incubação do adjuvante, na ausência do antígeno, com as células durante 24 horas. Após esse tempo, é retirado o sobrenadante para quantificar os mediadores celulares pró-inflamatórios, principalmente as citocinas, IL-6 e IL-1 (interleucina), TNF- α (factor de necrose tumoral) e protóxido de azoto.

A actividade adjuvante *in vivo* foi igualmente avaliada por métodos bem conhecidos.^[25] Os títulos dos anticorpos podem ser calculados a partir do soro de ratinhos Balb/c imunizados com ovalbumina administrada subcutaneamente, juntamente com moléculas de hemi-síntese 1 e 2. Os aumentos dos títulos podem ser usados para avaliar a actividade imunoajuvante das saponinas.

O método usado para a avaliação preliminar das actividades imunomoduladoras requer a incubação do adjuvante com as células durante um período de 24 horas, na ausência de antígeno, seguido da separação do sobrenadante para quantificação dos mediadores celulares pró-inflamatórios, principalmente citocinas, IL-6 e IL-1 (interleucina), TNF- α (factor de necrose tumoral) e protóxido de azoto. A citotoxicidade das saponinas 1 e 2 foi avaliada usando uma amostra de QS-21 como referência (SmithKline Beecham Biolog BE), fracção purificada de extracto da casca da árvore *Quillaja saponaria*, que apresentou um efeito citotóxico maior quando foi avaliado nas células da linha J-744A.1. Verificou-se que a citotoxicidade observada depende da concentração das moléculas 1 e 2 análogas da QS no meio de cultura, sempre que as concentrações sejam superiores a 0,63 $\mu\text{g/mL}$. Para além disso, observou-se que nas concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g/mL}$ as células não sobrevivem, sendo assim possível considerar que, nestas concentrações, a

but detectable with *Saponaria officinalis*, and absent with the other saponins' extracts (soyasaponin, alfalfa, *Chenopodium quinoa*, *Glycyrrhiza radix*). Because the strongest adjuvant activity was noted with saponins from *Quillaja saponaria*, a considerably higher number of purification methods have been applied to these crude saponins in an attempt to separate the adjuvant active components from the toxic ones. Another approach to overcoming the toxicity has been the incorporation of the saponin into lipid particles known as ISCOMs.

The *in vitro* immunoajuvant activity of the saponin analogues 1 and 2 was evaluated by well-known methods.^[24] The secretion of cell mediators in the culture medium after stimulation of antigen presenting cells with the molecules 1 and 2 was used to assess their adjuvant activity. The method needs incubation of the adjuvant, in the antigen absence, with the cells for 24 hours, after what the supernatant is removed for the quantification of the pro-inflammatory cell mediators, mainly the cytokines, IL-6 and IL-1 (interleukine), TNF- α (tumour necrosis factor) and nitrous oxide.

The *in vivo* adjuvant activity was evaluated equally by well-known methods.^[25] The titres of antibodies can be assessed in the serum of the Balb/c mice immunized with subcutaneously administered ovalbumine together with the hemi-synthesis of saponin 1 and 2. The increments of the titres can be used to evaluate the immunoajuvant activity of both the saponins 1 and 2.

The method used for the preliminary evaluation of the immunomodulator activities needs incubation of the adjuvant with the cells for 24 hours, in the absence of antigen, followed by separation of the supernatant for the quantification of the pro-inflammatory cell mediators, mainly the cytokines, IL-6 and IL-1 (interleukine), TNF- α (tumour necrosis factor) and nitrous oxide. The cytotoxicity of saponins 1 and 2 was evaluated using QS-21 sample used as reference (SmithKline Beecham Biolog BE), purified fraction of the bark extract of the *Quillaja saponaria* M. tree, which presented a greater cytotoxic effect when evaluated in the cells of the line J-744A.1. The observed cytotoxicity was found dependent on the concentration of the QS analogue molecules 1 and 2 in the medium when the concentrations are higher than 0.63 $\mu\text{g/mL}$. Besides, it should be underlined that at the concentrations of 20 and 40 $\mu\text{g/mL}$ there is no cell survival, being possible to consider that at these concentrations the cytotoxicity is total. The macrophages when stimulated, produce and release regulator molecules such as cytokines, chemokines and nitrous oxide. Among these releasable substances, the interleukine 6 (IL-6), the tumour necrosis factor (TNF- α) and also the nitrous oxide (NO) were quantified. Besides the stimulation the cytotoxicity of the saponins 1 and 2 that can be supplied was also evaluated. The

citotoxicidade é total. Ao serem estimulados, os macrófagos produzem e libertam moléculas reguladoras tais como citoquinas, quimioquinas e protóxido de azoto. Entre estas substâncias libertadas, foram quantificadas a interleucina 6 (IL-6), o factor de necrose tumoral (TNF- α) e ainda o protóxido de azoto (NO). Para além da estimulação, foi também avaliada a citotoxicidade que pode ser obtida com as saponinas **1** e **2**. Como controlos, usaram-se diversos extractos de casca de *Quillaja saponaria* purificados e LPS, lipopolissacarido de *E. coli*. Os títulos dos anticorpos foram obtidos no soro dos ratinhos Balb/c imunizados com ovalbumina administrada subcutaneamente em conjunto com moléculas de hemi-síntese da presente invenção. Os incrementos dos títulos permitem avaliar a actividade imunoadjuvante das saponinas **1** e **2**.

A Figura 4 mostra os valores mais elevados para os títulos observados por variação. A partir destes números, podemos retirar as seguintes conclusões:

- Para as mesmas concentrações, obtém-se um título mais elevado com as saponinas **1** e **2** do que para a QS 21.

- As saponinas **1** e **2** na concentração de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ são comparáveis ao adjuvante incompleto de Freund e a QS21 a 10 $\mu\text{g/mL}$.

- Os títulos obtidos para a saponina **2** são mais elevados do que para a **1** e ainda mais elevados do que para a QS 21 em termos de indução de uma resposta imunológica ao antigénio.

- Em média, os testes com a saponina **2** (amostras 7 e 8) apresentam valores mais elevados do que a QS 21 para a mesma concentração (3 e 4).

- O teste em que foi usado apenas o tampão PBS apresenta, em média, o valor mais baixo.

- A saponina **2** inclui o adjuvante hidróxido de alumínio (igual às amostras 3 a 8, excepto a 7 com adjuvante de Freund). Qualquer efeito de estimulação teria de ser sempre mais elevado do que o valor da amostra 2, o que se confirma.

- Obtém-se os maiores valores médios para ambos os adjuvantes de Freund e QS 21 a 10 $\mu\text{g/mL}$ (controlos positivos, amostras 9 e 10).

- Pelos resultados obtidos, os compostos **1** e **2** apresentam capacidade imunoestimuladora.

Posteriormente, foram efectuados mais testes de actividade hemolítica e citotóxica com o intuito de obter critérios acerca dos aspectos mais importantes relacionados com o desenvolvimento dos adjuvantes, que dizem respeito à relação risco/benefício dependendo da garantia de uma margem de segurança fiável. Resultados de trabalhos anteriores demonstraram que as saponinas **1** e **2** constituem também um eficaz sistema apresentador de antigénio, semelhante ao das saponinas de *Quillaja*, induzindo *in vitro* a produção de células mediadoras pró-inflamatórias, tais como citoquinas IL-6, IL-1, TNF- α

controls used were several purified extracts of bark of *Quillaja saponaria* and LPS, liposaccharide originated from *E. coli*. The titles of antibodies were assessed in the serum of the Balb/c mice immunized with subcutaneously administered ovoalbumine together with the hemi-synthesis molecules **1** and **2**. The increments of the titles can be used to evaluate the immunoadjuvant activity of the saponins **1** and **2**.

Figure 4 presents the higher values for the titles observed by variation. From these figures the following conclusions can be withdrawn:

- For the same concentrations, it is obtained a higher title with the saponins **1** and **2** than for QS 21.

- The saponins **1** and **2** at the concentration of 2.5 $\mu\text{g/mL}$ are comparable with the Freund's incomplete adjuvant and QS21 at 10 $\mu\text{g/mL}$.

- The titles obtained for the saponin **2** are higher than for **1** and also higher than for QS21 in terms of induction of a immunological response to the antigen.

- In average the tests with the saponin **2** (samples 7 and 8) present higher values than the QS21 for the same concentration (3 and 4).

- The test using PBS buffer only, presents in average the lowest value.

- Sample 2 includes the aluminium hydroxide adjuvant (common to samples 3 to 8, except 7 with Freund's Adjuvant). Any stimulation effect would have to be always higher than the value of sample 2, what is confirmed.

- For the two adjuvants Freund and QS 21 at 10 $\mu\text{g/ml}$ (positive controls, samples 9 and 10) the largest average values are obtained.

- By the obtained results, compounds **1** and **2** present immunostimulating capacity.

Further assays of haemolytic activity and cytotoxicity were performed in order to get insights on the most important issues in the adjuvant development which are the risk/benefit ratio depending on the guarantee of a reliable safety window. In previous studies the saponins **1** and **2** constitute an effective system of antigen presentation similar to quillaja saponins, inducing *in vitro* the production of pro-inflammatory cell mediators, such as cytokines IL-6, IL-1, TNF- α and nitrous oxide by macrophages.^[28] Compound **1** for instance, induced the production of IL-6, when used at concentrations higher than 1,25 $\mu\text{g/ml}$ ³⁶. Furthermore, simple analogues **1** and **2** were shown to be less toxic than QH-B, QH-C, Spikoside and **QS-21**, inhibiting the synthesis of the cell mitochondrial dehydrogenase at concentrations higher than 5 $\mu\text{g/ml}$ ^[28], whereas the quillaja saponins fractions showed to be cytotoxic in the cell line at concentrations higher than 1,25 $\mu\text{g/ml}$.^[28]

e protóxido de azoto através de macrófagos.^[28] O composto **1**, por exemplo, induziu a produção de IL-6, quando usado em concentrações mais elevadas do que 1,25 $\mu\text{g/mL}$.^[28]

A saponina **1** revelou actividade levemente lítica a 5 μg e lítica a 7,5 μg . A saponina **2** não foi lítica a 6,25 μg e foi levemente lítica a 7,5 μg , sendo portanto lítica mas apresentando aproximadamente metade da actividade lítica da saponina **1** para a mesma quantidade. Em conclusão, 7,5 μg de saponina **1** origina uma lise comparável à que se observa com 10 μg de saponina **2**. Estes resultados podem ser comparados com a água para a qual a lise obtida é total, representando portanto 100% de lise. O intervalo PBS foi de 0%. Os resultados foram assim expressos em percentagem comparados à água (apenas a título indicativo). A QS21 mostrou induzir nos ratinhos uma resposta CD8 efectora potencial após uma única imunização. Os glucósidos imunoestimuladores sintéticos (T3T/saponina **1** e saponina **2**/T4T), que têm uma estrutura química comum à da QS21 mas não contêm função aldeído e cadeia acilo, foram avaliados pela sua capacidade de induzir actividade citotóxica *in vivo*. Contrariamente ao que se observou nos ratinhos imunizados com QS21, não foi detectada resposta citotóxica das saponinas **1**/T3T e **2**/T4T em animais imunizados. Os resultados obtidos são comparáveis a estudos anteriores que indicam que se observou maior eficácia na libertação com a QS-21 acilada, menos actividade com **DS-1** e **DS-2** não-acilada (Figura 5), e actividade ainda mais baixa com **QS-L1 (QH-957)**.^[26] Isto pode indicar uma relação entre a estrutura da saponina e o aumento de permeação na membrana epitelial, bem como propriedades surfactantes, particularmente no que se refere aos títulos hemolíticos. Além disso, embora a presença de aldeído no triterpeno C-4 ajude no aumento da permeação, ainda não foi considerado absolutamente indispensável.^[26]

Saponin **1** was slightly lytic at 5 μg and lytic at 7.5 μg . Saponin **2** was not lytic at 6,25 μg and was slightly lytic at 7.5 μg , thus being lytic but approximately half the lytic activity of saponin **1** for the same amount. In conclusion, 7.5 μg of saponin **1** gives a lysis that is comparable to the one observed with 10 μg of saponin **2**. Those results could compare to water for which the lysis obtained is total and represents thus 100% lysis. The PBS blank was 0%. The results were then expressed as a percentage compared to water (only indicative). In our assays, QS21 has been shown to induce potent effector CD8 response in mice after a single immunisation. Synthetic immunostimulant glycosides (T3T/saponin **1** and saponin **2**/T4T) which have common chemical structure with QS21 but which do not contain aldehyde function and acyl chain have been evaluated for the ability to induce *in vivo* cytotoxic activity. In contrast to what is observed in QS21 immunised mice, no cytotoxic response could be detected in T3T/saponin **1** and T4T/saponin **2** in immunised animals. Our results compare with previous studies indicating that the highest deliver efficiency was observed with the acylated **QS-21**, less activity with non-acylated **DS-1** and **DS-2** (Figure 5), and still lower activity with **QS-L1 (QH-957)**.^[26] This may suggest a relationship between saponin structure and permeation enhancement in the epithelial membrane, as well as surfactant properties, particularly for hemolytic titers. Further, the presence of the aldehyde on triterpene C-4 aids in permeation enhancement, although it has not been considered absolutely crucial.^[26]

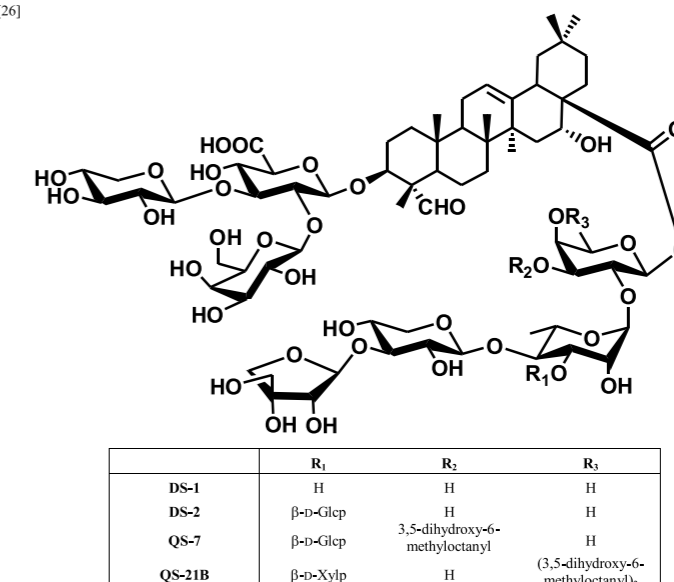


Figura 5 - Estrutura de saponinas **DS-1**, **DS-2**, **DS-7** e **QS-21B**.
Figure 5 - Structure of saponins **DS-1**, **DS-2**, **DS-7** and **QS-21B**.

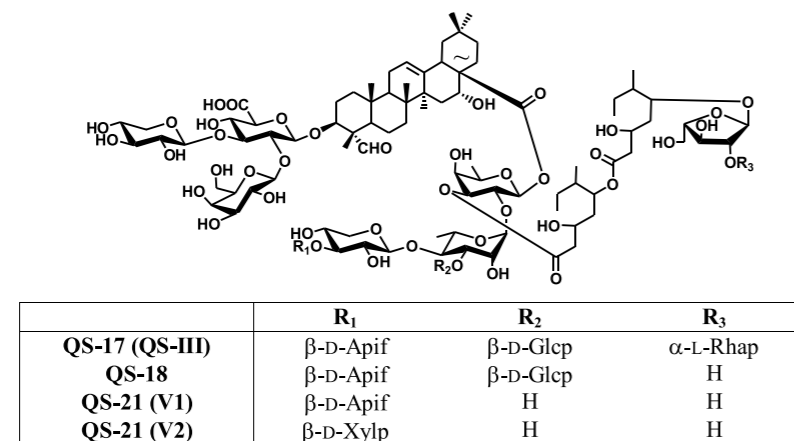


Figura 6 - Estrutura das saponinas QS-17, QS-18 e QS-21 isômeros V1 e V2.
Figure 6 - Structure of saponins QS-17, QS-18 and QS-21 isomers V1 and V2.

A primeira análise completa da estrutura destas fracções purificadas foi levada a cabo por Higuchi *et al.*^[29], para a QS-17, através de um método de purificação de cromatografia corrente, com uso de conta-gotas e com coluna de fase revertida (Figura 5). A estrutura molecular da QS-18 foi caracterizada por van Setten *et al.*^[30] através de uma espectroscopia de massas tandem de estágios múltiplos com ionização “nanoelectropulverização”. A caracterização molecular da QS-21, assim como os seus isômeros foram descritos por Kensil *et al.*^[31,32] A QS-21 (inicialmente QS-21A) é convertida para uma mistura equilibrada de dois regioisômeros, QS-21A e QS-21B, numa proporção de 20:1, como resultado da migração do grupo acil entre O-3 e O-4 do resíduo de fucose.^[31] Além disso, provou-se que a QS-21 seria depois dissolvida em dois picos usando cromatografia de interação hidrofílica de alta eficácia para suportar os isômeros estruturais V1 e V2 na proporção 2:1, contendo cada um, respectivamente, apiose ou fracções de xilose no terminal C-28 da cadeia tetrasacarídica.^[33]

A estrutura química única das saponinas *Quillaja saponaria* torna-as estimulantes do sistema imunitário excepcionais. Estas saponinas aciladas com uma estrutura relacionada estimulam a resposta do tipo Th1 a são os únicos adjuvantes conhecidos até hoje capazes de estimular a produção de respostas CTL contra proteínas exógenas.^[34] alguns estudos de estrutura/função mostraram que um aldeído triterpeno é responsável pela resposta imune do tipo Th1, enquanto uma fracção de ácido gordo participa na formação de CTL.^[35] A natureza anfifática das saponinas permite-lhes actuar como agentes activos de superfície nas membranas celulares por intercalação com o colesterol, forçando um rearranjo da camada lipídica, conduzindo, portanto, à formação de poros.^[36,37] Estes, por outro lado, poderão permitir que

The first complete structural analysis of these purified fractions was carried out by Higuchi *et al.*^[29], for QS-17, through a purification method of droplet counter current chromatography and reversed phase column. The molecular structure of QS-18 was characterized by van Setten *et al.*^[30] using a nanoelectrospray ion trap multiple-stage tandem mass spectroscopy. And QS-21 molecular characterization was reported by Kensil *et al.*^[31,32] as well as its isomers. QS-21 (primarily QS-21A) is converted to an equilibrium mixture of two regioisomers, QS-21A and QS-21B, in a ratio 20:1, as a result of acyl group migration between O-3 and O-4 of the fucose residue.^[31] Moreover, QS-21 was shown to be further resolved into two peaks using high performance hydrophilic interaction chromatography, to afford the structural isomers V1 and V2 in a ratio 2:1, each having apiose or xylose moieties respectively on the terminal C-28 tetrasaccharide chain.^[33]

The unique chemical structure of *Quillaja saponaria* saponins makes them exceptional immune system stimulants. These structurally related acylated saponins stimulate Th1 response and are the only adjuvants reported to date capable of stimulating the production of CTL responses against exogenous proteins.^[34] Structure/function studies have shown that a triterpene aldehyde is responsible for the Th1 immune response, while a fatty acid moiety participates in CTL formation^[35]. Saponins' amphipathic nature, allows them to act as surface-active agents on the cell membranes by intercalation with cholesterol, forcing a lipid rearrangement, and thus leading to formation of pores.^[36,37] These, on the other hand, could allow exogenous antigen to gain access to the cytoplasm of APC for CTL induction. Furthermore, they may stimulate interaction of the antigen with lymphocytes by increasing the permeability of intestinal membranes, with a resulting enhancement of the humoral immune response, and

antígeno exógeno tenha acesso ao citoplasma das células apresentadoras de antígeno para a indução de CTL. Podem ainda estimular a interacção do antígeno com os linfócitos através do aumento da permeabilidade das membranas intestinais, resultando no aumento da resposta imune humoral, e conferindo-lhes uma utilização potencial nos procedimentos de imunização oral.^[21] É possível que a disposição hexagonal dos poros das membranas celulares tratadas com a saponina *quillaja* desempenhem um papel neste processo, já que outras saponinas com estruturas diferentes, de diferentes espécies de plantas, mostraram ser adjuvantes não-ativos, embora formassem complexos porosos.^[37] É essencial conhecer a estrutura destas saponinas e a relação estrutura/função para poder explicar as suas características adjuvantes únicas.

A desacilação das saponinas *quillaja* teve ainda como resultado uma redução da sua capacidade estimuladora, tanto na resposta linfoproliferativa como na formação de respostas CTL contra antígenos exógenos^[34,35], o que mostrou a importância dos resíduos de ácido gordo na distribuição de antígenos solúveis através da membrana da célula. Aparentemente, as mesmas cadeias acilo são responsáveis pela toxicidade e instabilidade das saponinas em condições fisiológicas.^[34] A clivagem da cadeia acilo durante o processo de armazenamento das vacinas pode conduzir a uma mudança da resposta imune do tipo Th1 para a Th2, conduzindo portanto a um aumento da imunidade à doença.^[34] O domínio ácido gordo foi também, por si só, inactivo na estimulação de anticorpos e de respostas CTL.^[40] No entanto, a QS-7, uma saponina hidrofílica com um alto grau de glicosilação e uma unidade² mais curta de acilo gordo, quando comparada com a QS-21, mostrou poder estimular respostas a anticorpos^[27] e respostas CTL classe I MHC^[39], apesar de exigir uma dose mínima mais elevada para alguns antígenos. Já que o resíduo de glicose adicional não interfere na adjuvanticidade, pode ser a cadeia de ácidos gordos mais curta que contribui para o aumento das respostas imunes, quando comparado com as saponinas DS e com os análogos 1 e 2 de saponinas não-aciladas.

Conclusão

Os trissacarídeos de colestanol e amirina 1 e 2 aqui descritos (ver Figura 2), preparados por hemi-síntese, usando cortiça e colesterol como fontes de terpeno, demonstraram actividades imunopotenciadoras e/ou imunomoduladoras ao estimularem crescentes respostas imunes *in vitro* em animais, revelando um potencial para serem usados adequadamente em vacinas farmacêuticas veterinárias e para os seres humanos.^[39]

making them a potential use in oral immunization procedures.^[21] It is possible that the hexagonal array of pores of the quillaja saponin-treated cell membranes may play a role in this process, since other structurally diverse saponins from different plant species, although forming porous complexes were shown to be adjuvant non-active.^[37] An understanding of the structure of these saponins and the structure/function relationship is essential to explain their unique characteristics as adjuvants.

Deacylation of quillaja saponins also resulted in a reduction of their capacity to stimulate either a lymphoproliferative response or the formation of CTL responses against exogenous antigens,^[34,35] indicating the importance of the fatty acid residues in the delivery of soluble antigens across the cell membrane. The same acyl side chains appear to be responsible for the toxicity and instability of the saponins under physiological conditions.^[34] Acyl chain cleavage during vaccine storage can lead to a switch from Th1 to Th2 immune response and thus leading to immune enhancement of disease.^[34] The fatty acid domain alone was also inactive to stimulate antibody or CTL responses.^[39] However QS-7, a hydrophilic saponin having a higher degree of glycosylation and a shorter fatty acyl unit², when compared to QS-21, has been shown to stimulate both antibody responses^[27] and class I MHC CTL responses,^[40] although requiring a higher minimum dose for some antigens. Since the additional glucose residue doesn't interfere in adjuvanticity, it may be the shorter fatty acid chain that contributes to the enhancement of immune responses, when compared to DS-saponins, and to monodesmosidic non-acylated saponin analogues 1 and 2.

Conclusion

Cholesterol and amiryn trisaccharides 1 and 2 which were prepared by hemi-synthesis using cork and cholesterol as terpene sources have demonstrated immunopotentiator and/or immunomodulator activities since they stimulated increasing immune responses *in vitro* and in animals revealing a potential for suitable use for veterinary and human pharmaceutical vaccines.^[28]

The addition of saponins 1 and 2 to an alum-adjuvanted OVA conjugate vaccine increased *in vivo* primary titers of antibodies in the serum of the Balb/c mice over the mice alum-adjuvanted alone. Comparative studies on the titers of antibodies induced by saponins 1 and 2 relatively to QS-21 (alum-adjuvanted) and Freund's incomplete adjuvant (IFA) (adjuvanted alone), were performed. At different immunoadjuvant concentrations, higher titers (1.25 µg/ml, 2.5 µg/ml) and comparable titers (10 µg/ml) of antibodies were obtained for α-amiryn trisaccharide 2 relatively to QS-

A adição das saponinas **1** e **2** à vacina conjugada com OVA e alum aumentou os títulos primários de anticorpos *in vivo* do soro dos ratinhos Balb/c, superando o adjuvante alum isolado.

Foram efectuados estudos comparativos entre títulos dos anticorpos induzidos pelas saponinas **1** e **2** relativamente a QS-21 (adjuvado com alum) e ao adjuvante de Freund incompleto (IFA) (adjuvado isolado). Em diferentes concentrações imunoadjuvantes, obtiveram-se títulos mais elevados (1,25 µg/mL, 2,5 µg/mL) e títulos comparáveis (10 µg/mL) de anticorpos para o trissacarido da α-amirina **2** relativamente à QS-21 e títulos comparáveis de anticorpos (2,5 µg/mL) para o IFA. O trissacarido α-amirina **2** revelou-se ainda um estimulador de anticorpos mais forte do que o trissacarido do colestanol **1**.^[28]

Deverão prosseguir os estudos sintéticos com o objectivo de introduzir o grupo aldeído em C4 e uma cadeia de ácido gordo para construir um análogo sintético da saponina de *Quillaja* racionalmente optimizado para ser testado como substituto de adjuvante de vacina da saponina natural Qs21.

21 and comparable antibody titers (2.5 µg/ml) to IFA. α-Amyrin trisaccharide **2** also proved to be a stronger antibody stimulator than cholestanol trisaccharide **1**.^[28]

Further synthetic studies shall be performed in order to introduce the aldehyde group a C4 and a fatty acid chain to build a rationally optimized synthetic analogue of *Quillaja* saponin to be tested as a substitute vaccine adjuvant for natural saponin Qs21.

Referências / References

- [1] M. Singh, D. O'Hagan, *Nature Biotechn.* 1999, 17, 1075-1081.
- [2] a) V. E. Schijns, *Current Opinion in Immunology* 2000, 12, 456-463.
- [3] B. Rönnberg, M. Fekadu, S. Behboudi, B. Morein, *Vaccine* 1995, 13, 1375-1382.
- [4] I. G. Barr, A. Sjölander, J. C. Cox, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 247-271.
- [5] Maharaj, K. J. Froh, J. B. Campbell, *Can. J. Microbiol.* 1986, 32, 414-420.
- [6] J. B. Campbell, Y. A. Peerbaye, *Res. Immunol.* 1992, 143, 526-530.
- [7] C. R. Kensil, S. Soltysik, D. A. Wheeler, J.-Y. Wu, in *Saponins used in Traditional and Modern Medicine*, (Eds Waller, Yamasaki), Plenum Press, New York, 1996, pp 185-193.
- [8] M. T. Scott, M. Goss-Sampson, R. Bomford, *Int. Archs Allergy appl. Immun.* 1985, 77, 409-412.
- [9] M. Inês Passos Eleutério, Jörg Schimmel, Gerd Ritter, Maria do Céu Costa, and Richard R. Schmidt, Synthesis of Saponins with Allobetulin and Glycyrrhetic Acid as Aglycones, *Eur. J. Org. Chem.*, November, 2006;
- [10] J. Schimmel, et al., *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 7, 1701-1721.
- [11] M. C. Costa, et al., Patent PT 102 685, publ. 2003-05-30.
- [12] Higuchi, Y. Tokimitsu, T. Komori, *Phytochemistry* 1988, 27, 1165-1168.
- [13] S. Soltysik, D. A. Bedore, C. R. Kensil, *Ann New York Acad. Sci.* 1993, 690, 392-395.
- [14] Nathan, C.F., *J. Clin. Invest.*, 1987, 79: 319.
- [15] Mosman, T., *J. Immunol. Method.*, 1983, 65: 55.
- [16] Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Oehen, S., Odermatt, B., Zinkernagel, R.M., Hengartner, H. and Pircher, H., 1997. Peptide antigen treatment of naive and virus-immune mice: antigen-specific tolerance versus immunopathology. *Immunity* 6, pp. 519-529, 1997
- [17] C. R. Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* 1996, 13, 1-55.
- [18] C. R. Kensil, S. Soltysik, D. A. Wheeler, J.-Y. Wu, in *Saponins used in Traditional and Modern Medicine*, (Eds Waller, Yamasaki), Plenum Press, New York, 1996, pp 185-193.
- [19] S. Sen, H. P. S. Makkar, S. Muetzel, K. Becker, *Lett. Applied Microb.* 1998, 27, 35-38.
- [20] R. Higuchi, Y. Tokimitsu, T. Fujioka, T. Komori, T. Kawasaki, D. G. Oakenful, *Phytochemistry* 1987, 26, 229-235.
- [21] Maharaj, K. J. Froh, J. B. Campbell, *Can. J. Microbiol.* 1986, 32, 414-420.
- [22] I. G. Barr, A. Sjölander, J. C. Cox, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998, 32, 247-271.
- [23] R. Bomford, M. Stapleton, S. Winsor, J. E. Beesley, E. A. Jessup, K. R. Price, G. R. Fenwick, *Vaccine* 1992, 10, 572-577.
- [24] S. Behboudi, B. Morein, M. C. Villacres-Eriksson, *Clin. Exp. Immunol.* 1996, 105, 26-30.
- [25] Cleland, J.L, Kensil, C.R.; Lim, N.; Jacobsen, N.E.; Basa, L.; Spellman, M; Wheeler, D.S.; Wu, J.Y. and Powell, M.F., *J. Pharm. Sci.*, 1996, 85: 22.
- [26] D. J. Pillion, J. A. Amsden, C. R. Kensil, J. Recchia, *J. Pharm. Sci.* 1996, 85, 518-524.
- [27] a) C. R. Kensil, U. Patel, M. Lennick, D. Marciani, *J. Immunol.* 1991, 146, 431-437. b) D. J. Marciani, A. K. Pathak, R. C. Reynolds, L. Seitz, R. D. May, *Int. Immunopharmacology* 2001, 1, 813-818.
- [28] M. C. Costa, L. Green, R. R. Schmidt, S. Ley, M. I. Eleutério, S. Alves, C. Rubalcava, F. Cardoso, J. Schimmel, G. Ritter, "New Immunomodulator Agents, Methods for their Preparation and their Use in Vaccines", PCT application N. PT/200016, 2002.
- [29] Higuchi, Y. Tokimitsu, T. Komori, *Phytochemistry* 1988, 27, 1165-1168.
- [30] D. C. van Setten, G. J. ten Hove, E. J. H. J. Wiertz, J. P. Karmeling, G. Van de Werken, *Anal. Chem.* 1998, 70, 4401-4409.
- [31] N. E. Jacobsen, W. J. Fairbrother, C. R. Kensil, A. Lim, D. A. Wheeler, M. F. Powell, *Carbohydr. Res.* 1996, 128, 1-14.
- [32] S. Soltysik, D. A. Bedore, C. R. Kensil, *Ann New York Acad. Sci.* 1993, 690, 392-395.
- [33] Higuchi, Y. Tokimitsu, T. Komori, *Phytochemistry* 1987, 26, 2357-2360.
- [34] D. J. Marciani, J. B. Press, R. C. Reynolds, A. K. Pathak, V. Pathak, L. E. Gundy, J. T. Farmer, M. S. Koratich, R. D. May, *Vaccine* 2000, 18, 3141-3151.
- [35] D. J. Marciani, A. K. Pathak, R. C. Reynolds, L. Seitz, R. D. May, *Int. Immunopharmacology* 2001, 1, 813-818.
- [36] J. B. Campbell, Y. A. Peerbaye, *Res. Immunol.* 1992, 143, 526-530.
- [37] C. R. Kensil, *Crit. Rev. Ther. Drug Carr. Sys.* 1996, 13, 1-55.
- [38] S. Soltysik, J.-Y. Wu, J. Recchia, D. A. Wheeler, M. J. Newman, R. T. Coughlin, C. R. Kensil, *Vaccine* 1995, 13, 1403-1410.
- [39] D. C. van Setten, G. van de Werken, *Saponins used in Traditional and Modern Medicine*, (Eds Waller, Yamasaki), Plenum Press, New York, 1996, pp 165-172.
- [40] C. R. Kensil, J. Y. Wu, C. A. Anderson, D.A. Wheeler, J. Amsden, *Dev. Biol. Stand* 1998, 92, 41-47.