



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 367 441**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 38/21** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05775596 .9**  
96 Fecha de presentación : **29.07.2005**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1773395**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.04.2007**

54 Título: **Procedimiento para el control del colesterol con una mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos.**

30 Prioridad: **30.07.2004 US 592121 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**03.11.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**03.11.2011**

73 Titular/es: **CEL-SCI Corporation**  
**Suite 802, 8229 Boone Boulevard**  
**Vienna, Virginia 22182, US**

72 Inventor/es: **Kersten, Geert y**  
**Talor, Eyal**

74 Agente: **Curell Aguilá, Marcelino**

ES 2 367 441 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para el control del colesterol con una mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos.

5 **Introducción**

La presente invención se refiere a una mezcla libre de suero y libre de mitógenos, compuesta de proporciones específicas de citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y GM-CSF con respecto a la interleucina 2 (IL-2), tal como la inyección de interleucina leucocitaria (LI) o Multikine®, así como a los métodos para tratar o evitar enfermedades o trastornos, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, dislipoproteinemia, hiperlipidemia, trastorno del metabolismo de la glucosa, síndrome X, trastorno asociado al receptor activado por proliferadores de peroxisomas, obesidad, hipertensión y enfermedades renales.

**Antecedentes de la invención**

Las pruebas que vinculan un nivel elevado de colesterol en suero con una enfermedad coronaria (CHD) son abrumadoras; las CHD son la principal causa de fallecimiento entre mujeres y hombres estadounidenses. Se ha demostrado que la obesidad, la hiperlipidemia, la dislipidemia, la dislipoproteinemia y la diabetes desempeñan un papel causal en las enfermedades cardiovasculares ateroscleróticas. Además, una enfermedad del ser humano, denominada «síndrome X» o «síndrome metabólico» se manifiesta a través de un metabolismo anormal de la glucosa (resistencia de la insulina), una elevada presión sanguínea (hipertensión) y un desequilibrio lipídico en sangre (dislipidemia). Ver Reaven, 1993, Annu. Rev. Med. 44:121-131.

El colesterol circulante transportado mediante lipoproteínas plasmáticas, que son partículas de una compleja composición lipídica y proteica que transportan lípidos en la sangre, contribuye a la aparición de enfermedades. La lipoproteína de baja densidad (LDL) y la lipoproteína de alta densidad (HDL) son las principales proteínas transportadoras de colesterol. Se cree que la LDL es la responsable del suministro del colesterol desde el hígado, donde se sintetiza o se obtiene a partir de fuentes alimenticias, a tejidos extrahepáticos del organismo. La expresión «transporte inverso de colesterol» describe el transporte de colesterol desde tejidos extrahepáticos hasta el hígado, donde se cataboliza y se elimina. Se cree que las partículas de HDL del plasma desempeñan un papel fundamental en el proceso de transporte inverso, actuando como depuradoras del colesterol tisular. La HDL también es responsable de la eliminación de lípidos que no son colesterol, del colesterol oxidado y de otros productos oxidados procedentes del torrente sanguíneo.

La aterosclerosis, por ejemplo, es una enfermedad progresiva de evolución lenta que se caracteriza por la acumulación de colesterol dentro de la pared arterial. Existen pruebas contundentes que respaldan la creencia de que los lípidos depositados en lesiones ateroscleróticas proceden principalmente de las lipoproteínas plasmáticas que contienen apolipoproteína B (apo B), entre las que se incluyen quilomicrones, VLDL, IDL y LDL. La lipoproteína que contiene apo B, y en concreto la LDL, ha pasado a ser popularmente conocida como el colesterol «malo». Por el contrario, los niveles de HDL en suero presentan una correlación inversa con las enfermedades coronarias; de hecho, los niveles elevados de HDL en suero se consideran un factor de riesgo negativo. Existe la hipótesis de que los altos niveles de HDL en plasma no sólo protegen frente a enfermedades arteriales coronarias, sino que incluso pueden provocar el retroceso de la placa aterosclerótica (por ejemplo, ver Badimon et al., 1992, Circulation 86:(supl. 111) 86-94; Dansky y Fisher, 1999, Circulation 100: 1762-3.). Así pues, la HDL ha pasado a conocerse popularmente como el colesterol «bueno».

**Transporte de colesterol**

El sistema de transporte de grasas puede dividirse en dos vías: una exógena, para el colesterol y los triglicéridos absorbidos del intestino, y otra endógena, para el colesterol y los triglicéridos que acceden al torrente sanguíneo desde el hígado y otros tejidos no hepáticos.

En la vía exógena, las grasas alimenticias son empaquetadas en partículas lipoproteicas denominadas quilomicrones, que acceden al torrente sanguíneo y suministran sus triglicéridos al tejido adiposo para su almacenamiento y a los músculos para su oxidación para el suministro de energía. El resto del quilomicrón, que contiene ésteres de colesterilo, es eliminado de la circulación mediante un receptor específico que sólo se encuentra en las células hepáticas. Posteriormente, este colesterol pasa a estar disponible de nuevo para el metabolismo celular o para proceder a su reciclaje hacia tejidos extrahepáticos, como las lipoproteínas plasmáticas.

En la vía endógena, el hígado segrega una partícula lipoproteica de grandes dimensiones y de densidad muy baja (VLDL) que pasa al torrente sanguíneo. El núcleo de la VLDL consta principalmente de triglicéridos sintetizados en el hígado, con una cantidad más pequeña de ésteres de colesterilo sintetizados en el hígado o reciclados a partir de quilomicrones. En la superficie de la VLDL aparecen dos proteínas predominantes: la apolipoproteína B-100 (apo B-100) y la apolipoproteína E (apo E), aunque se encuentran otras apolipoproteínas, como la apolipoproteína CM (apo CIII) y la apolipoproteína CII (apo CII). Cuando una VLDL llega a los capilares de un tejido adiposo o de un músculo, se extrae su triglicérido, lo cual desemboca en la formación de un nuevo tipo de partículas, que se denominan

lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), o bien en que el resto de la VLDL reduce su tamaño y aumenta su contenido en ésteres de colesterol en relación con una VLDL, aunque conservando sus dos apoproteínas.

En los seres humanos, aproximadamente la mitad de las partículas IDL son retiradas rápidamente de la circulación, generalmente en el plazo de entre dos y seis horas desde su formación. Esto se debe a que las partículas IDL se unen fuertemente a las células hepáticas, que extraen el colesterol de la IDL para crear nuevas VLDL y ácidos biliares. La IDL no captada por el hígado se cataboliza mediante la lipasa hepática, una enzima unida al proteoglicano en las células hepáticas. La apo E se separa de la IDL cuando ésta es transformada en LDL. La apo B-100 es la única proteína de la LDL.

Principalmente, el hígado absorbe y degrada el colesterol circulante hasta formar ácidos biliares, que son los productos finales del metabolismo del colesterol; la absorción de las partículas que contienen colesterol se efectúa con la mediación de los receptores de LDL, que están presentes en altas concentraciones en hepatocitos. El receptor de LDL se une tanto a la apo E como a la apo B-100, y es el responsable de captar y retirar de la circulación la IDL y la LDL. Además, los receptores de remanentes son responsables de limpiar los quilomicrones y las partes restantes de la VLDL (es decir, LDL). No obstante, la afinidad de la apo E para el receptor de LDL es mayor que la de la apo B-100; en consecuencia, las partículas LDL presentan una vida útil en circulación mucho mayor que las partículas VLDL. La LDL circula durante una media de dos días y medio antes de unirse a los receptores de LDL en el hígado y en otros tejidos. Los altos niveles en suero de LDL, el colesterol «malo», se asocian positivamente a las enfermedades coronarias; por ejemplo, en la aterosclerosis, el colesterol procedente de la LDL circulante se acumula en las paredes de las arterias. Esta acumulación forma placas voluminosas que obstruyen el flujo sanguíneo hasta que, finalmente, se forma un coágulo que obstruye una arteria y provoca un ataque cardíaco o una apoplejía.

En última instancia, la cantidad de colesterol intracelular liberado de la LDL controla el metabolismo del colesterol celular. La acumulación del colesterol celular derivado de VLDL y LDL controla tres procesos: en primer lugar, reduce la capacidad de la célula de elaborar su propio colesterol desactivando la síntesis de la HMG-CoA reductasa, una enzima fundamental en la vía biosintética del colesterol. En segundo lugar, el colesterol derivado de la LDL entrante fomenta el almacenamiento del colesterol mediante la acción de la ACAT, la enzima celular que convierte el colesterol en ésteres de colesterol que se depositan en gotas de almacenamiento. En tercer lugar, la acumulación de colesterol en las células activa un mecanismo de reacción que inhibe la síntesis celular de nuevos receptores de LDL. Por tanto, las células ajustan su complemento de receptores LDL de tal forma que captan suficiente colesterol para satisfacer las necesidades metabólicas, sin sobrecarga. Ver Brown y Goldstein, In, *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 8ª ed., Goodman & Gilman, Pergamon Press, Nueva York, 1990, Ch. 36, pp. 874-896.

Pueden resultar atrapados altos niveles de lipoproteínas que contienen apo B en el espacio subendotelial de una arteria, y ser sometidos a un proceso de oxidación. La lipoproteína oxidada es reconocida por receptores de depuración en los macrófagos. La unión de la lipoproteína oxidada a los receptores de depuración puede enriquecer a los macrófagos con colesterol y ésteres de colesterol, independientemente del receptor de LDL. Los macrófagos también producen ésteres de colesterol mediante la acción de la ACAT. La LDL también puede formar un complejo con una glicoproteína de alto peso molecular, denominada apolipoproteína (a), también conocida como apo (a), a través de un puente disulfuro. El complejo LDL-apo (a) es conocido como lipoproteína (a) o Lp(a). Los niveles elevados de Lp(a) son perjudiciales, puesto que se han asociado a aterosclerosis, enfermedades coronarias, infarto de miocardio, apoplejía, infarto cerebral y reestenosis tras angioplastia.

El segundo informe del grupo de expertos del National Cholesterol Education Program (NCEP) en detección, evaluación y tratamiento del alto contenido de colesterol en sangre en adultos analizó los medicamentos disponibles para tratar las concentraciones elevadas de lípidos y así reducir el riesgo de CHD. Se recomienda tomar en consideración los agentes farmacológicos cuando la dieta y el ejercicio no consiguen reducir los lípidos en suero hasta objetivos específicos. Los agentes reductores de colesterol disponibles incluyen secuestrantes de ácidos biliares, como colestiramina y colestipol, niacina e inhibidores de la HMG-CoA reductasa (National Cholesterol Education Program Expert Panel. Second Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. *Circulation*. 1994;89:1329-445).

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa incluyen lovastatina, simvastatina, pravastatina, fluvastatina, atorvastatina, rivastatina, itavastatina, rosuvastatina y otras estatinas. Los secuestrantes incluyen la colestiramina, el colestipol y derivados de dialquilaminoalquilo de un dextrano reticulado. Los inhibidores de la absorción del colesterol incluyen la ezetimiba y el beta-sitosterol, mientras que entre los inhibidores de la acil-CoA:colesterol aciltransferasa se incluye la avasimiba.

La niacina también es conocida por reducir de forma eficaz las concentraciones en suero del colesterol total y de los triglicéridos mientras que aumenta el colesterol de HDL. Los ensayos indican que la niacina puede reducir el índice de mortalidad en personas con CHD. Sus posibles efectos adversos, como enrojecimiento, prurito, malestar gastrointestinal y toxicidad hepática, limitan su uso en algunos pacientes, y pueden reducir su rentabilidad. Los ácidos fibricos no reducen sustancialmente el colesterol de LDL, aunque sí disminuyen las concentraciones elevadas de triglicéridos.

No obstante, entre las terapias conocidas, resultan preferidos los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Son muy eficaces en la reducción del colesterol de LDL, y son los medicamentos más recomendados de esta categoría, demostrando que reducen el riesgo de fallecimiento por CHD. El tratamiento con inhibidores de HMG-CoA reductasa mejora la supervivencia general y reduce el riesgo de CHD en personas con un nivel elevado de colesterol, con o sin enfermedades cardiovasculares importantes.

El mecanismo de acción de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa es la etapa limitante de la velocidad de la síntesis del colesterol hepático. La HMG-CoA se convierte en ácido mevalónico, una reacción catalizada por la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) coenzima A reductasa. Las HMG-CoA reductasas ejercen un importante efecto sobre los niveles de colesterol en sangre a través de una reducción en la síntesis hepática del colesterol de VLDL, el precursor de la LDL. Esta acción aumenta la síntesis de receptores de LDL en la membrana celular de los tejidos tanto hepáticos como extrahepáticos. Debido a que la función principal de los receptores de LDL es retirar la LDL de la circulación, el grado de aumento del receptor de LDL parece estar relacionado con el grado de reducción del colesterol.

Los medicamentos envasados bajo las denominaciones Mevacor, Pravachol, Zocor, Lipator o Lescol bloquean la producción de colesterol dentro de las células, lo que provoca que éstas aumenten los receptores específicos en su superficie, que serán los encargados de absorber las partículas de colesterol de LDL de la sangre. Este efecto es especialmente destacado en el hígado, que es el órgano que controla en gran parte el colesterol presente en el organismo. A medida que el número de receptores de LDL aumenta, los niveles de colesterol total y colesterol de LDL en la sangre se reducirán.

Los efectos sobre los lípidos de la sangre son tales que el colesterol total y el colesterol de LDL se reducen entre un 15 y un 40 por ciento, mientras que los niveles de triglicéridos pueden reducirse de un 10 a un 15 por ciento, y los de colesterol de HDL pueden aumentar entre un 5 y un 10 por ciento. Aunque parece que el medicamento es seguro y se tolera bien, se asocian algunos efectos secundarios a su uso, como por ejemplo trastornos gastrointestinales, dolor de cabeza, mareos y erupciones cutáneas.

La elevación de AST y ALT también se ha asociado al uso de estatinas. Entre los factores de riesgo se incluyen los niveles elevados preexistentes de enzimas hepáticas, el historial de enfermedades hepáticas del paciente y la ingesta significativa de alcohol; cada uno de estos factores es una contraindicación para el uso de la estatina. La elevación de los valores de las LFT (siglas inglesas de las pruebas de la función hepática) como consecuencia de las estatinas suele ser asintomática, aunque puede producirse anorexia, debilidad y/o dolor abdominal. Los altos niveles de LFT suelen descender hasta índices normales tras la interrupción del suministro del medicamento, aunque es posible padecer una importante hepatotoxicidad. Debido a estos riesgos, la etiqueta del producto recomienda el control de las LFT. Tras una medición inicial, las recomendaciones son comprobar las LFT después de seis y doce semanas de terapia y, transcurridos estos plazos, llevar a cabo esta comprobación periódicamente. Si se produjeran elevaciones persistentes de AST y/o ALT superiores a tres veces el límite superior del valor normal, el medicamento deberá dejar de administrarse.

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa interfieren con la síntesis del colesterol, reducen los niveles de colesterol en circulación y, como tales, en teoría pueden reducir la producción de hormonas esteroideas adrenales o gonadales. Los resultados de los ensayos clínicos con estatinas en varones y en mujeres posmenopáusicas no indicaron posibles efectos del medicamento sobre los niveles basales de hormonas esteroideas. En un estudio de 21 varones, la respuesta media de la testosterona a la gonadotropina coriónica humana se vio notablemente reducida ( $p < 0,004$ ) tras 16 semanas de tratamiento con 40 mg de pravastatina. No obstante, el porcentaje de pacientes que muestran un incremento de  $\geq 50\%$  en la testosterona plasmática tras la estimulación con la gonadotropina coriónica humana no cambió significativamente tras la terapia aplicada sobre estos pacientes. Los efectos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa sobre la espermatogénesis y la fertilidad no se han estudiado en una cifra adecuada de pacientes. Las estatinas también pueden presentar un efecto negativo en el eje pituitario-gonadal en mujeres premenopáusicas.

Las lesiones vasculares del SNC, caracterizadas por una hemorragia perivascular, un edema y la infiltración de células mononucleares en espacios perivascuales, se observaron en perros tratados con una estatina a una dosis de 25 mg/kg/día, una dosis que produjo un nivel plasmático del fármaco de casi 50 veces más que el nivel medio del fármaco en humanos que toman 40 mg/día. Se han observado lesiones vasculares del SNC similares con algunos otros fármacos de esta clase. Un fármaco químicamente similar de esta clase produjo una degeneración del nervio óptico (degeneración walleriana de las fibras retinogenuculadas) en perros clínicamente normales de forma dependiente de la dosis, a partir de 60 mg/kg/día; esta dosis produjo unos niveles plasmáticos medios del fármaco casi 30 veces superiores al nivel medio en humanos que toman la dosis más elevada recomendada (según la medición mediante la actividad inhibidora enzimática). Este mismo fármaco también produjo una degeneración vestibulococlear similar a la walleriana y una cromatólisis de células ganglionares de la retina en perros tratados durante 14 semanas con una dosis de 180 mg/kg/día, una dosis que dio como resultado un nivel plasmático medio del fármaco similar al observado con la dosis de 60 mg/kg/día.

En un estudio de 2 años en ratas alimentadas con estatinas en dosis de 10, 30 ó 100 mg/kg de peso corporal, se produjo un incremento en la incidencia de los carcinomas hepatocelulares en los machos con la dosis más elevada ( $p = < 0,01$ ). Aunque a las ratas se les administró una dosis hasta 125 veces más elevada que la dosis humana (DH) en términos de mg/kg de peso corporal, los niveles séricos del fármaco fueron sólo de 6 a 10 veces superiores a los cuantificados en humanos a los que se les había suministrado 40 mg de estatina, según la medición del AUC. La administración oral de 10, 30 ó 100 mg/kg (con producción de niveles plasmáticos de fármaco aproximadamente de 0,5 a 5,0 veces más que los niveles en humanos con 40 mg) de estatina a ratones durante 22 meses dio como resultado un incremento estadísticamente significativo en la incidencia de linfomas malignos en las hembras tratadas cuando se agruparon todos los grupos de tratamiento y se compararon con los controles ( $p < 0,05$ ).

Un fármaco químicamente similar de esta clase se administró a ratones durante 72 semanas a una dosis de 25, 100 y 400 mg/kg de peso corporal, lo cual dio como resultado niveles séricos medios del fármaco de aproximadamente 3, 15 y 33 veces superiores a la concentración sérica media del fármaco en humanos (como actividad inhibidora total) después de una dosis oral de 40 mg. Los carcinomas hepáticos se incrementaron significativamente en las hembras con la dosis elevada y en los machos con la dosis media y elevada, con una incidencia máxima del 90% en los machos. La incidencia de adenomas hepáticos se vio aumentada significativamente en las hembras que recibieron la dosis media y elevada. El tratamiento farmacológico también incrementó significativamente la incidencia de adenomas pulmonares en machos y hembras con la dosis media y elevada. Los adenomas de la glándula harderiana del ojo (una glándula de los ojos de los roedores) aumentaron significativamente en los ratones con dosis elevadas en relación con los controles.

En otro estudio con otros inhibidores de la HMG-CoA reductasa se produjo una disminución en la fertilidad de las ratas macho tratadas durante 34 semanas con una dosis de 25 mg/kg de peso corporal, aunque este efecto no se observó en un estudio posterior de fertilidad, cuando se administró esta misma dosis durante 11 semanas (el ciclo entero de la espermatogénesis, incluyendo maduración del epidídimo). En las ratas tratadas con este mismo inhibidor de la reductasa a 180 mg/kg/día se observó una degeneración de los túbulos seminíferos (necrosis y pérdida de epitelio espermatogénico). Otros fármacos similares de esta clase causaron atrofia testicular, espermatogénesis disminuida, degeneración espermatocítica y formación de células gigantes en perros, resultados todos ellos relacionados con el fármaco. La importancia clínica de estos hallazgos no está clara.

La seguridad para las mujeres embarazadas no se ha determinado utilizando estatinas. Por ejemplo, la pravastatina no fue teratogénica en ratas en dosis tan altas como 1.000 mg/kg al día ni en conejos con dosis de hasta 50 mg/kg al día. Estas dosis dieron como resultado una exposición 20 veces mayor (conejo) o 240 veces mayor (ratas) que en humanos, basándose en el área superficial (mg/metro). Sin embargo, en estudios con otro inhibidor de la HMG-CoA reductasa, se observaron malformaciones esqueléticas en ratas y ratones. Se ha informado de deformación ósea congénita grave, fistula traqueoesofágica y atresia anal (asociación VATER) en un bebé cuya madre tomó otro inhibidor de la HMG-CoA reductasa con sulfato de dextroanfetamina durante el primer trimestre del embarazo. Las estatinas no se administran a mujeres con potencial para concebir, aunque pueden administrarse cuando sea muy poco probable que queden embarazadas y después de que hayan sido informadas de los posibles peligros.

Además, todas las estatinas pueden provocar miopatías, incluyendo raros casos de rabdomiólisis con resultado de fallo renal agudo causado por mioglobinuria. El riesgo de miopatía parece ser mayor con combinaciones de una estatina y algunos otros fármacos, entre los que se incluyen el gemfibrozilo (5% de incidencia), la niacina (2% de incidencia), y la ciclosporina (30% de incidencia). Los síntomas son dolores musculares y sensibilidad inexplicables, especialmente si se acompañan de fiebre o malestar. El fármaco debería dejar de suministrarse si se sospecha la existencia de una miopatía o si se producen aumentos en la creatinina fosfoquinasa (CKP) superiores a 10 veces el límite normal.

Las citocinas se han utilizado para reducir los niveles de colesterol en sangre mediante la administración de IL-4 y GM-CSF (documento EP 0 374 791), IL-10 (patente US nº 5 945 097) o IL-9 (documento WO 02/083076).

Por tanto, existe la necesidad de métodos para tratar o evitar una dislipidemia, una dislipoproteinemia o una hiperlipidemia sin elevar los niveles de AST o ALT en pacientes con el hígado afectado. También existe la necesidad de otro método para controlar el colesterol sin el riesgo de las miopatías, incluyendo la rabdomiólisis con el consiguiente fallo renal agudo causado por mioglobinuria. Asimismo, también es necesario ofrecer un método alternativo para controlar el colesterol diferente a los inhibidores de la HMG-CoA reductasa para el tratamiento de enfermedades o trastornos, como por ejemplo una enfermedad cardiovascular, en la que una enfermedad hepática supone una contraindicación. Todavía resultan necesarios métodos para tratar los trastornos del metabolismo de la glucosa, el síndrome X, los trastornos asociados al receptor activado por proliferadores de peroxisomas, la obesidad, la hipertensión y las enfermedades renales.

## Sumario de la invención

La presente invención está basada, en parte, en métodos de tratamiento y destinados al tratamiento o a evitar una enfermedad o un trastorno, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, dislipoproteinemia, hiperlipidemia, trastorno del metabolismo de la glucosa, síndrome X, trastorno asociado al receptor activado por

proliferador de peroxisomas, obesidad, hipertensión y enfermedades renales con una mezcla libre de suero y libre de mitógenos en una inyección de interleucina leucocitaria (IL) o Multikine®, que comprende proporciones específicas de citocinas IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2, TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2, IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 y GM-CSF con respecto a IL-2.

En las formas de realización de la invención se da a conocer un método para una mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos que se administra tres veces a la semana durante un período de dos semanas, según una escala comprendida entre aproximadamente 20 UI y 12.000 UI, en la que UI corresponde a unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud. En otra forma de realización, la mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces a la semana durante un período de tres semanas según una escala comprendida entre aproximadamente 20 UI y 12.000 UI, en la que UI corresponde a unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

Las aplicaciones específicas incluyen la administración de la mitad de una dosis diaria total de una inyección de interleucina leucocitaria (LI) o Multikine® y la administración de la otra mitad de la dosis diaria total cinco (5) veces por semana durante tres (3) semanas. La dosis diaria total puede ser de 200, 400, 800, 1.200, 1.600, 2.400, 3.200, 4.800, 8.000, 9.600 y 12.000 UI/mL en forma de IL-2, en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

Otra forma de realización de la invención incluye la inyección de interleucina leucocitaria (IL), con unas proporciones específicas de citocina con respecto a la interleucina-2 (IL-2) como se exponen a continuación: IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 - 1,5, y preferentemente a 0,7+/- 0,1 (IL-1 $\beta$ /IL-2), TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 - 11,3, y preferentemente a 9,5+/-1,8 (TNF- $\alpha$ /IL-2), IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 - 10,9, y preferentemente a 6,0+/- 1,1 (IFN- $\gamma$ /IL-2), y GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 - 4,8, y preferentemente a 4,0+/- 0,5 (GM-CSF/IL-2).

En otras aplicaciones específicas, el preparado o composición farmacéutica de citocina libre de suero y de mitógenos presenta citocinas adicionales diferentes, así como otras moléculas pequeñas biológicamente activas, en las que la proporción de cada una de las pequeñas moléculas biológicamente activas con respecto a la IL-2 es como se expone a continuación: IL-3 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,38 - 0,68, preferentemente a 0,53+/- 0,15, IL-6 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 37,2 - 53,8, preferentemente a 46+/- 5,9, IL-8 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 261 - 561,5, preferentemente a 411+/-10,6, IL-1 $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,56 - 0,94, preferentemente a 0,75+/- 0,19, IL-10 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,82 - 3,22, preferentemente a 3,0+/- 0,18, IL-16 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,16 - 2,84, preferentemente a 1,84+/-0,68, G-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,16 - 3,78, preferentemente a 2,97+/- 0,81, TNF- $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,17 - 2,43, preferentemente a 1,8+/- 0,63, MIP-1 $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 15,7 - 37,16, preferentemente a 22,7+/- 7,0, MIP-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 17,1 - 28,5, preferentemente a 22,8+/- 5,7, a RANTES con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,3 - 2,7, preferentemente a 2,5+/- 0,13, a EGF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,267 - 0,283, preferentemente a 0,275+/- 0,008, PGE<sub>2</sub> con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,63 - 5,42, preferentemente a 4,5+/- 0,87 y TxB<sub>2</sub> con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 23,47 - 25,13, preferentemente a 24,3+/- 0,83.

Otros objetos y ventajas de la presente invención se exponen en la descripción siguiente. Los dibujos y las tablas adjuntos, que forman parte de la exposición, ilustran y, junto con la descripción, explican el principio de la invención. Un experto en la materia apreciará que otros aspectos de esta invención resultarán evidentes haciendo referencia a las figuras adjuntas y a la descripción detallada siguiente.

#### Descripción detallada de la invención y formas de realización preferidas

La presente invención se refiere a métodos para tratar o evitar una enfermedad o un trastorno, como por ejemplo enfermedades cardiovasculares, dislipidemia, dislipoproteinemia, hiperlipidemia, trastorno del metabolismo de la glucosa, síndrome X, trastorno asociado al receptor activado por proliferador de peroxisomas, obesidad, hipertensión y enfermedades renales con una mezcla libre de suero y libre de mitógenos compuesta de proporciones específicas de IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2, TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2, IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 y GM-CSF con respecto a IL-2. Una de estas nuevas mezclas de citocinas es la inyección de interleucina leucocitaria (LI) o Multikine®, que ha puesto de manifiesto capacidades inmunomoduladoras. La importancia clínica de la inmunosupresión en pacientes con cáncer tiene un impacto inesperado sobre los métodos para evitar las enfermedades cardiovasculares, los trastornos del metabolismo de la glucosa, el síndrome X, los trastornos asociados al receptor activado por proliferador de peroxisomas, la obesidad, la hipertensión y, en particular, la dislipidemia, la dislipoproteinemia o la hiperlipidemia.

La administración de una inyección de interleucina leucocitaria (LI) en dosis de 200, 400, 800, 1.200, 1.600, 2.400, 3.200, 4.800, 8.000, 9.600 y 12.000 UI/mL por vía peritumoral tres (3) veces a la semana durante dos (2) semanas o cinco (5) veces por semana durante tres (3) semanas modificó el nivel de colesterol en pacientes inicialmente tratados con LI para cánceres de cabeza y cuello. La dosis peritumoral durante el tratamiento del cáncer se administró inyectando, por ejemplo, 100 UI/mL en forma de IL-2 en cuatro lugares diferentes alrededor de una masa tumoral. Cada uno de los cuatro lugares recibió una inyección de una cuarta parte (1/4) de la dosis peritumoral completa. La mitad restante de la dosis total fue administrada secuencialmente de forma ipsilateral y a nivel perilinfático con respecto al lugar del tumor y en la misma visita. Las inyecciones perilinfáticas se administraron en una zona del área posterior mandibular, en el sector de la cadena linfática yugular y de forma ipsilateral con respecto a la masa tumoral inyectada.

La inyección de interleucina leucocitaria (LI), en sí, es un preparado libre de suero, de mitógenos y de antibióticos producido a partir de células mononucleares de sangre periférica que incluyen células T, células B y macrófagos. Existen tres «familias» de citocinas en la LI que, juntas, son importantes para la actividad biológica única de la LI. Incluyen citocinas directas citotóxicas/citostáticas y virucidas/virostáticas, como TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , citocinas linfoproliferativas como IL-1 e IL-2 y citocinas quimiotácticas, como IL-6, EL-8 y MIP-1 $\alpha$ . Además, las diferentes citocinas y pequeñas moléculas biológicas que constituyen la LI proceden en su totalidad de la estimulación *in vitro* mediante lectina (PHA) de células mononucleares humanas de sangre periférica, que incluyen células T, células B y macrófagos. La centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque separa los leucocitos (entre los que se incluyen las células T, las células B y los macrófagos) de la sangre completa del donante, y una serie de lavados (en medios fisiológicamente amortiguados) facilita el aislamiento de los linfocitos y la eliminación de eritrocitos, restos celulares y otros componentes celulares no deseados del componente de linfocitos aislados de la sangre completa del donante.

La LI contiene diferentes citocinas, presentes en proporciones específicas de cada citocina con respecto a la interleucina 2 (IL-2), como se expone a continuación: IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 - 1,5, y preferentemente a 0,7+/- 0,1 (IL-1 $\beta$ /IL-2), TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 - 11,3, y preferentemente a 9,5+/-1,8 (TNF- $\alpha$ /IL-2), IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 - 10,9, y preferentemente a 6,0+/- 1,1 (IFN- $\gamma$ /IL-2), y GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 - 4,8, y preferentemente a 4,0+/- 0,5 (GM-CSF/IL-2).

El resto de las diferentes citocinas y otras moléculas pequeñas biológicamente activas en la LI también estarán presentes en cada preparación de la pequeña molécula biológicamente activa con respecto a la IL-2 como se expone a continuación: IL-3 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,38 - 0,68, preferentemente a 0,53+/- 0,15, IL-6 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 37,2 - 53,8, preferentemente a 46+/- 5,9, IL-8 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 261 - 561,5, preferentemente a 411+/-10,6, IL-1 $\alpha$  con respecto a IL-2 según una escala de 0,56 - 0,94, preferentemente a 0,75+/- 0,19, IL-10 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,82 - 3,22, preferentemente a 3,0+/- 0,18, IL-16 con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,16 - 2,84, preferentemente a 1,84+/-0,68, G-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,16 - 3,78, preferentemente a 2,97+/- 0,81, TNF- $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,17 - 2,43, preferentemente a 1,8+/- 0,63, MIP-1 $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 15,7 - 37,16, preferentemente a 22,7+/- 7,0, MIP-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 17,1 - 28,5, preferentemente a 22,8+/- 5,7, RANTES con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,3 - 2,7, preferentemente a 2,5+/- 0,13, a EGF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,267 - 0,283, preferentemente a 0,275+/- 0,008, PGE<sub>2</sub> con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,63 - 5,42, preferentemente a 4,5+/- 0,87 y TxB<sub>2</sub> con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 23,47 - 25,13, preferentemente a 24,3+/- 0,83.

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) o Multikine® se comprobó utilizando un protocolo de caracterización, y no contiene las siguientes citocinas y otras pequeñas moléculas biológicamente activas: IL-4, IL-7, y EL-15, Tfr, sICAM, PDGF-AB, IFN- $\alpha$ , EPO, LTC 4, TGF- $\beta$ 2, FGF básico, angiogenina, sE-selectina, SCF y LIF. La LI contiene sólo trazas (justo por encima del nivel de detección del ensayo) de IL-12 y LTB4.

En el proceso de fabricación, las células mononucleares son separadas de las «capas leucocitarias» del donante humano mediante centrifugación en gradiente escalonado, y cultivadas con PHA para aumentar la producción y la secreción de IL-2 y otras citocinas a partir de las células blancas del donante en cultivo, tal y como se publica en las patentes US nº 5.093.479, nº 4.390.623, nº 4.388.309, nº 4.406.830, nº 4.661.447, nº 4.681.844 y nº 4.464.355, que se incorporan en su totalidad a la presente memoria como referencia. Posteriormente, el sobrenadante del cultivo se extrae de forma aséptica, se clarifica y se somete a un proceso comercial de exclusión de virus. Más tarde, el sobrenadante se concentra aproximadamente 10 veces mediante ultrafiltración y microfiltración.

En este punto, se añade seroalbúmina humana inyectable, USP, y el concentrado se diluye hasta alcanzar un pH fisiológico y una concentración diana de IL-2 según lo que se establece en la etiqueta (ejemplo, 400 UI/mL). Posteriormente, el concentrado es sometido a una segunda microfiltración (filtro de 0,22 micrómetros), se dispone de forma aséptica en viales esterilizados de suero y se etiqueta según su contenido de IL-2. La potencia del producto se mide mediante la incorporación de timidina radiomarcada por una línea de linfocitos T citotóxicos (CTLL-2). El

agente inyectable final es comprobado además por el método ELISA para determinar la presencia de cinco citocinas marcadoras: IL-2, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

## Definiciones

IL-2 - interleucina 2 (IL-2): una glicoproteína de 15,5-kD sintetizada por los linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores (anteriormente conocida como factor de crecimiento de células T). La IL-2 tiene un efecto autocrino, y actúa sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> que la producen, así como sobre otras células del sistema inmune (incluyendo linfocitos B, linfocitos T CD8<sup>+</sup> T, células NK [citolíticas naturales] y otras).

IL-1 $\beta$  - interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ): una citocina de 17-kD sintetizada por fagocitos mononucleares activados, que se encuentra en forma libre en la circulación y actúa de mediadora en respuestas inflamatorias. Actúa sobre los linfocitos T CD4<sup>+</sup> para facilitar su proliferación, así como sobre los linfocitos B como factor de crecimiento y diferenciación. También provoca la síntesis de la IL-6 por fagocitos mononucleares.

TNF- $\alpha$  - factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ): una proteína de 157 residuos aminoácidos (aa) sintetizada por monocitos y macrófagos estimulados, linfocitos B, linfocitos T y células NK, entre otras; y se encuentra en la circulación en forma trimérica. El TNF sirve como agente mediador de la acción directa antitumoral, provocando la lisis de las células tumorales; además, facilita la aglomeración de leucocitos, provocando angiogénesis, y fomenta la proliferación de los fibroblastos.

IFN- $\gamma$ - interferón gamma (IFN- $\gamma$ ): un homodímero de glicoproteínas de 21-24 kD sintetizado por linfocitos T activados y células NK; es un potente activador de monocitos, y aumenta la capacidad de éstos de destruir microorganismos intracelulares y células tumorales. Tiene una actividad antiviral y antiproliferativa directa, y provoca que muchos tipos de células expresen el complejo molecular en superficie celular MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) de clase II, además de aumentar la expresión de MHC de clase I.

GM-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF): una proteína de 127 aa que se encuentra como monómero en la circulación; es producida por macrófagos y linfocitos T, fibroblastos y células endoteliales. Es un factor de crecimiento para células hematopoyéticas, y estimula el crecimiento y la diferenciación del linaje mielomonocítico.

IL-3 - interleucina 3 (IL-3): una linfocina de 20 kD sintetizada por linfocitos T CD4<sup>+</sup> colaboradores activados; actúa como factor de estimulación de colonias, facilitando la proliferación de algunas células hematopoyéticas y fomentando la proliferación y la diferenciación de linfocitos T.

IL-6 - interleucina - 6 (IL-6): una citocina de 26 kD producida por linfocitos T activados, fagocitos mononucleares, células endoteliales y fibroblastos. Actúa sobre muchas células pero tiene una función especial en la habilitación de los linfocitos B activados para que puedan diferenciarse en células plasmáticas secretoras de anticuerpos, e induce a los hepatocitos a la formación de proteínas de fase aguda (implicadas en las respuestas inflamatorias), así como fibrinógeno.

IL-8 - interleucina 8 (IL-8): una proteína de 8 kD producida por macrófagos y células endoteliales. Es un poderoso factor quimiotáctico para neutrófilos y linfocitos T, y facilita la adherencia de dichos neutrófilos a células endoteliales.

IL-1 $\alpha$  - interleucina 1 alfa (IL-1 $\alpha$ ): una citocina de 17 kD (como la IL-1 $\beta$ ) escindida a partir de una molécula precursora de 33 kD, sintetizada por fagocitos mononucleares activados; no suele encontrarse en forma libre en la circulación, y actúa como una sustancia asociada a la membrana. Ayuda a la IL-1 $\beta$  en la mediación de las respuestas inflamatorias.

IL-10 - interleucina 10 (IL-10): un polipéptido de 18 kD producido por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD 8<sup>+</sup>, monocitos, macrófagos, linfocitos B activados y queratinocitos. Inhibe la capacidad de los macrófagos de presentar antígenos, particularmente ante células de tipo T<sub>H</sub>1, y de secretar IL-6 y TNF.

IL-16 - interleucina 16 (IL-16): una proteína tetramérica de 14 kD producida por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, eosinófilos, mastocitos y células epiteliales respiratorias. Presenta fuertes propiedades quimiotácticas para los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los monocitos.

G-CSF - factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF): una glicoproteína homodímera de 22 - 25 kD producida por macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y células estromales. Aumenta las células progenitoras de granulocitos en la médula, y mantiene el incremento de los neutrófilos en sangre. También aumenta la capacidad de los neutrófilos de mostrar una mejora en la producción de superóxido, que se cree que desempeña un importante papel en la destrucción de células con infecciones microbianas y de células tumorales.

TNF- $\beta$  - factor de necrosis tumoral beta (TNF- $\beta$ ): una proteína de 25 kD producida por linfocitos activados. Puede destruir las células tumorales en cultivo, y estimula la proliferación de fibroblastos. Además, imita la mayor parte de las demás acciones del TNF- $\alpha$ .

- 5 MIP-1 $\alpha$  - proteína inflamatoria de macrófagos - 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ ): una proteína monomérica de 66 aa producida por macrófagos y otras células. Es quimiotáctica para monocitos, linfocitos T y eosinófilos.

RANTES - una proteína de 8 kD producida por linfocitos T, quimiotáctica para monocitos, linfocitos T y eosinófilos. Estimula la inflamación.

- 10 EGF - factor de crecimiento epidérmico (EGF): un polipéptido trisulfatado de 53 residuos de aa. El EGF es un miembro de la familia de la tirosina quinasa, y tiene múltiples funciones, entre las que se incluye la estimulación de la respuesta mitogénica y la ayuda en la cicatrización de heridas.

- 15 PGE<sub>2</sub> - prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>): La PGE<sub>2</sub> pertenece a una familia de lípidos biológicamente activos, que se obtienen del ácido araquidónico a través de la reacción enzimática de la ciclooxigenasa. Se libera por monocitos activados y bloquea la expresión de MHC de clase II en linfocitos T y macrófagos.

- 20 TXB<sub>2</sub> - tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>): El TXB<sub>2</sub> es un miembro de los compuestos biológicamente activos que se obtienen de los ácidos grasos poliinsaturados mediante la isomerización de la prostaglandina y la endoperoxidasa PGH<sub>2</sub> a través de la enzima tromboxano sintetasa. El TXB<sub>2</sub> tiene un papel fisiológico en las enfermedades tromboembólicas y en las reacciones anafiláticas.

- 25 UI (unidades internacionales) - una unidad de medida de la potencia de los preparados biológicos a través de la comparación con respecto a una norma de referencia internacional con un peso y fuerza específicos, por ejemplo, la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud. Las unidades internacionales son el único método reconocido y normalizado para registrar las unidades de actividad biológica que se publican, y se obtienen a partir de un esfuerzo de colaboración en materia de investigación a nivel internacional.

- 30 U (unidades como medida de actividad biológica) - abreviatura para una serie de las denominadas «unidades» que cada laboratorio considera como referencia y que, además, son únicas para el laboratorio en el que esté desarrollándose el trabajo. Cada «unidad» es diferente entre un laboratorio y otro, y no es una norma reconocida a escala mundial como las unidades internacionales (UI).

- 35 USP - monografías de la U.S. Pharmacopeia.

P - «p < 0,01»: un término de matemática estadística que describe el nivel de probabilidad de que se produzca un fenómeno en condiciones predeterminadas.

- 40 ANOVA (análisis de varianzas) - un análisis de factor único tal y como se describe en los libros de texto de estadística y matemáticas, por ejemplo, «Handbook of Statistical Methods for Engineers and Scientists», Harrison M. Wadsworth, Jr., ed., McGraw Hill 1990, y «Statistical Operations Analysis of Health Research Data», Robert P. Hirsch y Richard K. Riegelman, eds. Blackwell Science Inc., 1996.

- 45 Modo de acción y caracterización de la LI

- Los estudios sobre animales ponen de manifiesto que las «interleucinas combinadas» tienen una actividad inmunomoduladora e inmunoestimuladora *in vitro* (Hadden et al., «Mixed Interleukins and Thymosin Fraction V Synergistically Induce T Lymphocyte Development in Hydrocortisone-Treated Aged Mice», *Cell. Immunol.* 144:228-236 (1992)). Sin vincularse a ninguna teoría, se ha propuesto como hipótesis que la inyección local/regional de «interleucinas combinadas» supera la inmunosupresión local. Posteriormente, se produce una rotura de la tolerancia ante los antígenos tumorales, que permite que tenga lugar una reacción inmune antitumoral eficaz a nivel local. Ha sido asimismo conocido que la instilación local de interleucinas en la región del tumor o la transfección real de genes de interleucina en un tumor aumenta notablemente la reacción inmune antitumoral que provoca la reducción del tumor, tal y como notificaron Golumbek et al., «Treatment of Established Renal Cancer by Tumor Cells Engineered to Secrete Interleukin-4», *Science* 254:713-716 (1991).

- No obstante, los datos procedentes de varios ensayos CEL-SCI agrupados para investigar el posible efecto de las inyecciones de interleucina leucocitaria (LI) sobre otras enfermedades pusieron de manifiesto que el colesterol en suero se redujo, mientras que se mantuvieron los valores iniciales de AST/ALT. Se estableció un objetivo doble para así examinar la distribución de datos para determinar la correlación entre el tratamiento con inyección de interleucina leucocitaria (LI) o Multikine® y una posible reducción en el colesterol en suero, así como para determinar si la dosis de LI administrada presentaba un efecto constante o diferente sobre el patrón de reacción del colesterol.

- 65 Las distribuciones de los valores del colesterol se evaluaron en primera instancia mediante métodos estadísticos de una variable, así como con representaciones de los datos. Las concentraciones iniciales de colesterol (comprobadas

con un ANOVA) sirvieron para determinar si existían importantes diferencias entre protocolos antes de combinar los datos en una metabase de datos. Se establecieron medias con intervalos de confianza del 95% para los datos agregados y diversos grupos de datos. Las medias estratificadas por protocolo, por dosis y protocolo por dosis fueron comparadas para observar las tendencias con el paso del tiempo y las diferencias entre los grupos de dosis. Los análisis de regresión se llevaron a cabo para determinar si la pendiente del cambio que medía las concentraciones de colesterol medias, como una función de tratamiento con LI, era estadísticamente significativa desde cero. Se aplicaron los modelos lineales generalizados (Manova) para comprobar si las diferencias en el nivel de dosis eran estadísticamente significativas, así como para determinar si el nivel de colesterol inicial de un paciente, es decir, la concentración antes del tratamiento, presentaba una relación significativa con la respuesta ante la inyección de interleucina leucocitaria.

#### Pacientes

La información relativa al control del número de protocolo, a la fase de estudio clínico, a la población de pacientes clínicos estudiada, al número total de semanas, a la administración por semana y a las técnicas de medición del colesterol total en suero (y ALT/AST) es proporcionada en la tabla 1.

Tabla 1

|        | Número de protocolo | Fase de estudio clínico, y Población de pacientes clínicos estudiada                                                                                                                                         | Número total de semanas                                | Administración por semana y vía de administración                                  | Medición del colesterol total en sangre (y ALT/AST) |
|--------|---------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| Cel-01 | 33575-01            | Fase I/II, estudio clínico en cáncer metastásico recurrente de cabeza y cuello en hombre/mujer (M/F), todas las fases de la enfermedad que no respondieron a la terapia de alta prioridad (Multikine y CIZ*) | Durante 8-26 (semanas, si la enfermedad no avanzaba)   | 3-5 por semana (peritumoralmente)                                                  | Técnica de laboratorio químico/clínico estándar     |
| Cel-02 | 50234-02            | Fase I/II, estudio clínico en cáncer primario avanzado de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas) en M/F (fases como T2-3N0-2 M0) suministrado con CIZ**                                            | Durante 2 (antes de la resección quirúrgica del tumor) | 3 veces por semana (1/2 de dosis peritumoral de Multikine, 1/2 perilinfáticas)     | Técnica química/de laboratorio clínico estándar     |
| Cel-04 | 50234-01            | Fase I/II, estudio clínico en cáncer primario avanzado de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas) en M/F (fases como T2-3N0-2 M0) tratados con CIZ**                                                | Durante 2 (antes de la resección quirúrgica del tumor) | 3 por semana (peritumoralmente)                                                    | Técnica química/de laboratorio clínico estándar     |
| Hun-01 | 50234-03            | Fase I/II, estudio clínico en cáncer primario avanzado de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas) en M/F (fases como T2-3N0-2 M0) tratados con CIZ**                                                | Durante 2 (antes de la resección quirúrgica del tumor) | 3 veces por semana (peritumoralmente)                                              | Técnica química/de laboratorio clínico estándar     |
| Hun-02 | 50234-03            | Fase II, estudio clínico en cáncer primario avanzado de cabeza y cuello (carcinoma de células escamosas) en M/F (fases como T2-3N0-2 M0) tratados con CIZ**                                                  | Durante 3 (antes de la resección quirúrgica del tumor) | 5 veces por semana (1/2 de dosis peritumoral de Multikine, 1/2 perilinfáticamente) | Técnica química/de laboratorio clínico estándar     |

\*CIZ = dosis intravenosa de ciclofosfamida (dosis baja, 300 mg/M<sup>2</sup>), indometacina (25 mg, tid) y sulfato de cinc, 142 mg (po, qd, 50 mg como cinc elemental). El CIZ se administró como se expone a continuación: ciclofosfamida (intravenosa) sólo una vez, tres (3) días antes de la administración inicial de Multikine; indometacina tres veces al día (con alimentos, diariamente), desde la primera administración de Multikine hasta el último día de administración de Multikine y sulfato de cinc (igual que el programa de administración de indometacina).

\*\* CIZ = dosis intravenosa de ciclofosfamida (dosis baja, 300 mg/M<sup>2</sup>), indometacina (25 mg, tid) y sulfato de cinc, 142 mg (po, qd, 50 mg como cinc elemental). El CIZ se administró como se expone a continuación: ciclofosfamida (intravenosa) sólo una vez, tres (3) días antes de la administración inicial de Multikine; indometacina tres veces al día (con alimentos, diariamente), desde la primera administración de Multikine hasta 24 horas antes de la resección quirúrgica del tumor, y sulfato de cinc (igual que el programa de administración de indometacina).

#### Protocolo de tratamiento

Un protocolo de administración de inyecciones de interleucina leucocitaria (LI) se lleva a cabo de la siguiente manera; la dosis diaria total se inyecta de tres a cinco veces por semana a nivel peritumoral. La LI se administra intradérmicamente en los márgenes circunferencial de la masa tumoral visible/palpable durante un período comprendido entre las ocho y las veintiséis semanas.

Se suministra una sola infusión intravenosa de ciclofosfamida en inyección, 300 mg/m<sup>2</sup>, tres días antes de la primera administración de LI. La indometacina (25 mg) se autoadministra por vía oral (con alimentos) tres veces al día para alcanzar una dosis diaria total de 75 mg, comenzando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida y durante un primer ciclo; cada ciclo de tratamiento dura dos meses. El sulfato de cinc (50 mg, como cinc elemental) y un suplemento multivitamínico se autoadministran una vez al día, empezando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida.

La administración de inyecciones de interleucina leucocitaria (LI) también puede llevarse a cabo de la siguiente manera; la dosis diaria total se inyecta de tres a cinco veces por semana a nivel peritumoral. Como alternativa, la mitad de la dosis total de LI puede administrarse peritumoralmente, caso en el que 1/4 de la dosis peritumoral (aprox. 100 UI para 800 UI/mL de dosis total) se administra en cada uno de los cuatro lugares alrededor de la masa tumoral. La mitad restante (400 UI/mL de IL-2 para 800 UI/mL de dosis total) se administra a nivel perilinfático ipsilateral con respecto al lugar del tumor (secuencialmente y en la misma visita) durante un período de tres semanas, 5 veces a la semana. La LI se administra intradérmicamente en los márgenes circunferenciales de la masa tumoral visible/palpable. Las inyecciones perilinfáticas se suministran en el área mandibular posterior, en la zona de la cadena linfática yugular, de forma ipsilateral con respecto a la masa inyectada en los protocolos Cel-02 y Hun-02. En los otros protocolos, Cel-01 y Cel-04, las dosis de LI sólo se administraron peritumoralmente.

Se suministra una sola infusión intravenosa de ciclofosfamida en inyección, 300 mg/m<sup>2</sup>, tres días antes de la primera administración de LI. La indometacina (25 mg) se autoadministra por vía oral (con alimentos) tres veces al día para alcanzar una dosis diaria total de 75 mg, comenzando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía. El sulfato de cinc (50 mg, como cinc elemental) y un suplemento multivitamínico se autoadministran una vez al día, empezando 3 días después de la administración de la ciclofosfamida y hasta 24 horas antes de la cirugía.

#### Examen del paciente

Antes de la inclusión en el ensayo, los pacientes son sometidos a una evaluación general. Su historial médico también es revisado. Una vez incluidos, se llevó a cabo un examen físico completo, análisis hematológico, análisis químico completo de sangre, radiografía de tórax y electrocardiograma. En los casos en los que es posible, se obtiene una imagen del lugar del tumor primario para contar con una imagen inicial. Todos los pacientes tienen una medición bidimensional inicial de su tumor primario, realizada midiendo los dos diámetros perpendiculares principales. Los pacientes son entrevistados en cada visita posterior, y se les pregunta sobre la calidad de vida (por ejemplo, nivel de dolor, grado de movilidad de la lengua, etc.) mediante un cuestionario autorizado. El médico responsable evaluó la toxicidad en cada visita.

#### Inyección de interleucina leucocitaria (LI)

La inyección de interleucina leucocitaria (LI) se prepara a partir de células mononucleares de sangre periférica humana obtenidas a través de la Cruz Roja norteamericana tras superar todas las pruebas obligatorias de la FDA para sangre destinada a transfusión cultivada con mitógenos. No se permiten donantes para los que sea la primera vez. Posteriormente, el sobrenadante del cultivo libre de suero se recoge de forma aséptica, se clarifica, se somete a un proceso comercial de exclusión de virus, se concentra y se microfiltra. Al concentrado se le añade seroalbúmina humana inyectable, USP, y la solución resultante se amortigua hasta un pH fisiológico, se lleva hasta una concentración de IL-2 objetivo y se somete a una segunda microfiltración. La solución del fármaco formulado se introduce asépticamente en viales estériles de suero y se etiqueta según su contenido de IL-2. La potencia del producto se mide a través de la incorporación de timidina radiomarcada (*in vitro*) mediante el uso de una línea celular de linfocitos T citotóxicos (CTLL-2) dependiente de la IL-2. El agente inyectable final es comprobado además por el método ELISA para determinar la presencia de cinco citocinas marcadoras: IL-2, IL-1β, GM-CSF, IFN-γ y TNF-α. La LI es además sometida a pruebas de control de calidad para determinar esterilidad, endotoxinas bacterianas, pH y concentración total de proteínas, así como a otras pruebas físico-químicas.

La LI se suministra congelada en un vial de suero de vidrio de borosilicato, que contiene 2,2 mL de fármaco, tal y como se recoge en la etiqueta, en forma de IL-2 (400 UI/mL) para la administración peritumoral, intratumoral, perilinfática o subcutánea. La LI es sometida a pruebas de control de calidad para determinar identidad, esterilidad, endotoxinas bacterianas, pH y concentración total de proteínas. Cada vial es analizado para determinar la contaminación de partículas y el aspecto. El preparado presenta un contenido total de proteínas de 3 mg/mL, en el que el material se suministra esterilizado y libre de pirógenos. La LI tiene una fecha de caducidad asignada de 24 meses desde la fecha de fabricación, cuando el fármaco se almacena a -20°C.

#### Ciclofosfamida

La inyección, USP, de ciclofosfamida (Bristol-Myers-Squibb, Reino Unido) se suministra como polvo estéril con un contenido de 45 mg de cloruro sódico, 75 mg de manitol o aproximadamente 82 mg de bicarbonato de sodio por 100 mg de ciclofosfamida para la reconstitución antes de la infusión intravenosa.

#### Indometacina

La indometacina, USP (Sanofi - Synthelabo, Francia), se suministra en forma de comprimidos de 25 mg para la autoadministración oral con alimentos.

#### Sulfato de cinc y multivitaminas

El sulfato de cinc (50 mg como cinc elemental, R. P. Scherer Corporation, Clearwater, Florida, EE.UU.) y las multivitaminas de venta libre son suministrados por la clínica a cada paciente para su autoadministración.

#### Diferencias de protocolo

Los datos sobre colesterol e inyecciones de interleucina leucocitaria (LI) de cuatro protocolos diferentes Cel-01 (33575-01), Cel-02 (50234-02), Cel-04 (50234-01), y Hun-01 y Hun-2 (50234-03) se combinaron para efectuar un metaanálisis. Estos ensayos fueron diseñados como ensayos de seguridad (y eficacia piloto) de fase I/II, con niveles de dosis ascendentes de inyección de interleucina leucocitaria en carcinoma escamoso de cuello y de cabeza y cuello.

El diseño general de los ensayos se diferenciaba notablemente de un protocolo Cel-01. En Cel-01, los pacientes se sometían a un suministro inicial de 2 semanas únicamente de inyecciones de interleucina leucocitaria (LI), seguido de un breve período de lavado. El paciente recibió cursos de tratamiento adicionales, con un máximo de seis, y permaneció en el estudio hasta la progresión de la enfermedad o hasta la finalización de los seis períodos. Cada período de tratamiento con LI de este ensayo constaba de 21 días. El primer período de tratamiento tras las dos primeras semanas de tratamiento con LI también comprendía la adición de CIZ al tratamiento con LI. Ver la tabla 1. Los estudios Cel-02, Cel-04, Hun-01 y Hun-02 eran similares en términos de protocolo. Los pacientes incluidos en estos ensayos recibieron inyecciones 3 ó 5 veces por semana, además de indometacina, vitaminas y suplementos de cinc. El período de ensayo activo no superó las tres semanas.

Los regímenes de dosificación, la frecuencia de las inyecciones de interleucina leucocitaria y el lugar de administración de éstas (tumoral, linfática) variaba entre cada protocolo y dentro de cada uno de ellos. No todos los estudios incluían multivitaminas, suplementos de cinc o un control dietético (dieta de paciente ingresado). Los ensayos se llevaron a cabo en diferentes países, y contaron con pacientes con cánceres en cabeza y cuello en distintas fases y con diversos historiales médicos.

Todos los estudios incluían tanto hombres como mujeres. En los análisis no se efectuó un control para la mezcla de géneros de cada población del ensayo, a pesar de que, generalmente, existe una diferencia en los niveles de colesterol y en las reacciones a la medicación en función del género. Las determinaciones de colesterol se llevaron a cabo en diferentes laboratorios, con intervalos relativos ligeramente diferentes. No obstante, los laboratorios y los intervalos relativos permanecieron constantes en el marco del protocolo y del período del ensayo; en consecuencia, cualquier sesgo debido a las diferencias entre laboratorios se mantuvo constante y, por ende, no afectó a la precisión del cálculo del cambio desde el punto inicial hasta el punto final.

#### Diferencias entre las poblaciones de partida

A partir de las características estadísticas de la prueba del ANOVA, los valores iniciales de los pacientes del estudio Cel-01 (33575-01) eran notablemente inferiores a la concentración media inicial en los grupos con dosis mayores de los estudios Cel-04 (50234-01) y Hun-02 (50234-03). No obstante, por regla general, las concentraciones promedio iniciales de colesterol en el marco de una población de protocolo y en comparación con otros protocolos eran estadísticamente equivalentes, como se presenta en la tabla 2.

Tabla 2

Concentración media inicial de colesterol en mg/dl Por protocolo y dosis de tratamiento

| Protocolo | Dosis  | N  | Media | Desv. típ. |
|-----------|--------|----|-------|------------|
| Cel-01    | 200    | 5  | 188,3 | 34,6       |
| Cel-01    | 400    | 3  | 196,6 | 20,1       |
| Cel-01    | 800    | 4  | 169,9 | 39,9       |
| Cel-01    | 1.600  | 4  | 149,6 | 24,9       |
| Cel-02    | 800    | 9  | 202,5 | 36,7       |
| Cel-02    | 1.600  | 5  | 204,1 | 16,2       |
| Cel-02    | 3.200  | 12 | 214,1 | 33,8       |
| Cel-04    | 1.200  | 6  | 227,8 | 43,6       |
| Cel-04    | 2.400  | 8  | 195,2 | 36,8       |
| Cel-04    | 4.800  | 5  | 202,0 | 68,4       |
| Cel-04    | 9.600  | 7  | 219,5 | 32,3       |
| Hun-01    | 2.400  | 8  | 181,8 | 38,3       |
| Hun-01    | 4.800  | 7  | 220,9 | 27,4       |
| Hun-01    | 8.000  | 6  | 217,3 | 33,2       |
| Hun-02    | 12.000 | 7  | 218,5 | 43,6       |

En los protocolos Hun-01 y Hun-02 dentro del grupo de dosificación de 4800 UI/mL, dos pacientes presentaron niveles iniciales de colesterol situados en niveles de 300. La población de pacientes presentaba elevados índices de consumo de tabaco y alcohol (actividades de las cuales se conoce su relación con el cáncer de cabeza y cuello y con un aumento del riesgo de padecer enfermedades hepáticas) antes y durante la terapia con LI. No era claramente el caso en otras poblaciones de protocolo. El ensayo Cel-01 fue el único en el que se incluyó a pacientes con cáncer recurrente y metastásico.

#### Métodos

Se llevó a cabo un metaanálisis estadístico sobre los datos recopilados en los estudios Cel-04 (50234-01), Hun-01 (50234-03) y Cel-01 (33575-01) utilizando PC SAS 9.0. Los datos para los protocolos Cel-04, Cel-01 y Hun-01 (1<sup>os</sup> 39 pacientes) fueron extraídos a partir de archivos SAS o Excel previamente existentes. Los datos del protocolo Hun-02 (50234-03) (segundos 20 pacientes) se importaron desde un archivo de texto suministrado por una empresa de investigación por contrato (CRO). En estos datos, los valores de cero fueron sustituidos por valores ausentes (por error de exportación de la CRO). Los datos para pacientes que no incluían valores iniciales o del día 1, o que tenían un solo punto de datos para el colesterol, no se incluyeron en el conjunto de datos agregados sobre el colesterol. Los valores de los datos sobre el colesterol se convirtieron de mmol/L a mg/dL mediante la constante de conversión de 38,67. La conversión se llevó a cabo para ofrecer un contexto más familiar para el análisis de resultados.

Las dosis, la frecuencia de las inyecciones y el lugar de aplicación de éstas variaban entre los protocolos y dentro de ellos. No había «control» para estas fuentes de variación en el modelo y en las medias como consecuencia de los tamaños de la muestra en cada protocolo y la posterior pérdida de potencia dentro de los modelos. El hecho de no tener en cuenta estos factores, sobre todo, reduce la importancia estadística de los resultados. No obstante, tal y como se apreciará a partir de las tablas y en los ejemplos expuestos a continuación, los resultados siguen siendo significativos, independientemente de estos factores de confusión.

Los números de los días se asignan con el día uno definido como el primer día de tratamiento. Los números de los días en estos análisis reflejan el número de días transcurridos desde el primer día de tratamiento, y no días de tratamiento real; así pues, algunos pacientes habían completado el ensayo el día 18, aún permanecían en seguimiento o no lo habían terminado. Otros pacientes contaron con períodos adicionales o ampliados de tratamiento después del día 18.

Para poder determinar de forma más precisa los efectos estimados de la inyección de DL-2, los «valores de cambio dentro del sujeto» relativos al colesterol se utilizaron como una medida de resultados en el análisis y la regresión del punto final mediante ANOVA. Estos valores de cambio se definieron de dos formas para el modelo MANOVA:

$$P_{\text{final1}} = \frac{(\text{Inicial} - \text{día 18}^*)}{\text{Inicial}}$$

donde inicial = media (del cribado y del día 1), día 18\* = media (de los días 18, 20 y 28)

$$P_{\text{final2}} = \frac{(\text{Inicial} - \text{día 35}^*)}{\text{Inicial}}$$

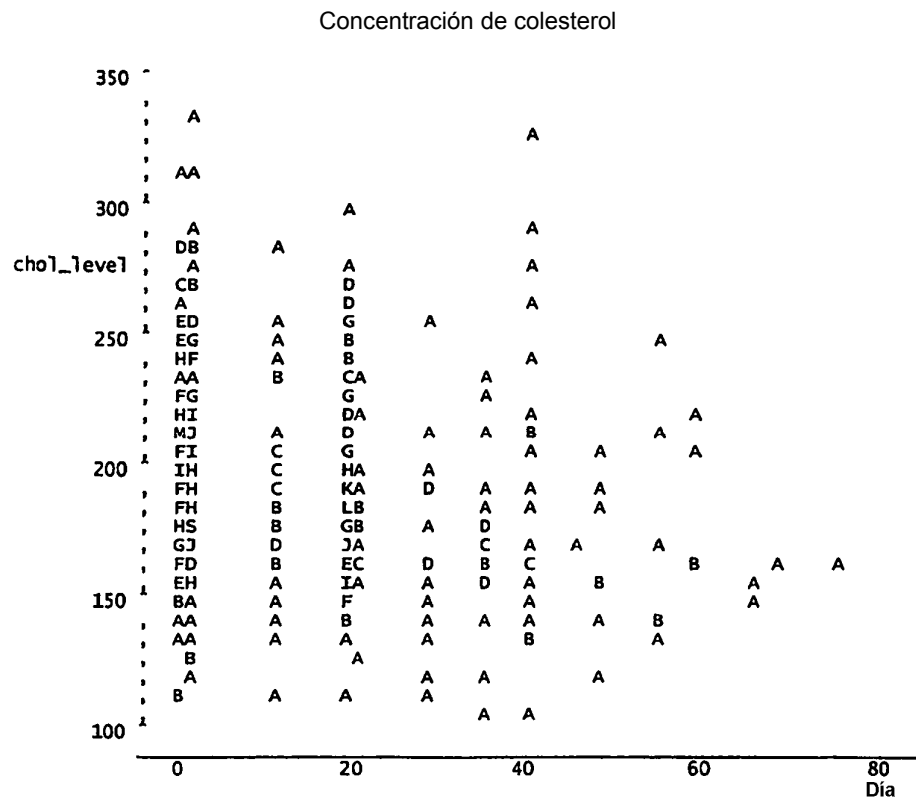
donde inicial = media (del cribado y del día 1), día 35\* = media (de los días 35 y 40).

Regresión y presentación gráfica de la totalidad de la base de datos reunida

La toma de metadatos en conjunto muestra una imagen general, tal y como se representa en la tabla 3 presentada a continuación. Esta representación gráfica muestra una clara tendencia descendente en los valores de concentración del colesterol a lo largo del tiempo. El modelo de regresión de este gráfico se presenta a continuación. La pendiente de regresión de estos datos durante días es -0,64.

Tabla 3

Distribución de concentraciones individuales de colesterol por fecha de prueba; se incluyen todos los datos conservados para su análisis procedentes de los protocolos 50234-01, 50234-02, 50234-03 y 33575-01



#### Modelo de regresión

El modelo de regresión es muy significativo desde el punto de vista estadístico,  $p < 0,0001$ . Tanto el efecto de la duración de la terapia como la dosis de ésta contribuyeron a la reducción en las concentraciones medias de colesterol. La pendiente de cambio estimada como consecuencia de cada día adicional es de -0,641, tal y como se indica en la tabla 4, lo cual indica que, para cada día de tratamiento, el nivel medio de colesterol (en todos los grupos) se redujo en -0,64. Esta estimación es estadísticamente significativa desde cero, lo cual significa que existe una reducción real como consecuencia del tratamiento. Debido a la naturaleza observacional (y seleccionada a propósito) de los datos, esta ecuación no puede utilizarse para sacar conclusiones sobre la población general; no obstante, los datos apuntan firmemente a la existencia de una relación entre el tratamiento mediante inyección de interleucina leucocitaria (LI) y el cambio del colesterol en suero.

Tabla 4

Modelo de regresión de los valores del colesterol agregados a través de diferentes laboratorios y protocolos, con respecto a la duración del tratamiento y al nivel de dosis.

5

El procedimiento REG  
Modelo: MODEL1  
Variable dependiente: nivel\_col

| Fuente          | GL  | Suma de cuadrados | Media cuadrática | Valor F | Pr > F  |
|-----------------|-----|-------------------|------------------|---------|---------|
| Modelo          | 2   | 80274             | 40137            | 28,72   | <0,0001 |
| Error           | 487 | 680534            | 1397,39986       |         |         |
| Total corregido | 489 | 760808            |                  |         |         |

|                        |           |                |        |
|------------------------|-----------|----------------|--------|
| Error cuadrático medio | 37,38181  | R cuadrada     | 0,1055 |
| Media dependiente      | 198,01486 | R. cuad. ajus. | 0,1018 |
| CoefVar                | 18,87829  |                |        |

10

Estimaciones de parámetros

| Variable     | Etiqueta     | GL | Estimación de parámetros | Error estándar | Valor t | Pr>(t)  |
|--------------|--------------|----|--------------------------|----------------|---------|---------|
| Intersección | Intersección | 1  | 198,13752                | 2,70045        | 73,37   | <0,0001 |
| Día          | Día          | 1  | -0,64092                 | 0,11254        | -5,70   | <0,0001 |
| total_dosis  | total_dosis  | 1  | 0,00220                  | 0,00044071     | 4,99    | <0,0001 |

15

Como puede apreciarse a partir de los datos de la tabla 5, los efectos simultáneos (tipo III, suma de cuadrados), de duración (día) y el efecto cruzado del protocolo y la dosis, este último sigue siendo significativo y, en el presente modelo, la  $R^2$  (cantidad de varianza explicada) aumenta hasta el 27%, con un modelo  $p < 0,0001$ . El efecto cruzado significa que se produjo un efecto ligeramente diferente en los estudios, incluso cuando utilizaron la misma dosis del tratamiento mediante inyección de interleucina leucocitaria.

20

Tabla 5

Procedimiento GLM  
Variable dependiente: nivel\_col

| Fuente          | GL  | Suma de cuadrados | Media cuadrática | Valor F | Pr > F  |
|-----------------|-----|-------------------|------------------|---------|---------|
| Modelo          | 31  | 206096,3973       | 66482709         | 5,49    | <0,0001 |
| Error           | 458 | 554711,2664       | 1211,1600        |         |         |
| Total corregido | 489 | 760807,6637       |                  |         |         |

25

|            |          |                        |                 |
|------------|----------|------------------------|-----------------|
| R cuadrada | CoefVar  | Error cuadrático medio | Media nivel_col |
| 0,270892   | 17,57531 | 34,80172               | 198,0149        |

| Fuente                 | GL | Suma de cuadrados de tipo III | Media cuadrática | Valor F | Pr>F    |
|------------------------|----|-------------------------------|------------------|---------|---------|
| Día                    | 14 | 16624,9584                    | 1187,4970        | 0,98    | 0,4722  |
| total_dosis* protocolo | 17 | 138518,6574                   | 8148,1563        | 6,73    | <0,0001 |

30

El cambio relativo desde el nivel inicial como función de los niveles iniciales de colesterol del paciente y de la dosis recibida durante el tratamiento también se analizó, tal y como se muestra en la tabla 6. Los resultados del modelo GLM indicaron que existía una importante diferencia como consecuencia de los niveles iniciales de colesterol. Lamentablemente, no es posible determinar si existe un efecto diferente para pacientes con niveles relativos de lípidos en sangre altos o bajos, o bien si el factor es un indicador para las poblaciones de estudio en cada protocolo.

Tabla 6

Cantidad media de reducción de colesterol  
Desde el inicio hasta el día 18  
Medida en mg/dl, por grupo de dosis

| Dosis  | N  | Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Mediana |
|--------|----|-------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|---------|
| 200    | 5  | 4,1   | -9,0                                             | 17,1                                             | 3,9     |
| 400    | 3  | 6,6   | -16,4                                            | 29,7                                             | 2,9     |
| 800    | 13 | 0,3   | -10,3                                            | 10,9                                             | 4,3     |
| 1.200  | 6  | 12,4  | -18,0                                            | 42,8                                             | 2,5     |
| 1.600  | 9  | 10,4  | -5,9                                             | 26,7                                             | 11,4    |
| 2.400  | 16 | -7,4  | -23,5                                            | 8,7                                              | -13,0   |
| 3.200  | 12 | 15,9  | -0,4                                             | 32,2                                             | 18,1    |
| 4.800  | 12 | 9,8   | -0,5                                             | 20,2                                             | 16,3    |
| 8.000  | 6  | 3,6   | -29,9                                            | 37,1                                             | 3,8     |
| 9.600  | 7  | 4,4   | -27,1                                            | 35,8                                             | 8,5     |
| 12.000 | 3  | 35,7  | -23,2                                            | 94,6                                             | 41,4    |

ptfinal

| Fuente          | GL | Suma de cuadrados | Media cuadrática | Valor F | Pr > F |
|-----------------|----|-------------------|------------------|---------|--------|
| Modelo          | 7  | 18,11382251       | 2,58768893       | 3,65    | 0,0098 |
| Error           | 21 | 14,87077231       | 0,70813201       |         |        |
| Total corregido | 28 | 32,98459483       |                  |         |        |

|            |          |                        |               |
|------------|----------|------------------------|---------------|
| R cuadrada | CoefVar  | Error cuadrático medio | Media ptfinal |
| 0,549160   | 17,44552 | 0,841506               | 4,823621      |

| Fuente  | GL | Suma de cuadrados de tipo I | Media cuadrática | Valor F | Pr>F   |
|---------|----|-----------------------------|------------------|---------|--------|
| inicial | 1  | 11,56487006                 | 11,56487006      | 16,33   | 0,0006 |
| dosis   | 6  | 6,54895246                  | 1,09149208       | 1,54    | 0,2136 |

Concentraciones medias de colesterol en suero estratificadas por protocolo y grupos de dosis

Las concentraciones medias de colesterol para días de prueba específicos se estratificaron en grupos de dosis: 200, 400, 800, 1.200, 1.600, 2.400, 3.200, 4.800, 8.000, 9.600 y 12.000 UI/mL. Muchos estratos presentaban un número muy reducido de observaciones (n) y, en consecuencia, los intervalos de confianza relativos a la media eran amplios. Con una n pequeña, es complicado demostrar diferencias significativas entre las medias diarias. No obstante, las estimaciones puntuales (medias) demuestran claramente una reducción en la concentración media de colesterol con el paso del tiempo en varios de los grupos de dosis.

Las medias tanto del grupo de dosis de 1.200 como del de 1.600 UI/mL indican un cambio desde el inicio. En el grupo de dosis de 1.600 UI/mL, existe un número desigual de observaciones diarias. No obstante, las estimaciones puntuales (medias) están respaldadas por los valores simultáneos de la mediana; ambos indican un nivel reducido de los valores del colesterol con el paso del tiempo.

En los grupos de dosis de 2.400, 3.200 y 4.800 UI/mL existe una pequeña variación en la estimación puntual. Sólo en el grupo de 3.200 UI/mL la mediana y la forma general de la distribución de datos del colesterol respalda la tendencia implícita a partir de los valores medios. Las medias para el grupo de dosis de 4.800 UI/mL ponen de manifiesto un pequeño cambio desde el día 1 al día 18; no obstante, debido a que n es 14, no se dispuso de un poder estadístico para determinar si este cambio es estadísticamente significativo.

Tal y como se muestra en los siguientes ejemplos, los niveles de dosis de 1.200, 1.600 y 3.200 UI/mL parecen tener el efecto más fuerte. El nivel de dosis de 2400 UI/mL presentaba muchos valores atípicos, que provocaron un sesgo en la distribución y afectaron a la estimación de la media; además, las estimaciones medias para ALT y AST no variaron desde los valores iniciales hasta los posteriores al tratamiento, tal y como se muestra en los siguientes ejemplos. Particularmente, ninguno de los cambios desde el valor inicial hasta el posterior al tratamiento para ALT y AST es estadísticamente significativo en ninguna de las poblaciones de protocolo, lo que sugiere que la LI puede usarse en pacientes con problemas hepáticos.

**Ejemplo 1**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 200 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Nivel de dosis 200 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 5   | 192,5   | 146,0                                            | 239,0                                            | 196,1 |
| 1   | 5   | 184,1   | 144,1                                            | 224,0                                            | 181,0 |
| 10  | 5   | 185,2   | 145,1                                            | 225,3                                            | 183,7 |
| 18  | 5   | 183,2   | 143,5                                            | 222,9                                            | 178,7 |
| 20  | 5   | 183,5   | 152,6                                            | 214,3                                            | 174,8 |
| 28  | 5   | 170,4   | 138,3                                            | 202,5                                            | 179,0 |
| 35  | 5   | 171,1   | 122,3                                            | 220,0                                            | 165,3 |

**Ejemplo 2**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 400 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 8.

Tabla 8

Nivel de dosis 400 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 3   | 190,3   | 138,7                                            | 241,8                                            | 188,3 |
| 1   | 3   | 203,0   | 153,6                                            | 252,4                                            | 208,4 |
| 10  | 3   | 192,1   | 144,4                                            | 239,8                                            | 195,7 |
| 18  | 2   | 181,2   | 95,2                                             | 267,2                                            | 181,2 |
| 20  | 3   | 187,2   | 155,3                                            | 219,0                                            | 183,3 |
| 28  | 3   | 175,6   | 108,9                                            | 242,2                                            | 189,5 |
| 35  | 3   | 166,2   | 152,2                                            | 180,1                                            | 168,6 |
| 40  | 2   | 160,7   | 158,2                                            | 163,1                                            | 160,7 |

**Ejemplo 3**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 800 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9

Nivel de dosis 800 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 26  | 199,4   | 183,5                                            | 215,3                                            | 200,7 |
| 1   | 25  | 202,4   | 186,1                                            | 218,8                                            | 182,3 |
| 10  | 4   | 162,0   | 102,2                                            | 221,8                                            | 167,2 |
| 18  | 26  | 206,9   | 189,5                                            | 224,4                                            | 186,0 |
| 20  | 3   | 197,7   | 121,3                                            | 274,2                                            | 185,2 |
| 28  | 3   | 176,2   | 120,8                                            | 231,6                                            | 165,5 |
| 35  | 3   | 175,3   | 156,2                                            | 194,4                                            | 177,9 |

**Ejemplo 4**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 1.200 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10

Nivel de dosis 1.200 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza<br>del 95% de la media | Límite superior de confianza<br>del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| 0   | 6   | 237,1   | 193,3                                               | 280,9                                               | 242,5 |
| 1   | 6   | 218,5   | 167,4                                               | 269,7                                               | 209,4 |
| 18  | 6   | 215,4   | 178,3                                               | 252,5                                               | 208,2 |

**Ejemplo 5**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 1.600 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 11.

Tabla 11

Nivel de dosis 1.600 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza<br>del 95% de la media | Límite superior de confianza<br>del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| 0   | 20  | 207,7   | 186,7                                               | 228,6                                               | 213,3 |
| 1   | 20  | 208,9   | 192,4                                               | 225,4                                               | 198,4 |
| 10  | 4   | 149,4   | 103,0                                               | 195,8                                               | 139,6 |
| 18  | 20  | 195,2   | 175,2                                               | 215,2                                               | 188,7 |
| 20  | 4   | 149,8   | 97,1                                                | 202,5                                               | 161,3 |
| 28  | 4   | 137,9   | 98,5                                                | 177,2                                               | 137,5 |
| 35  | 4   | 138,1   | 97,2                                                | 178,9                                               | 140,2 |
| 40  | 3   | 136,6   | 67,4                                                | 205,9                                               | 138,4 |

**Ejemplo 6**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 2.400 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 12.

Tabla 12

Nivel de dosis 2.400 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza<br>del 95% de la media | Límite superior de confianza<br>del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| 0   | 11  | 201,1   | 175,6                                               | 226,6                                               | 204,2 |
| 1   | 17  | 180,6   | 161,1                                               | 200,0                                               | 179,8 |
| 18  | 16  | 195,9   | 176,9                                               | 214,9                                               | 202,8 |
| 35  | 2   | 164,5   | 88,4                                                | 240,7                                               | 164,5 |

**Ejemplo 7**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 3.200 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13

Nivel de dosis 3.200 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza<br>del 95% de la media | Límite superior de confianza<br>del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-------|
| 0   | 18  | 205,7   | 194,2                                               | 217,1                                               | 210,8 |
| 1   | 18  | 200,8   | 186,4                                               | 215,2                                               | 206,9 |
| 18  | 17  | 188,0   | 175,6                                               | 200,4                                               | 195,3 |

**Ejemplo 8**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 4.800 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 14.

Tabla 14

Nivel de dosis 4.800 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 15  | 207,9   | 186,8                                            | 228,9                                            | 216,2 |
| 1   | 12  | 199,2   | 177,0                                            | 221,4                                            | 202,1 |
| 18  | 13  | 197,0   | 174,8                                            | 219,2                                            | 194,5 |

**Ejemplo 9**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 8.000 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15

Nivel de dosis 8.000 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 5   | 209,9   | 158,7                                            | 261,1                                            | 203,0 |
| 1   | 5   | 214,5   | 162,6                                            | 266,5                                            | 213,1 |
| 18  | 6   | 213,7   | 161,1                                            | 266,2                                            | 210,8 |

**Ejemplo 10**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 9.600 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 16.

Tabla 16

Nivel de dosis 9.600 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 0   | 7   | 223,1   | 189,1                                            | 257,0                                            | 222,7 |
| 1   | 7   | 215,9   | 189,7                                            | 242,1                                            | 223,9 |
| 18  | 7   | 215,1   | 177,4                                            | 252,8                                            | 226,2 |

**Ejemplo 11**

A continuación se recogen los resultados de los valores medios diarios de laboratorio para el colesterol, agregados a partir de diferentes laboratorios y protocolos y agrupados por dosis, con un nivel de 12.000 UI/mL tal y como se muestra en la tabla 17.

Tabla 17

Nivel de dosis 12.000 UI/mL, variable de análisis: nivel\_col

| Día | Obs | N Media | Límite inferior de confianza del 95% de la media | Límite superior de confianza del 95% de la media | Media |
|-----|-----|---------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------|
| 1   | 22  | 221,2   | 201,0                                            | 241,4                                            | 215,0 |
| 10  | 17  | 202,3   | 182,7                                            | 222,0                                            | 208,8 |
| 18  | 2   | 181,0   | 87,6                                             | 274,3                                            | 181,0 |
| 28  | 3   | 235,5   | -54,4                                            | 525,4                                            | 235,5 |
| 35  | 7   | 202,5   | 176,6                                            | 228,4                                            | 193,4 |
| 40  | 13  | 232,4   | 192,1                                            | 272,8                                            | 216,6 |

**Ejemplo 12**

A continuación se recogen los resultados de los valores de la ALT, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-02 (50234-02), tal y como se muestra en la tabla 18.

Tabla 18

Alanina transaminasa (ALT)  
Procedimiento MEANS  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día        | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|------------|-----|---------|------------|---------|
| Evaluación | 33  | 23,5    | 10,4       | 22,0    |
| Día 1      | 33  | 22,1    | 10,5       | 19,0    |
| Posterior  | 33  | 28,1    | 21,8       | 23,0    |

**Ejemplo 13**

A continuación se recogen los resultados de los valores AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-02 (50234-02), tal y como se muestra en la tabla 19.

Tabla 19

Aspartato transaminasa (AST)  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día        | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|------------|-----|---------|------------|---------|
| Evaluación | 33  | 25,9    | 7,2        | 26,0    |
| Día 1      | 33  | 24,3    | 6,6        | 24,0    |
| Posterior  | 33  | 27,2    | 18,0       | 22,0    |

**Ejemplo 14**

A continuación se recogen los resultados de los valores ALT, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-01 (33575-01), tal y como se muestra en la tabla 20.

Tabla 20

Alanina transaminasa (ALT)  
Procedimiento MEANS  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día        | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|------------|-----|---------|------------|---------|
| Evaluación | 3   | 16,0    | 2,6        | 17,0    |
| C1D1       | 3   | 14,3    | 2,3        | 13,0    |
| C1D12      | 5   | 16,4    | 2,1        | 17,0    |
| C1D5       | 3   | 13,7    | 1,2        | 13,0    |
| C2D1       | 4   | 15,3    | 3,1        | 16,0    |
| C2D15      | 2   | 13,5    | 0,7        | 13,5    |
| C2D8       | 2   | 14,5    | 0,7        | 14,5    |
| C3D1       | 6   | 15,2    | 2,7        | 15,5    |

C = ciclo del tratamiento

D = Día

Por ejemplo, C1D1 = ciclo de tratamiento 1, día 1

**Ejemplo 15**

A continuación se recogen los resultados de los valores AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-01 (33575-01), tal y como se muestra en la tabla 21.

Tabla 21

Aspartato transaminasa (AST)  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día     | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|---------|-----|---------|------------|---------|
| Cribado | 16  | 23,2    | 6,8        | 21,0    |
| C1D1    | 14  | 24,7    | 10,1       | 22,0    |
| C1D12   | 14  | 24,6    | 8,8        | 24,5    |
| C1D5    | 15  | 24,9    | 9,5        | 25,0    |

C = ciclo del tratamiento

D = Día

Por ejemplo, C1D1 = ciclo de tratamiento 1, día 1

### Ejemplo 16

A continuación se recogen los resultados de los valores AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-01 (33575-01), tal y como se muestra en la tabla 22.

Tabla 22

Aspartato transaminasa (AST)  
Procedimiento MEANS  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día   | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|-------|-----|---------|------------|---------|
| C2D1  | 14  | 23,3    | 9,7        | 21,5    |
| C2D15 | 14  | 29,2    | 36,8       | 19,0    |
| C2D8  | 15  | 22,2    | 8,8        | 20,0    |
| C3D1  | 11  | 24,4    | 13,6       | 21,0    |
| C4D1  | 4   | 25,5    | 18,4       | 17,0    |
| C5D1  | 3   | 36,0    | 32,1       | 20,0    |

C = ciclo del tratamiento

D = Día

Por ejemplo, C1D1 = ciclo de tratamiento 1, día 1

### Ejemplo 17

A continuación se recogen los resultados de los valores ALT, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-04 (50234-01), tal y como se muestra en la tabla 23.

Tabla 23

Alanina transaminasa (ALT)  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día       | Obs | N Media | Desv. típ. | Mediana |
|-----------|-----|---------|------------|---------|
| Cribado   | 26  | 26,6    | 12,7       | 23,5    |
| Día 1     | 26  | 24,7    | 13,0       | 21,0    |
| Posterior | 26  | 28,8    | 11,2       | 26,0    |

### Ejemplo 18

A continuación se recogen los resultados de los valores AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Cel-04 (50234-01), tal y como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24

Aspartato transaminasa (AST) El procedimiento MEANS  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día       | Obs | Media | Desv. típ. | Mediana |
|-----------|-----|-------|------------|---------|
| Cribado   | 26  | 28,5  | 17,9       | 21,0    |
| Día 1     | 26  | 32,6  | 27,2       | 21,0    |
| Posterior | 26  | 25,9  | 9,3        | 25,0    |

**Ejemplo 19**

A continuación se recogen los resultados de los valores AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Hun-01 (50234-03), tal y como se muestra en la tabla 25.

Tabla 25

Aspartato transaminasa (AST)  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día           | Obs | Media | Desv. típ. | Mediana |
|---------------|-----|-------|------------|---------|
| Cribado       | 21  | 27,8  | 15,5       | 22,0    |
| Día 1         | 29  | 23,4  | 17,5       | 18,0    |
| Posterior     | 29  | 21,4  | 8,4        | 19,0    |
| seguimiento z | 8   | 19,3  | 2,3        | 20,0    |

**Ejemplo 20**

A continuación se recogen los resultados de los valores de la ALT, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Hun-02 (50234-03), tal y como se muestra en la tabla 26.

Tabla 26

Alanina transaminasa (ALT)  
El procedimiento MEANS  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día           | Obs | Media | Desv. típ. | Mediana |
|---------------|-----|-------|------------|---------|
| Cribado       | 15  | 25,4  | 22,8       | 16,2    |
| Día 1         | 20  | 28,7  | 37,4       | 15,5    |
| Posterior     | 20  | 22,8  | 17,3       | 16,0    |
| seguimiento z | 14  | 43,6  | 32,0       | 29,0    |

**Ejemplo 21**

A continuación se recogen los resultados de los valores de la AST, que no muestran un cambio significativo desde el valor inicial hasta el valor posterior al tratamiento en pacientes del protocolo Hun-02 (50234-03), tal y como se muestra en la tabla 27.

Tabla 27

Aspartato transaminasa (AST)  
Variable de análisis: Valor de laboratorio valor\_lab

| Día           | Obs | Media | Desv. típ. | Mediana |
|---------------|-----|-------|------------|---------|
| Cribado       | 15  | 31,9  | 27,4       | 25,0    |
| Día 1         | 20  | 41,2  | 54,4       | 17,5    |
| Posterior     | 20  | 26,5  | 22,1       | 20,4    |
| seguimiento z | 14  | 43,3  | 34,8       | 24,0    |

Resulta evidente que pueden introducirse variaciones en la invención descrita. Dichas variaciones no deben considerarse como una modificación del alcance del espíritu de la invención y la totalidad de dichas modificaciones están comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

## REIVINDICACIONES

1. Mezcla de citocina libre de suero y de mitógenos compuesta de proporciones específicas de citocinas seleccionadas de entre el grupo de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y GM-CSF con respecto a la interleucina-2 (IL-2):

IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,4 - 1,5;  
TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,2 - 11,3;  
IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 1,5 - 10,9; y  
GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 2,2 - 4,8

para su utilización en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno que pueda tratarse o prevenirse a través de la reducción de los niveles de colesterol.

2. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que las proporciones específicas de citocinas son:

IL-1 $\beta$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 0,6 a 0,8;  
TNF- $\alpha$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 7,7 a 10,9;  
IFN- $\gamma$  con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 4,9 a 7,1; y  
GM-CSF con respecto a IL-2 en un intervalo de proporciones de 3,5 a 4,5;

3. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1600 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

4. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 3, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 40 UI a 800 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

5. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 4, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas en un intervalo de aproximadamente 35 UI a 75 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

6. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas a 55 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

7. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas a 200 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

8. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas a 400 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

9. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas a 800 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

10. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos semanas a 1200 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

11. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de dos

semanas a 1600 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

- [illegible]

semanas a 3.200 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.

- 5 25. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces por semana durante un período de tres semanas a 4.800 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 10 26. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces por semana durante un período de tres semanas a 8.000 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 15 27. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces por semana durante un período de tres semanas a 9.600 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 20 28. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces por semana durante un período de tres semanas a 12.000 UI en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 25 29. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra tres veces por semana durante un período de ocho a veintiséis semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI, en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 30 30. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 3, en la que dicha mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos se administra cinco veces por semana durante un período de ocho a veintiséis semanas en un intervalo de aproximadamente 20 UI a 1.600 UI, en la que UI representan las unidades internacionales para la interleucina-2 establecidas en la 1ª norma internacional para la IL-2 humana, 86/504, de la Organización Mundial de la Salud.
- 35 31. Mezcla de citocina libre de suero y libre de mitógenos según la reivindicación 1, en la que la enfermedad o el trastorno se selecciona de entre el grupo constituido por enfermedad cardiovascular, dislipidemia, dislipoproteinemia, hipertensión e hiperlipidemia.