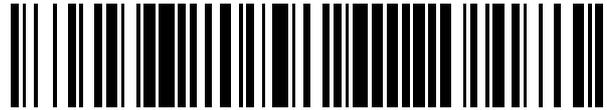


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 584 327**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/55** (2006.01)  
**A61P 31/18** (2006.01)  
**A61K 31/225** (2006.01)  
**A61K 31/573** (2006.01)  
**A61K 31/606** (2006.01)  
**A61K 31/23** (2006.01)  
**A61K 31/60** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2008 E 10015894 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.04.2016 EP 2368555**

54 Título: **Composiciones y métodos de uso de ésteres de forbol**

30 Prioridad:

**31.01.2007 US 898810 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2016**

73 Titular/es:

**BIOSUCCESS BIOTECH COMPANY (100.0%)  
312 North Mansfield Avenue  
Los Angeles, CA 90036, US**

72 Inventor/es:

**CHANG, RICHARD y  
HAN, ZHENG TAO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 584 327 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

Composiciones y métodos de uso de ésteres de forbol

### Campo técnico

5 La presente descripción se refiere en general al campo de las enfermedades citopáticas. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones que contienen ésteres de forbol y a métodos de uso de los ésteres de forbol para tratar el VIH.

### Antecedentes

10 El forbol es un compuesto orgánico natural, derivado de plantas de la familia tigliane de diterpenos. Fue aislado por primera vez en 1934 como un producto de la hidrólisis del aceite de croton derivado de las semillas de *Croton tiglium*, un arbusto frondoso de la familia Euphorbiaceae que es originario del sudeste de Asia. Varios ésteres de forbol tienen importantes propiedades biológicas, incluyendo la capacidad, descrita, de imitar a los diacilgliceroles y activar la proteína cinasa C (PKC), modulando aguas abajo las rutas de señalización celular, incluyendo las rutas de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK). Se cree, además, que los ésteres de forbol se unen a las quimerinas, el activador de Ras RasGRP, y la proteína Munc-13 del cebado de las vesículas (Brose N, Rosenmund C., J. Cell Sci; 115: 4399-411 (2002)). Algunos ésteres de forbol inducen también el factor nuclear kappa B (NF-κB). La propiedad fisiológica más importante de los ésteres de forbol es su capacidad, descrita, para actuar como promotores tumorales.

20 El 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), llamado también forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), es un éster de forbol utilizado en modelos de carcinogénesis como un inductor de la diferenciación y/o apoptosis en múltiples líneas celulares y células primarias. También se ha publicado que el TPA causa un aumento en los glóbulos blancos y en los neutrófilos circulantes, en pacientes cuya función de la médula ósea ha sido deprimida por la quimioterapia (Han Z. T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 5363-5365 (1998)) y que inhibe los efectos citopáticos del VIH en las células MT-4 (Mekkawy S. et al, Phytochemistry 53, 47-464 (2000)). Sin embargo, debido a una variedad de factores, incluyendo las reacciones cáusticas cuando se pone en contacto con la piel y la inquietud por su toxicidad potencial, no se ha demostrado que el TPA sea una herramienta eficaz para el tratamiento, gestión, o prevención del VIH o SIDA.

30 Los agentes terapéuticos actuales para las enfermedades citopáticas tales como diversas formas de enfermedad neoplásica y enfermedades víricas tales como el VIH y SIDA, tienen una serie de inconvenientes tales como una potencia insuficiente y efectos secundarios intolerables. Para muchos pacientes, los efectos secundarios tóxicos disminuyen su calidad de vida hasta un extremo que simplemente dejan de tomar sus medicamentos. Para otros, los regímenes terapéuticos son tan complicados e inconvenientes que el cumplimiento es limitado. Otros pacientes experimentan excelentes resultados inicialmente, pero sufren recaídas a pesar del pleno cumplimiento de los regímenes terapéuticos.

35 El fracaso del tratamiento en la mayoría de los casos de VIH, se atribuye a la aparición de cepas resistentes de VIH. La supresión viral incompleta causada por la insuficiente potencia del fármaco, el escaso cumplimiento debido a regímenes farmacológicos complicados, y otros factores, contribuyen a este problema. Además, durante el largo período de latencia clínica de la infección por el VIH, un subconjunto de linfocitos T CD4 de memoria en reposo, encubre provirus integrados, pero transcripcionalmente silenciosos. Este reservorio protege al VIH latente de la terapia retroviral y representa una barrera sustancial para la erradicación del VIH en los pacientes infectados.

40 Los tratamientos del cáncer generalmente incluyen una combinación de tratamientos, cirugía, quimioterapia, terapia hormonal y/o radiación para erradicar las células neoplásicas en un paciente. Sin embargo, todos estos métodos plantean importantes inconvenientes y riesgos añadidos tales como un aumento de la sensibilidad a la infección. La cirugía, por ejemplo, puede estar contraindicada debido a la salud de un paciente. Además, puede ser difícil obtener márgenes claros alrededor de un tumor, lo que da como resultado que algo del tejido neoplásico se deje atrás y una mayor probabilidad de recurrencia de la enfermedad. Casi todos los agentes quimioterapéuticos actuales son tóxicos, y la quimioterapia causa efectos secundarios significativos, incluyendo náuseas severas, depresión de la médula ósea, e inmunodepresión. Tampoco pueden ser dirigidos específicamente a las células cancerosas y, por tanto, pueden matar las células sanas, además de las cancerosas. Adicionalmente, frecuentemente hay neoplasias recidivantes/refractarias que son resistentes a los agentes terapéuticos actuales.

50 Existe claramente la necesidad de nuevos y más eficaces tratamientos para los individuos que sufren trastornos citopáticos, incluyendo los causados por enfermedad neoplásica, así como también las infecciones víricas tales como VIH y SIDA.

### Sumario de las realizaciones a modo de ejemplo de la invención

55 La presente invención se refiere a composiciones y medicamentos que comprenden ésteres de forbol para uso en el tratamiento del VIH. La invención proporciona el compuesto de la reivindicación 1, para el uso de la reivindicación 1, el uso de la reivindicación 2, y la composición de la reivindicación 6, para el uso de la reivindicación 6.

Las composiciones y medicamentos pueden conseguir el tratamiento de VIH por cualquier medio posible. Las composiciones pueden modificar la actividad del receptor del VIH en los sujetos mamíferos. Las composiciones pueden disminuir el número de reservorios de VIH latente en un sujeto infectado por el VIH. Pueden aumentar la activación de VIH en las células pro-virales latentes. Pueden inhibir también los efectos citopáticos del VIH.

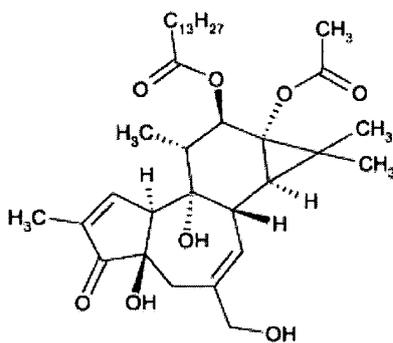
- 5 Las composiciones que contienen ésteres de forbol y derivados de ésteres de forbol se pueden utilizar para el tratamiento y gestión de los síntomas de VIH y SIDA en los sujetos mamíferos. Los síntomas a los que se dirige el tratamiento y gestión que emplea las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, lesiones orales, fatiga, candidosis cutánea, fiebre, falta de apetito, diarrea, úlceras aftosas, mala absorción, trombocitopenia, pérdida de peso, anemia, dilatación de los ganglios linfáticos, sensibilidad a y gravedad de las afecciones secundarias tales como el complejo de *Mycobacterium avium*, salmonelosis, sífilis, neurosífilis, tuberculosis (TB), angiomatosis bacilar, aspergilosis, candidosis, coccidioidomicosis, listeriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, linfoma de Burkitt, meningitis criptocócica, histoplasmosis, sarcoma de Kaposi, linfoma sistémico no Hodgkin (NHL), linfoma primario del SNC, criptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, neumonía por *pneumocystis carinii* (PCP), toxoplasmosis, citomegalovirus (CMV), hepatitis, herpes simple, herpes zoster, virus del papiloma humano (HPV, verrugas genitales, cáncer de cuello uterino), molusco contagioso, leucoplasia vellosa oral (OHL), y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).

- 10 Los compuestos que contienen ésteres de forbol y derivados de ésteres de forbol se pueden usar para tratar afecciones citopáticas tales como las enfermedades neoplásicas. Tales neoplasias pueden ser malignas o benignas. En algunas realizaciones, las neoplasias pueden ser cánceres sólidos o no sólidos. Las neoplasias pueden ser recidivantes. Las neoplasias pueden ser refractarias. Los ejemplos de neoplasias incluyen, pero no se limitan a, neoplasias malignas hematológicas/trastornos de la médula ósea, que incluyen, pero no se limitan a, leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), crisis blástica de leucemia mieloide crónica, mielodisplasia, y síndrome mieloproliferativo; linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; adenocarcinoma subcutáneo; teratocarcinoma de ovario; y cáncer de próstata. Otras afecciones neoplásicas susceptibles de tratamiento utilizando los métodos y composiciones incluyen otros trastornos y afecciones de cáncer, incluyendo tumores sólidos de varios tipos, donde el tratamiento y/o la remisión satisfactoria se determinarán según métodos convencionales, tales como determinar la reducción de tamaño de los tumores sólidos, y/o los estudios histopatológicos para evaluar el crecimiento, la fase, el estado metastásico o potencial, la presencia o los niveles de expresión de marcadores histológicos de cáncer, etc.

- 20 Las composiciones y métodos de la presente memoria se pueden utilizar adicionalmente para tratar los síntomas de la enfermedad neoplásica incluyendo, pero sin limitarse a, anemia; fatiga crónica; sangrado excesivo o fácil, tal como el sangrado de la nariz, las encías y debajo de la piel; hematomas fáciles, particularmente hematomas sin causa aparente; dificultad para respirar; petequias; fiebre recurrente; inflamación de las encías; cicatrización lenta de cortes; molestias en los huesos y articulaciones; infecciones recurrentes; pérdida de peso; prurito; sudores nocturnos; hinchazón de los ganglios linfáticos; fiebre; dolor y malestar abdominal; alteraciones de la visión; tos; pérdida de apetito; dolor en el pecho; dificultad para tragar; hinchazón de la cara, cuello y extremidades superiores; necesidad de orinar frecuentemente, especialmente por la noche; dificultad para empezar a orinar o para retener la orina; flujo de orina débil o interrumpido; dolor o ardor al orinar; dificultad para tener una erección; eyaculación dolorosa; sangre en la orina o en el semen; dolor frecuente o rigidez en la zona lumbar, caderas o parte alta del muslo; y debilidad.

- 25 Todavía en otra realización, los ésteres de forbol y derivados de ésteres de forbol se pueden utilizar para modular las rutas de señalización celular. Dicha modulación puede tener una variedad de resultados, por ejemplo, en algunas realizaciones, el uso de las composiciones que contienen ésteres de forbol y derivados de ésteres de forbol puede aumentar el recuento de glóbulos blancos en los sujetos mamíferos. En otra realización, las composiciones que contienen ésteres de forbol y/o derivados de ésteres de forbol pueden alterar la liberación de citocinas Th1 en los sujetos mamíferos. En una realización adicional, las composiciones que contienen ésteres de forbol y/o derivados de ésteres de forbol pueden alterar la liberación de la interleucina 2 (IL-2) en los sujetos mamíferos. En una realización adicional, las composiciones que contienen ésteres de forbol y/o derivados de ésteres de forbol pueden alterar la liberación de interferón en los sujetos mamíferos. Las composiciones que contienen ésteres de forbol y/o derivados de ésteres de forbol pueden alterar la tasa de fosforilación de ERK.

- 30 En una realización, se alcanzan estos objetivos y se satisfacen objetivos y ventajas adicionales proporcionando composiciones nuevas y sorprendentemente eficaces para la modulación de las rutas de señalización celular y/o para el tratamiento de enfermedades citopáticas o afecciones asociadas con enfermedades citopáticas utilizando una composición a modo de ejemplo de un éster de forbol tal como 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) de la fórmula II, que sigue:



Fórmula II

- Los ésteres de forbol y compuestos relacionados y derivados útiles, dentro de las formulaciones y métodos descritos en la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a, otras sales activas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, así como también los isómeros, enantiómeros, polimorfos, derivados glucosilados, solvatos, hidratos, y/o profármacos, activos, de dichos compuestos. Las formas de ésteres de forbol a modo de ejemplos, para uso dentro de las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, incluyen, pero no se limitan a, forbol 13-butirato; forbol 12-decanoato; forbol 13-decanoato; forbol 12,13-diacetato; forbol 13,20-diacetato; forbol 12,13-dibenzoato; forbol 12,13-dibutirato; forbol 12,13-didecanoato; forbol 12,13-dihexanoato; forbol 12,13-dipropionato; forbol 12-miristato; forbol 13-miristato; forbol 12-miristato-13-acetato (también conocido como TPA o PMA); forbol 12,13,20-triacetato; 12-desoxiforbol 13-angelato; 12-desoxiforbol 13-angelato 20-acetato; 12-desoxiforbol 13-isobutirato; 12-desoxiforbol 13-isobutirato-20-acetato; 12-desoxiforbol 13-fenilacetato; 12-desoxiforbol 13-fenilacetato 20-acetato; 12-desoxiforbol 13-tetradecanoato; forbol 12-tigliato 13-decanoato; 12-desoxiforbol 13 acetato; forbol 12-acetato; y forbol 13-acetato.
- En realizaciones a modo de ejemplo, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria emplean un compuesto éster de forbol de la fórmula II para tratar y/o prevenir los síntomas de enfermedades citopáticas, incluyendo, pero sin limitarse a, los síntomas del VIH y SIDA u otras enfermedades y afecciones asociadas con el VIH y el SIDA tales como infecciones oportunistas, además de los síntomas de enfermedades neoplásicas u otras enfermedades y afecciones asociadas con enfermedades neoplásicas.
- Los sujetos mamíferos susceptibles de tratamiento con ésteres de forbol de la fórmula II, particularmente TPA, según los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, sujetos con VIH y SIDA, así como sujetos con síntomas, o enfermedades secundarias u oportunistas asociadas con el VIH y el SIDA, tales como lesiones orales, fatiga, candidosis cutánea, fiebre, falta de apetito, diarrea, úlceras aftosas, mala absorción, trombocitopenia, pérdida de peso, anemia, dilatación de los ganglios linfáticos, complejo de Mycobacterium avium, salmonelosis, sífilis, neurosífilis, tuberculosis (TB), angiomatosis bacilar, aspergilosis, candidosis, coccidioidomicosis, listeriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, linfoma de Burkitt, meningitis criptocócica, histoplasmosis, sarcoma de Kaposi, linfoma, linfoma sistémico no Hodgkin (NHL), linfoma primario del SNC, criptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, neumonía por pneumocystis carinii (PCP), toxoplasmosis, citomegalovirus (CMV), hepatitis, herpes simple, herpes zoster, virus del papiloma humano (HPV, verrugas genitales, cáncer de cuello uterino), molusco contagioso, leucoplasia vellosa oral (OHL), y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).
- Sujetos mamíferos adicionales susceptibles de tratamiento con ésteres de forbol de la fórmula II, particularmente TPA, según los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, sujetos que sufren enfermedades neoplásicas incluyendo enfermedades neoplásicas malignas tales como cánceres sólidos y no sólidos. Los cánceres no sólidos pueden incluir, neoplasias malignas hematológicas/trastornos de la médula ósea, incluyendo, pero sin limitarse a, leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), crisis blástica de leucemia mieloide crónica, mielodisplasia, síndrome mieloproliferativo. Los cánceres sólidos pueden incluir, pero no se limitan a, linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin, adenocarcinoma subcutáneo, teratocarcinoma de ovario, y cáncer de próstata. Los sujetos susceptibles de tratamiento con ésteres de forbol de la fórmula II, particularmente TPA, incluyen adicionalmente aquellos que tienen síntomas de dichas enfermedades neoplásicas tales como, pero sin limitarse a, anemia; fatiga crónica; sangrado excesivo o fácil, tal como el sangrado de nariz, encías y debajo de la piel; hematomas fáciles, particularmente hematomas sin causa aparente; dificultad para respirar; petequias; fiebre recurrente; inflamación de las encías; cicatrización lenta de cortes; molestias en los huesos y articulaciones; infecciones recurrentes; pérdida de peso; prurito; sudores nocturnos; hinchazón de los ganglios linfáticos; fiebre; dolor y malestar abdominal; alteraciones de la visión; tos; pérdida de apetito; dolor en el pecho; dificultad para tragar; hinchazón de la cara, cuello y extremidades superiores; necesidad de orinar frecuentemente, especialmente por la noche; dificultad para empezar a orinar o para retener la orina; flujo de orina débil o interrumpido; dolor o ardor al orinar; dificultad para tener una erección; eyaculación dolorosa; sangre en la orina o en el semen; dolor frecuente o rigidez en la zona lumbar, caderas o parte alta del muslo; y debilidad. En algunas realizaciones, tales cánceres pueden ser recidivantes o refractarios.

Estos y otros sujetos se tratan eficazmente, profiláctica y/o terapéuticamente, mediante la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un éster de forbol de la fórmula II suficiente para prevenir o reducir la carga vírica, disminuir los reservorios latentes de VIH, aumentar la capacidad de respuesta inmunitaria, aumentar la liberación de citocinas Th1, prevenir o reducir los síntomas y afecciones asociadas con el VIH y el SIDA, disminuir y/o eliminar las células neoplásicas, aumentar el recuento de glóbulos blancos, inducir la remisión, mantener la remisión, prevenir o reducir los síntomas y afecciones asociadas con neoplasias malignas y/o aumentar la fosforilación de ERK. Los métodos y formulaciones terapéuticamente útiles de la invención, utilizarán de modo efectivo un éster de forbol de la fórmula II en una variedad de formas, como se ha indicado antes, incluyendo cualquiera de las sales activas farmacéuticamente aceptables de dicho compuesto, así como los isómeros, enantiómeros, polimorfos, solvatos, hidratos, profármacos, activos, y/o combinaciones de los mismos. El TPA de la fórmula II se emplea como una realización ilustrativa de la invención dentro de los ejemplos de esta memoria más adelante.

Se describen formulaciones de combinación y métodos que emplean una cantidad eficaz de un éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes activos secundarios o adyuvantes que se formulan en combinación o que se administran coordinadamente con el compuesto éster de forbol de la fórmula II para dar una respuesta eficaz en el sujeto. Las formulaciones de combinación y los métodos de tratamiento coordinados, a modo de ejemplo, en el tratamiento de enfermedades citopáticas víricas tales como VIH y SIDA emplean el compuesto éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes retrovirales adicionales, agentes de tratamiento del VIH o SIDA o con otros agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes indicados. Tales formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados pueden seguir, por ejemplo, o derivarse de diversos protocolos de terapia antirretroviral de gran actividad (protocolos TARGA o HAART) e incluyen regímenes tales como, pero sin limitarse a, dos análogos nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa más uno o más inhibidores de la proteasa o un análogo no nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa entre otras combinaciones. Otras formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados pueden incluir, por ejemplo, tratamientos para las infecciones oportunistas, así como los compuestos para los protocolos TARGA. Los agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes utilizados en combinación, por ejemplo, con TPA, en estas realizaciones, pueden tener efectos antivirales directos o indirectos, solos o en combinación, por ejemplo, con TPA, pueden presentar otra actividad terapéutica adyuvante útil en combinación con, por ejemplo, TPA (tal como la prevención del VIH, tratamiento de VIH, activación del reservorio de VIH, aumento de la actividad de la citocina Th1); o pueden presentar actividad terapéutica adyuvante útil para tratar las infecciones oportunistas asociadas con el VIH, solos o en combinación con TPA, por ejemplo.

Los agentes terapéuticos adyuvantes útiles en estas formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados incluyen, por ejemplo, inhibidores de la proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, tipranavir y amprenavir; nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo pero sin limitarse a, zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, zalcitabina, emtricitabina, tenofovir disoproxil fumarato, AVX754 y abacavir; no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo, pero sin limitarse a, nevirapina, delavirdina, calanolida A, TMC125 y efavirenz; fármacos de combinación, incluyendo, pero sin limitarse a, efavirenz/emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina/zidovudina, abacavir/lamivudina, abacavir/lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, sulfametoxazol/trimetoprim, y lopinavir/ritonavir; inhibidores de la entrada y de la fusión, incluyendo, pero sin limitarse a, enfuvirtida, AMD070, BMS-488043, fozivudina tidoxil, GSK-873,140, PRO 140, PRO 542, Péptido T, SCH-D, TNX-355 y UK-427,857; tratamientos para las infecciones oportunistas y otras afecciones asociadas con el SIDA y el VIH incluyendo, pero sin limitarse a, aciclovir, adefovir dipivoxil, aldesleucina, anfotericina B, azitromicina, hidroxapatita de calcio, claritromicina, doxorubicina, dronabinol, entecavir, epoetina alfa, etopósido, fluconazol, ganciclovir, inmunoglobulinas, el interferón alfa-2, isoniazida, itraconazol, megestrol, paclitaxel, peginterferón alfa-2, pentamidina, ácido poliláctico 1, ribavirina, rifabutina, rifampicina, somatropina, testosterona, trimetrexato, y valganciclovir; inhibidores de la integrasa, incluyendo, pero sin limitarse a, GS 9137, MK-0518; microbicidas, incluyendo, pero sin limitarse a, BMS-378806, C31G, carbopol 974P, carragenina, sulfato de celulosa, cianovirina-N, sulfato de dextrano, hidroxietilcelulosa, PRO 2000, SPL7013, tenofovir, UC-781 e IL-2.

Los ejemplos de formulaciones de combinación y los métodos de tratamiento coordinados, en el tratamiento de una enfermedad neoplásica emplean el compuesto éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales para el tratamiento de la enfermedad neoplásica o de otros agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes indicados. Los agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes utilizados en combinación con TPA, por ejemplo, en estas realizaciones pueden tener efectos quimioterapéuticos directos o indirectos, solos o en combinación, por ejemplo, con TPA, pueden presentar otra actividad terapéutica adyuvante útil en combinación con, por ejemplo, TPA (tal como actividad citotóxica, anti-inflamatoria, inhibidora de NF-κB, inductora de la apoptosis, actividad de aumento de la citocina Th1); o pueden presentar actividad terapéutica adyuvante útil para tratar neoplasias o síntomas asociados solos o en combinación con TPA, por ejemplo.

Los agentes terapéuticos adyuvantes o secundarios útiles en estas formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados incluyen doxorubicina, vitamina D3, citarabina, arabinósido de citosina, daunorubicina, ciclofosfamida, geituzumab ozogamicina, idarubicina, mercaptopurina, mitoxantrona, tioguanina, aldesleucina, asparaginasa, carboplatino, fosfato de etopósido, fludarabina, metotrexato, etopósido, dexametasona, y trisalicilato

de colina y magnesio. Además, se pueden utilizar terapias adyuvantes o secundarias, tales como, pero no limitadas a, tratamiento de radiación, terapia hormonal y cirugía.

Los objetivos, características, aspectos y ventajas, precedentes y adicionales, se aclararán a partir de la siguiente descripción detallada.

**5 Descripción detallada de ejemplos de realizaciones de la invención**

Se han identificado nuevos métodos y composiciones para uso en la prevención y/o tratamiento de enfermedades y afecciones citopáticas en sujetos mamíferos. En diversas realizaciones, los métodos y las composiciones son eficaces para prevenir o tratar el VIH y el SIDA y afecciones relacionadas, enfermedades causadas por el VIH y el SIDA, y/o enfermedades adquiridas a causa de la infección por VIH o SIDA. En otras realizaciones, los métodos y composiciones son eficaces para prevenir o tratar enfermedades neoplásicas y los síntomas de tales enfermedades. Dichas enfermedades neoplásicas pueden ser o no malignas. En algunas realizaciones, las enfermedades neoplásicas pueden ser cánceres sólidos o no sólidos. En otras realizaciones, los cánceres pueden ser refractarios o recidivantes.

Las formulaciones y métodos proporcionados en esta memoria emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y fácilmente suministrados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como nuevos compuestos de tratamiento del VIH y del SIDA.

Las formulaciones y métodos proporcionados en la presente memoria, emplean adicionalmente un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y fácilmente suministrados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, en el tratamiento de enfermedades neoplásicas.

Las formulaciones y métodos para disminuir la carga viral proporcionados en la presente memoria, emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y fácilmente suministrados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como nuevos agentes de disminución de la carga viral.

Las formulaciones y métodos para inducir la apoptosis proporcionados en esta memoria emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y fácilmente suministrados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como agentes quimioterapéuticos que inducen la apoptosis en las neoplasias.

Las formulaciones y métodos para inducir la remisión proporcionados en esta memoria emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y suministrados fácilmente, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como agentes antineoplásicos.

Las formulaciones y métodos para aumentar la capacidad de respuesta inmunitaria proporcionados en la presente memoria emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y suministrados fácilmente, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como compuestos estimuladores del sistema inmunitario.

Las formulaciones y métodos para aumentar la citocina Th1 proporcionados en esta memoria emplean un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, anterior, incluyendo todos los compuestos activos farmacéuticamente aceptables de esta descripción, así como diversos complejos previstos y suministrados fácilmente, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos y profármacos de estos compuestos y combinaciones de los mismos, como nuevos agentes para aumentar la citocina Th1.

Una amplia variedad de sujetos mamíferos, incluyendo los seres humanos, son susceptibles de tratamiento utilizando las formulaciones y métodos de la invención. Estos sujetos incluyen, pero no se limitan a, los individuos que sufren enfermedades o afecciones citopáticas incluyendo enfermedades neoplásicas y enfermedades citopáticas virales tales como VIH y SIDA.

Los sujetos susceptibles de tratamiento incluyen los seres humanos VIH+ y otros sujetos mamíferos que presentan lesiones orales, fatiga, candidosis cutánea, fiebre, falta de apetito, diarrea, úlceras aftosas, mala absorción, trombocitopenia, pérdida de peso, anemia, dilatación de los ganglios linfáticos, sensibilidad y gravedad de las afecciones secundarias tales como el complejo de Mycobacterium avium, salmonelosis, sífilis, neurosífilis,

tuberculosis (TB), angiomatosis bacilar, aspergilosis, candidosis, coccidioidomicosis, listeriosis, enfermedad inflamatoria pélvica, linfoma de Burkitt, meningitis criptocócica, histoplasmosis, sarcoma de Kaposi, linfoma, linfoma sistémico no Hodgkin (NHL), linfoma primario del SNC, criptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, neumonía por pneumocystis carinii (PCP), toxoplasmosis, citomegalovirus (CMV), hepatitis, herpes simple, herpes zoster, virus del papiloma humano (HPV, verrugas genitales, cáncer de cuello uterino), molusco contagioso, leucoplasia vellosa oral (OHL), y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).

Dentro de los métodos y composiciones de la invención, uno o más compuestos ésteres de forbol de la fórmula II como se describe en la presente memoria, se formulan de modo eficaz o se administran como un agente eficaz para el tratamiento de VIH/SIDA. En realizaciones a modo de ejemplo, se demuestra con fines ilustrativos que TPA es un agente eficaz en formulaciones farmacéuticas y métodos terapéuticos, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adyuvantes. La presente descripción proporciona además, compuestos de ésteres de forbol farmacéuticamente aceptables en la forma de un compuesto natural o sintético, incluyendo complejos, derivados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos, y profármacos de los compuestos descritos en la presente memoria, y combinaciones de los mismos, que son eficaces como agentes terapéuticos dentro de los métodos y composiciones de la invención en el tratamiento de VIH/SIDA y afecciones relacionadas.

El síndrome de deficiencia inmunitaria adquirida o el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es un conjunto de síntomas e infecciones resultantes de los daños al sistema inmunitario causados por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). El daño al sistema inmunitario deja a los individuos propensos a infecciones oportunistas y tumores. Aunque existen tratamientos para el SIDA y el VIH para ralentizar la progresión del virus y la gravedad de los síntomas, no existe curación conocida.

El VIH es un retrovirus que infecta principalmente a componentes del sistema inmunitario humano, tales como las células T CD4+, los macrófagos y las células dendríticas. Cuando las células T CD4 + son destruidas y su número total disminuye por debajo de 200 células T CD4+/ $\mu$ L de sangre o el porcentaje de células T CD4+ como una fracción de los linfocitos totales cae a menos del 14 %, se pierde la inmunidad celular, conduciendo al SIDA.

Se cree actualmente que un cambio en el equilibrio de las citocinas T<sub>h</sub>1 y T<sub>h</sub>2 puede contribuir a la disregulación inmunitaria asociada con la infección por el VIH. Las células T<sub>h</sub>1 producen citocinas que estimulan la proliferación de las células T citotóxicas. Las células T<sub>h</sub>2 producen citocinas que son responsables de la activación de las respuestas inmunitarias humorales en las personas sanas. La progresión desde la infección por VIH hasta el SIDA se caracteriza por una disminución en los niveles de las citocinas T<sub>h</sub>1 IL-2, IL-12 e IFN- $\gamma$  con un aumento concomitante en los niveles de las citocinas T<sub>h</sub>2, IL-4, IL-5 e IL-10. (Clerci, Immunology Today, v 14, No. 3, p 107-110, 1993; Becker, Virus Genes 28: 1, 5-18 (2004)). La resistencia a la infección por VIH y/o la resistencia a la progresión al SIDA, puede ser dependiente por lo tanto de una dominación de T<sub>h</sub>1 > T<sub>h</sub>2.

Una fracción de las células T CD4+ de memoria contiene provirus para el VIH inactivos integrados transcripcionalmente. Estos reservorios latentes pueden ser activados para producir virus infeccioso activo después de la activación por antígenos específicos o citocinas. La semivida de estas células T CD4 de memoria es de al menos 44 meses lo que hace extremadamente difícil eliminar el VIH y que se requiera la continuación prolongada de la terapia antirretroviral, incluso cuando los niveles de VIH en la sangre periférica son indetectables.

La prostratina, 12-desoxiforbol 13-acetato, un éster de forbol que no es promotor tumoral, según se ha publicado, ha demostrado alguna eficacia para inhibir la muerte celular inducida por el VIH y la replicación viral. La prostratina, según se ha publicado, ha activado la expresión viral en líneas celulares infectadas de forma latente, pero ha tenido poco o ningún efecto sobre las líneas celulares infectadas crónicamente. (Gulakowski, et al., Antiviral Research v 33, 87-97 (1997); Williams, et al, JBC v 279, No. 40, P. 42.008-42.017 (2004).). La prostratina representa una subclase diferente de los activadores de la proteína cinasa C, que tiene actividades biológicas únicas que difieren de los ésteres de forbol promotores de tumores, tales como TPA.

Los sujetos mamíferos susceptibles de tratamiento con ésteres de forbol de la fórmula II, especialmente TPA, según los métodos proporcionados en la presente memoria, incluyen adicionalmente, pero no se limitan a, sujetos mamíferos con enfermedades neoplásicas, incluyendo cánceres sólidos y no sólidos, incluyendo neoplasias malignas hematológicas/trastornos de la médula ósea, tales como la leucemia, incluyendo leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mieloide crónica (CML), crisis blástica de leucemia mieloide crónica, mielodisplasia, síndrome mieloproliferativo; linfoma, incluyendo linfoma de Hodgkin y linfoma no Hodgkin; adenocarcinoma subcutáneo; teratocarcinoma de ovario; y cáncer de próstata. En algunas realizaciones, tales cánceres pueden ser recidivantes o refractarios.

Dentro de los métodos y composiciones proporcionados en la presente memoria, uno o más compuestos ésteres de forbol de la fórmula II como se describe aquí se formulan de modo eficaz o se administran como un agente eficaz para el tratamiento de enfermedades neoplásicas. En realizaciones a modo de ejemplo, se demuestra con fines ilustrativos que TPA es un agente eficaz en formulaciones farmacéuticas y métodos terapéuticos, solo o en combinación con uno o más agentes terapéuticos adyuvantes. La presente descripción proporciona además compuestos de ésteres de forbol farmacéuticamente aceptables adicionales, en la forma de un compuesto natural o sintético, incluyendo complejos, derivados, sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos, y profármacos de

los compuestos descritos en la presente memoria, y combinaciones de los mismos, que son eficaces como agentes terapéuticos dentro de los métodos y composiciones de la descripción en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y los síntomas de tales enfermedades.

5 Enfermedad neoplásica es cualquier crecimiento o tumor causado por la división celular anormal y descontrolada; se puede extender a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. Tales crecimientos pueden ser malignos o benignos, sólidos o no sólidos.

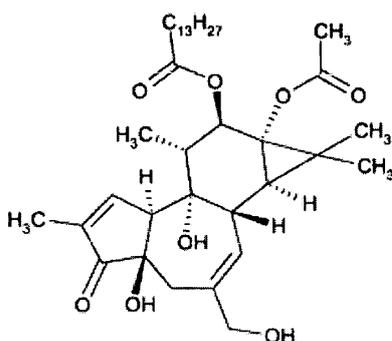
10 En algunas realizaciones, las enfermedades neoplásicas pueden ser una neoplasia hematológica/trastorno de la médula ósea tal como leucemia mieloide aguda (AML). La AML (llamada también leucemia mielógena aguda, leucemia mieloblástica aguda, leucemia granulocítica aguda y leucemia aguda no linfocítica) es el tipo más común de leucemia aguda en adultos. En la AML, las células madre producidas por la médula ósea usualmente se desarrollan hasta un tipo de glóbulos blancos inmaduros llamados mieloblastos (o blastos mieloides). En los individuos que padecen AML, estos mieloblastos no maduran en glóbulos blancos sanos. Adicionalmente, las células madre de los individuos con AML se pueden desarrollar hasta glóbulos rojos o plaquetas anormales. La falta de células sanguíneas normales aumenta la incidencia de infección, la anemia y el sangrado fácil. Adicionalmente, las células leucémicas se pueden extender fuera de la sangre a otras partes del cuerpo, incluyendo el sistema nervioso central (cerebro y médula espinal), la piel y las encías.

15 La edad media de un paciente con leucemia mieloide aguda es más de 64 años de edad. Los pacientes mayores de 60 años tratados por AML con agentes quimioterapéuticos estándar tienen una tasa de remisión de menos del 20 %. Además, los pacientes que desarrollan AML después de un trastorno hematológico precedente o antes de una quimioterapia leucomogénica/terapia de radiación tienen resultados igualmente deficientes.

El forbol es un alcohol policíclico natural, derivado de plantas de la familia tigliane de diterpenos. Fue aislado por primera vez en 1934 como el producto de la hidrólisis de aceite de croton derivado de las semillas de *Croton tiglium*. Es muy soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos polares y en el agua.

25 Las formas orgánicas y sintéticas de los ésteres de forbol, incluyendo cualquier preparación o extracto de fuentes vegetales tales como *croton tiglium*, se contemplan como composiciones útiles que comprenden ésteres de forbol (o análogos de ésteres de forbol, compuestos relacionados y/o derivados) para su uso dentro de las realizaciones de esta memoria.

30 Un ejemplo de realización de un compuesto éster de forbol útil en el tratamiento de enfermedades citopáticas tales como el VIH y el SIDA y/o enfermedades neoplásicas, particularmente AML, se encuentra en el forbol 12-miristato-13-acetato (conocido también como PMA o 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA)) mostrado en la Fórmula II, a continuación.



Fórmula II

35 Los ésteres de forbol útiles adicionales y los compuestos y derivados relacionados dentro de las formulaciones y métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a, otras sales activas farmacéuticamente aceptables de dichos compuestos, así como los isómeros, enantiómeros, polimorfos, derivados glucosilados, solvatos, hidratos, y/o profármacos activos, de dichos compuestos. Otras formas ejemplares de los ésteres de forbol para uso dentro de las composiciones y métodos descritos aquí incluyen, pero no se limitan a, forbol 13-butilato; forbol 12-decanoato; forbol 13-decanoato; forbol 12,13-diacetato; forbol 13,20-diacetato; forbol 12,13-dibenzoato; forbol 12,13-dibutilato; forbol 12,13-didecanoato; forbol 12,13-dihexanoato; forbol 12,13-dipropionato; forbol 12-miristato; forbol 13-miristato; forbol 12,13,20-triacetato; 12-desoxiforbol 13-angelato; 12-desoxiforbol 13-angelato 20-acetato; 12-desoxiforbol 13-isobutilato; 12-desoxiforbol 13-isobutilato-20-acetato; 12-desoxiforbol 13-fenilacetato; 12-desoxiforbol 13-fenilacetato 20-acetato; 12-desoxiforbol 13-tetradecanoato; forbol 12-tigliato 13-decanoato; 12-desoxiforbol 13-acetato; forbol 12-acetato; y forbol 13-acetato.

45 Las composiciones para tratar las enfermedades citopáticas de la presente memoria, comprenden composiciones para tratar el VIH y el SIDA que comprenden una cantidad eficaz anti-SIDA de un compuesto éster de forbol de la

- 5 fórmula II, que es eficaz para la profilaxis y/o el tratamiento de VIH, SIDA, y/o síntomas relacionados con el VIH, incluyendo las infecciones oportunistas, en un sujeto mamífero. Una cantidad eficaz "anti-VIH", "anti-SIDA", o "para tratar el SIDA" del compuesto activo es terapéuticamente eficaz, en una forma farmacéutica unitaria de dosis única o múltiple, durante un período especificado de intervención terapéutica, para aliviar de forma medible uno o más síntomas del SIDA en un sujeto, y/o para aliviar uno o más síntomas o afecciones asociadas con la infección por VIH en el sujeto. Dentro de las realizaciones ejemplares, las composiciones son eficaces en los métodos de tratamiento para aliviar los síntomas del SIDA u otras afecciones relacionadas con el VIH en sujetos humanos y otros mamíferos vulnerables a la infección por VIH.
- 10 Las composiciones para tratar enfermedades citopáticas de la presente memoria, pueden comprender adicionalmente composiciones quimioterapéuticas que comprenden una cantidad eficaz anti-neoplásica de un éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, que es eficaz para el mantenimiento y tratamiento de neoplasias malignas o síntomas causados por el cáncer en un mamífero. Una cantidad eficaz "quimioterapéutica", "anti-tumoral", "de tratamiento del cáncer", "para inducción de la apoptosis", "para inducción de la remisión", "para mantener la remisión" del compuesto activo es terapéuticamente eficaz, en una forma farmacéutica unitaria de dosis
- 15 única o múltiple, a lo largo de un período especificado de intervención terapéutica, para aliviar de forma medible uno o más síntomas o afecciones asociados con la neoplasia maligna en el sujeto. Dentro de las realizaciones ejemplares, las composiciones de la descripción son eficaces en los métodos de tratamiento para aliviar los síntomas de las afecciones relacionadas con la enfermedad neoplásica en los seres humanos y otros mamíferos vulnerables a las neoplasias malignas.
- 20 Las composiciones para el tratamiento de enfermedades citopáticas, incluyendo el tratamiento quimioterapéutico y el tratamiento de VIH, comprenden típicamente una cantidad eficaz o dosis unitaria de un compuesto éster de forbol de la fórmula II, que puede ser formulada con uno o más portadores, excipientes, vehículos, agentes emulsionantes, estabilizantes, conservantes, tampones, farmacéuticamente aceptables, y/o otros aditivos que puedan mejorar la estabilidad, la administración, la absorción, la semivida, la eficacia, la farmacocinética, y/o la farmacodinamia, reducir
- 25 los efectos secundarios adversos, o proporcionar otras ventajas para el uso farmacéutico. Las cantidades eficaces de un compuesto éster de forbol o compuesto relacionado o derivado de la fórmula II (por ejemplo, una dosis unitaria que comprende una concentración/cantidad eficaz de TPA, o de una sal, isómero, enantiómero, solvato, polimorfo y/o profármaco de TPA, farmacéuticamente aceptable) serán determinadas fácilmente por los expertos en la técnica, dependiendo de factores clínicos y específicos del paciente. Las cantidades de los compuestos activos en dosis
- 30 unitarias eficaces adecuadas para administración a los sujetos mamíferos, incluyendo los seres humanos, pueden variar de 10 a 1500 µg, 20 a 1000 µg, de 25 a 750 µg, 50 a 500 µg, o 150 a 500 µg. En ciertas realizaciones, la dosis eficaz de tratamiento de la enfermedad citopática de un compuesto éster de forbol o compuesto relacionado o derivado de la fórmula II se puede seleccionar dentro de intervalos más estrechos, por ejemplo, de 10 a 25 µg, 30-50 µg, 75 a 100 µg, 100 a 250 µg, o 250 a 500 µg. Estas y otras cantidades de dosis unitaria eficaces se pueden
- 35 administrar en una sola dosis, o en la forma de dosis múltiples diarias, semanales o mensuales, por ejemplo, en un régimen de dosificación que comprende de 1 a 5, o de 2 a 3, dosis administradas al día, a la semana o al mes. En una realización ejemplar, las dosis de 10 a 30 µg, 30 a 50 µg, 50 a 100 µg, 100 a 250 µg, o 250 a 500 µg, se administran una, dos, tres, cuatro, o cinco veces al día. En realizaciones más detalladas, las dosis de 50-100 µg, 100-250 µg, 250-400 µg, o 400-600 µg, se administran una o dos veces al día. En una realización adicional, las
- 40 dosis de 50-100 µg, 100-2500 µg, 250-400 µg, o 400-600 µg, se administran en días alternos. En realizaciones alternativas, las dosis se calculan en base al peso corporal, y se pueden administrar, por ejemplo, en cantidades de aproximadamente 0,5 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 100 µg/m<sup>2</sup> al día, 1 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 75 µg/m<sup>2</sup> al día, 1 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 50 µg/m<sup>2</sup> al día, 2 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 50 µg/m<sup>2</sup> al día, 2 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 30 µg/m<sup>2</sup> al día o 3 µg/m<sup>2</sup> a aproximadamente 30 µg/m<sup>2</sup> al día.
- 45 La cantidad, el tiempo y el modo de administración de las composiciones que comprenden una cantidad eficaz, para tratar una enfermedad citopática, de un compuesto éster de forbol de la fórmula II (cantidad eficaz para tratamiento del SIDA, prevención del VIH, tratamiento de VIH, activación del reservorio de VIH, aumento de la citocina Th1, inducción de la fosforilación ERK, quimioterapéutica, anti-tumoral, de tratamiento del cáncer, inducción de la remisión, mantenimiento de la remisión, inducción de la apoptosis) serán ajustados de manera rutinaria sobre una
- 50 base individual, dependiendo de factores tales como el peso, edad, sexo, y condición del individuo, la gravedad de la enfermedad citopática y/o de los síntomas relacionados, si la administración es profiláctica o terapéutica, y sobre la base de otros factores conocidos para realizar la administración de fármacos, absorción, farmacocinética, incluyendo la semivida y la eficacia.
- 55 Un régimen de tratamiento de una dosis eficaz o dosis múltiples para las formulaciones de tratamiento inmediato de la enfermedad citopática (alternativamente, "tratamiento del SIDA", "tratamiento del VIH", "prevención del VIH", "activación del reservorio de VIH", o "aumento de la citocina Th1", "inducción de la fosforilación ERK", "quimioterapéutica", "anti-tumoral", "tratamiento del cáncer", "inducción de la apoptosis", "inducción de la remisión", "mantenimiento de la remisión") proporcionadas en la presente memoria, se seleccionará normalmente para aproximarse a un régimen de dosificación mínima que sea necesaria y suficiente para prevenir o aliviar
- 60 sustancialmente los síntomas de la enfermedad citopática incluyendo el SIDA o las enfermedades neoplásicas tales como el cáncer y las enfermedades oportunistas relacionadas, en el sujeto, y/o para prevenir o aliviar sustancialmente uno o más síntomas asociados con el SIDA o enfermedades neoplásicas tales como el cáncer en el

sujeto. Un protocolo de dosificación y administración incluirá a menudo la terapia de dosis repetidas a lo largo de varios días o incluso una o más semanas o años. Un régimen eficaz de tratamiento puede incluir también la dosis profiláctica administrada en un día o dosis múltiples al día de forma duradera a lo largo de días, semanas, meses o incluso años.

5 Se pueden emplear fácilmente varios ensayos y sistemas modelo para determinar la eficacia terapéutica del tratamiento de las enfermedades citopáticas. Por ejemplo, en el tratamiento del VIH o SIDA se puede demostrar la eficacia por una disminución de la carga viral, un aumento en los recuentos de CD4, un aumento en los recuentos de CD3, un aumento en la producción de IL-2 e IFN, una disminución en la producción de IL-4 e IL-10, y una disminución o eliminación de los síntomas del SIDA, entre otros métodos de determinación de la eficacia conocidos para los expertos en la técnica.

10 La eficacia de las composiciones y métodos descritos en esta memoria se puede demostrar, por ejemplo, a través de análisis de sangre para detectar anticuerpos contra el VIH, la carga viral, los niveles de CD4, los recuentos de CD8, y los recuentos de CD3. Los niveles normales de CD4 están usualmente entre 600 y 1200 por microlitro, o 32-68 % de linfocitos. Las personas con un recuento de CD4 de menos de 350 tienen un sistema inmunitario debilitado. Aquellas con un recuento de CD4 de menos de 200 se considera que tienen SIDA. Los niveles de CD8 en un individuo sano están generalmente entre 150-1000 por microlitro. Los niveles de CD3 en un individuo sano en general están entre aproximadamente 885-2270 por microlitro. Los niveles de células CD3, CD4 y CD8 se pueden medir, por ejemplo, usando citometría de flujo. Las cantidades eficaces de las composiciones aumentarán los niveles de las células positivas para CD3, CD4 y CD8 en al menos 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor reducción, hasta un 75-90 %, o 95 % o mayor. Las cantidades eficaces moverán también el perfil de CD3, CD4 y CD8 de un individuo hacia la categoría óptima para cada tipo de glucoproteína.

15 Los individuos se pueden evaluar también utilizando un ensayo de beta<sub>2</sub>-microglobulina (beta<sub>2</sub>-M). La beta<sub>2</sub>-microglobulina es una proteína liberada a la sangre cuando muere una célula. Un nivel creciente de beta<sub>2</sub>-M en sangre se puede utilizar para medir la progresión del SIDA. Las cantidades eficaces de una composición de la presente descripción darán lugar a una disminución o cese del aumento en la cantidad de beta<sub>2</sub>-M.

20 La eficacia se puede demostrar además utilizando un recuento sanguíneo completo (CBC). Las medidas realizadas en un CBC incluyen un recuento de glóbulos blancos (WBC), un recuento de glóbulos rojos (RBC), el ancho de distribución eritrocitaria, el hematocrito y la cantidad de hemoglobina. Los signos específicos relacionados con el SIDA en un recuento sanguíneo completo incluyen un hematocrito bajo, una fuerte disminución del número de plaquetas sanguíneas, y un nivel bajo de neutrófilos. Una cantidad eficaz de una composición aumentará los niveles medidos en un recuento sanguíneo completo en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor aumento, hasta un 75-90 %, o 95 % o mayor. Las cantidades eficaces también moverán las proteínas de la sangre de un individuo hacia la categoría óptima para cada tipo de proteína.

25 La eficacia de las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria se puede demostrar también por una disminución en los síntomas de VIH o de SIDA, incluyendo, pero sin limitarse a, lesiones orales, fatiga, candidosis cutánea, fiebre, falta de apetito, diarrea, úlceras aftosas, mala absorción, trombocitopenia, pérdida de peso, anemia y dilatación de los ganglios linfáticos.

30 La eficacia de las composiciones y métodos proporcionados en la presente memoria se puede demostrar también por una disminución de la susceptibilidad para y gravedad de las afecciones secundarias u oportunistas tales como complejo de Mycobacterium avium, salmonelosis, sífilis, neurosífilis, tuberculosis (TB), angiomatosis bacilar, aspergilosis, candidosis, coccidioidomicosis, listeriosis, enfermedad pélvica inflamatoria, linfoma de Burkitt, meningitis criptocócica, histoplasmosis, sarcoma de Kaposi, linfoma, linfoma sistémico no Hodgkin (NHL), linfoma primario del SNC, criptosporidiosis, isosporiasis, microsporidiosis, neumonía por pneumocystis carinii (PCP), toxoplasmosis, citomegalovirus (CMV), hepatitis, herpes simple, herpes zoster, virus del papiloma humano (HVP, verrugas genitales, cáncer de cuello uterino), molusco contagioso, leucoplasia vellosa oral (OHL), y leucoencefalopatía multifocal progresiva (PML).

35 La eficacia se puede demostrar además por la reducción del VIH detectable en el sujeto infectado por el VIH; el mantenimiento de un recuento normal de células T; o el mantenimiento de los niveles normales de antígeno p24.

40 La eficacia en el tratamiento de enfermedades neoplásicas se puede determinar también por una serie de métodos tales como, pero sin limitarse a, la escala funcional de ECOG, escala funcional de Karnofsky, examen microscópico de las células sanguíneas, aspirado de médula ósea y biopsia, análisis citogenético, biopsia, inmunofenotipado, estudios de la química de la sangre, un hemograma completo, biopsia de los ganglios linfáticos, frotis de sangre periférica, análisis visual de un tumor o lesión, o cualquier otro método de evaluación y/o diagnóstico de tumores malignos y de la progresión de los tumores, conocidos por los expertos en la técnica.

45 Por ejemplo, la eficacia de las composiciones y métodos de esta memoria en el tratamiento de neoplasias hematológicas malignas/trastornos de la médula ósea se puede evaluar utilizando, un recuento absoluto de neutrófilos (ANC). Un ANC normal está entre 1500 a 8000/mm<sup>3</sup>. Los individuos que sufren neoplasias hematológicas malignas/trastornos de la médula ósea tienen con frecuencia un ANC por debajo de 1500/mm<sup>3</sup>, y pueden llegar

incluso a niveles por debajo de 500/mm<sup>3</sup>. Las cantidades eficaces de las composiciones y métodos de la presente memoria aumentarán el ANC de un individuo en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor aumento, hasta un 75-90 %, o 95 % o mayor. Las cantidades eficaces pueden aumentar los niveles de ANC por encima de 1500/mm<sup>3</sup>.

5 La eficacia de las composiciones y métodos de esta memoria en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas/trastornos de la médula ósea se puede evaluar además utilizando, por ejemplo, un recuento de plaquetas. Un recuento de plaquetas está normalmente entre 150.000 a 450.000 plaquetas por microlitro (x 10-6/litro). Los individuos que sufren de neoplasias malignas hematológicas/trastorno de la médula ósea pueden tener recuentos de plaquetas por debajo de 100.000 por microlitro. Las cantidades eficaces de las composiciones y métodos de la presente memoria aumentarán el recuento de plaquetas de un individuo en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor aumento, hasta un 75-90 %, o 95 % o mayor. Las cantidades eficaces pueden aumentar los niveles de plaquetas por encima de 100.000 por microlitro

15 La eficacia de las composiciones y métodos de esta memoria en el tratamiento de neoplasias malignas hematológicas/trastornos de la médula ósea, se puede evaluar adicionalmente, por ejemplo, midiendo el número de mieloblastos. Los mieloblastos normalmente representan menos del 5 % de las células de la médula ósea, pero no deben estar presentes en la sangre circulante. Las cantidades eficaces de las composiciones y métodos de esta memoria disminuirán el número de mieloblastos en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o más, hasta un 75-90 %, 96 % o mayor disminución. Las cantidades eficaces pueden disminuir los mieloblastos hasta por debajo de 5 %.

20 La eficacia de las composiciones y métodos de esta memoria en el tratamiento de neoplasias hematológicas malignas/trastornos de la médula ósea se puede evaluar además examinando los mieloblastos en cuanto a la presencia de bastones de Auer. Las cantidades eficaces de las composiciones descritas en esta memoria disminuirán el número de bastones de Auer visibles en un 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o más, hasta una disminución del 75-90 %, 96 % o mayor hasta la eliminación completa de los bastones de Auer.

25 La eficacia de las composiciones y métodos proporcionados en esta memoria, se puede demostrar también por una disminución en los síntomas de los sujetos que sufren una enfermedad neoplásica incluyendo, pero sin limitarse a, anemia; fatiga crónica; sangrado excesivo o fácil, tal como el sangrado de la nariz, las encías y debajo de la piel; hematomas fáciles, sobre todo hematomas sin causa aparente; dificultad para respirar; petequias; fiebre recurrente; inflamación de las encías; cicatrización lenta de cortes; molestias en los huesos y las articulaciones; infecciones recurrentes; pérdida de peso; prurito; sudores nocturnos; hinchazón de los ganglios linfáticos; fiebre; dolor y malestar abdominal; alteraciones de la visión; tos; pérdida de apetito; dolor en el pecho; dificultad para tragar; hinchazón de la cara, cuello y extremidades superiores; una necesidad de orinar con frecuencia, especialmente por la noche; dificultad para empezar a orinar o para retener la orina; flujo de orina débil o interrumpido; dolor o ardor al orinar; dificultad para tener una erección; eyaculación dolorosa; sangre en la orina o en el semen; dolor frecuente o rigidez en la zona lumbar, las caderas o parte alta del muslo; y debilidad.

35 Para cada una de las afecciones indicadas descritas en esta memoria, los sujetos de ensayo presentarán una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 50 % o mayor, hasta una reducción del 75-90 %, o 96 % o mayor, en uno o más de los síntomas causados por, o asociados con, la enfermedad citopática, o enfermedades o afecciones relacionadas en el sujeto, en comparación con los sujetos control tratados con placebo o con otros sujetos control apropiados.

40 Dentro de aspectos adicionales, se proporcionan formulaciones y métodos de administración coordinados para el tratamiento de combinación de una enfermedad citopática (tratamiento del SIDA, prevención del VIH, tratamiento del VIH, activación del reservorio de VIH, aumento de la citocina Th1, inducción de la fosforilación ERK, inducción de la apoptosis, tratamiento quimioterapéutico, anti-tumoral, tratamiento del cáncer, inducción de la remisión, mantenimiento de la remisión) que emplean una cantidad eficaz de un compuesto éster de forbol de la fórmula II y uno o más agentes secundarios o adyuvantes que se formulan en combinación o se administran coordinadamente con el compuesto de éster de forbol de la fórmula II para dar una composición combinada, multi-activa, para tratar una enfermedad citopática, o un método de tratamiento coordinado.

50 Los ejemplos de las formulaciones de combinación y los métodos de tratamiento coordinados en este contexto emplean el éster de forbol de la fórmula II en combinación con el uno o más agentes secundarios anti-SIDA, o con uno o más agentes terapéuticos adyuvantes que son útiles para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad objetivo (o asociada), afección y/o síntomas, en la formulación de combinación seleccionada o en el régimen de tratamiento coordinado. Para la mayor parte de las formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados de la invención, un compuesto de éster de forbol de la fórmula II o compuesto relacionado o derivado, se formula o se administra coordinadamente, en combinación con uno o más agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes, para dar una formulación combinada o método de tratamiento coordinado que es combinatoriamente eficaz o coordinadamente útil para tratar el VIH/SIDA. Los ejemplos de formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados en este contexto, emplean un compuesto de éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes seleccionados, por ejemplo, de los inhibidores de la proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, tipranavir y amprenavir; nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo pero sin limitarse a, zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, zalcitabina, emtricitabina, tenofovir disoproxil fumarato, AVX754 y abacavir; no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo, pero sin limitarse a,

nevaripina, delavirdina, calanolida A, TMC 125 y efavirenz; fármacos de combinación, incluyendo, pero sin limitarse a, efavirenz/emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina/zidovudina, abacavir/lamivudina, abacavir/lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, sulfametoxazol/trimetoprim, y lopinavir/ritonavir; inhibidores de la entrada y de la fusión, incluyendo, pero sin limitarse a, enfuvirtida, AMD070, BMS-488043, fozivudina tidoxil, GSK-873,140, PRO 140, PRO 542, Péptido T, SCH-D, TNX-355 y UK-427,857; tratamientos para las infecciones oportunistas y otras afecciones asociadas con el SIDA y el VIH incluyendo, pero sin limitarse a, aciclovir, adefovir dipivoxil, aldesleucina, anfotericina B, azitromicina, hidroxiapatita de calcio, claritromicina, doxorubicina, dronabinol, entecavir, epoetina alfa, etopósido, fluconazol, ganciclovir, inmunoglobulinas, interferón alfa-2, isoniazida, itraconazol, megestrol, paclitaxel, peginterferón alfa-2, pentamidina, ácido poliláctico 1, ribavirina, rifabutina, rifampicina, somatropina, testosterona, trimetrexato, y valganciclovir; inhibidores de la integrasa, incluyendo, pero sin limitarse a, GS 9137, MK-0518; microbicidas, incluyendo, pero sin limitarse a, BMS-378806, C31G, carbopol 974P, carragenina, sulfato de celulosa, cianovirina-N, sulfato de dextrano, hidroxietilcelulosa, PRO 2000, SPL7013, tenofovir, UC-781, e IL-2.

Ejemplos adicionales de las formulaciones de combinación y los métodos de tratamiento coordinados, pueden emplear, adicionalmente, el éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes anti-tumorales secundarios, o con uno o más agentes terapéuticos adyuvantes que son útiles para el tratamiento o profilaxis de la enfermedad objetivo (o asociada), afección y/o síntomas, en la formulación de combinación o régimen de tratamiento coordinado seleccionado. Para la mayor parte de las formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados, un compuesto de éster de forbol de la fórmula II o compuesto relacionado o derivado, se formula o se administra coordinadamente, en combinación con uno o más agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes, para obtener una formulación combinada o método de tratamiento coordinado que es combinatoriamente eficaz o coordinadamente útil para el tratamiento de enfermedades neoplásicas y uno o más síntomas de una enfermedad o afección secundaria en el sujeto. Los ejemplos de formulaciones de combinación y métodos de tratamiento coordinados en este contexto, emplean un compuesto de éster de forbol de la fórmula II en combinación con uno o más agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes seleccionados de, por ejemplo, agentes quimioterapéuticos, agentes antiinflamatorios, doxorubicina, vitamina D3, citarabina, arabinósido de citosina, daunorubicina, ciclofosfamida, gemtuzumab ozogamicina, idarubicina, mercaptopurina, mitoxantrona, tioguanina, aldesleucina, asparaginasa, carboplatino, fosfato de etopósido, fludarabina, metotrexato, etopósido, dexametasona y trisalicilato de colina y magnesio. En adición, se pueden usar terapias adyuvantes o secundarias, tales como, pero sin limitarse a, tratamiento de radiación, terapia hormonal y cirugía.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona formulaciones de combinación para el tratamiento de una enfermedad citopática (tratamiento del SIDA, prevención del VIH, tratamiento del VIH, activación del reservorio de VIH, aumento de la citocina Th1, inducción de la fosforilación ERK, inducción de la apoptosis, tratamiento quimioterapéutico, anti-tumoral, tratamiento del cáncer, inducción de la remisión, mantenimiento de la remisión) que comprenden un éster de forbol y uno o más agentes adyuvantes que tienen actividad para tratar la enfermedad citopática. Dentro de tales formulaciones de combinación, un éster de forbol de la fórmula II y el agente o agentes adyuvantes que tienen actividad para tratar la enfermedad citopática estarán presentes en una formulación combinada en cantidades eficaces para el tratamiento de una enfermedad citopática (tratamiento del SIDA, prevención del VIH, tratamiento del VIH, activación del reservorio de VIH, aumento de la citocina Th1, inducción de la fosforilación ERK, inducción de la apoptosis, tratamiento quimioterapéutico, anti-tumoral, tratamiento del cáncer, inducción de la remisión, mantenimiento de la remisión), solos o en combinación. En ejemplos de realizaciones, un compuesto de éster de forbol de la fórmula II y un agente o agentes que no son ésteres de forbol estará cada uno presente en una cantidad para tratar una enfermedad citopática (es decir, en una dosis singular que provocará ella sola un alivio detectable de los síntomas en el sujeto). Alternativamente, la formulación de combinación puede comprender uno o ambos, el compuesto de éster de forbol de la fórmula II y los agentes de ésteres no de forbol en cantidades de dosificación singulares subterapéuticas, en donde la formulación de combinación que comprende ambos agentes presenta una dosificación combinada de ambos agentes que es colectivamente eficaz para provocar una respuesta de alivio de los síntomas de una enfermedad o afección citopática. Por lo tanto, uno o ambos, el éster de forbol de la fórmula II y los agentes de éster no de forbol, pueden estar presentes en la formulación, o ser administrados en un protocolo de administración coordinada, a una dosis sub-terapéutica, pero colectivamente en la formulación o método provocan una disminución detectable de los síntomas de la enfermedad citopática en el sujeto. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la formulación de combinación puede incluir uno o más compuestos de un protocolo de terapia antirretroviral de gran actividad (protocolos TARGA o HAART) en combinación con un éster de forbol, entre otras combinaciones. Otras formulaciones de combinación pueden incluir, por ejemplo, un éster de forbol y/o compuestos eficaces para tratar las infecciones oportunistas del SIDA, así como compuestos de los protocolos TARGA. En otras realizaciones, la formulación de combinación puede incluir uno o más agentes quimioterapéuticos adicionales.

Para la práctica de los métodos de administración coordinada de la descripción, se puede administrar un compuesto de éster de forbol de la fórmula II, simultáneamente o secuencialmente, en un protocolo de tratamiento coordinado con uno o más de los agentes terapéuticos secundarios o adyuvantes contemplados en la presente memoria. Así, en ciertas realizaciones, un compuesto se administra de forma coordinada con un agente de éster no de forbol, o con cualquier otro agente terapéutico secundario o adyuvante contemplado en esta memoria, utilizando formulaciones separadas o una formulación de combinación como se ha descrito anteriormente (es decir, que comprende tanto un

compuesto de éster de forbol de la fórmula II o compuesto relacionado o derivado, como un agente terapéutico éster no de forbol). Esta administración coordinada se puede realizar de forma simultánea o secuencial en cualquier orden, y puede haber un período de tiempo, durante el cual solamente uno o ambos (o todos) los agentes terapéuticos activos ejercen de forma individual y/o colectiva sus actividades biológicas.

- 5 En una realización, dichos métodos de tratamiento coordinados pueden seguir, por ejemplo, o ser derivados de diversos protocolos de terapia antirretroviral de gran actividad (protocolos TARGA) e incluyen regímenes tales como, pero sin limitarse a, dos análogos de nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa más uno o más inhibidores de la proteasa o un análogo no nucleósido inhibidor de la transcriptasa inversa con un éster de forbol de la fórmula II, entre otras combinaciones. Otros métodos de tratamiento coordinados pueden incluir, por ejemplo, un éster de forbol y/o tratamientos para las infecciones oportunistas, así como compuestos de los protocolos TARGA. Un aspecto distintivo de todos estos métodos de tratamiento coordinados es que el compuesto éster de forbol de la fórmula II ejerce al menos alguna actividad, lo que produce una respuesta clínica favorable, junto con una reducción complementaria de los síntomas de SIDA, o una respuesta clínica distinta proporcionada por el agente terapéutico secundario o adyuvante. A menudo, la administración coordinada del compuesto éster de forbol de la fórmula II con el agente terapéutico secundario o adyuvante producirá mejores resultados terapéuticos o profilácticos en el sujeto más allá de un efecto terapéutico provocado por el compuesto éster de forbol de la fórmula II, o el agente terapéutico secundario o adyuvante administrado solo. Esta calificación contempla tanto los efectos directos como los efectos indirectos.

- 20 Dentro de las realizaciones a modo de ejemplo, un compuesto éster de forbol de la fórmula II se administrará de forma coordinada (de forma simultánea o secuencial, en formulación o formulaciones en combinación o separadas), con uno o más agentes de tratamiento de VIH secundarios, u otros agentes terapéuticos indicados o adyuvantes, por ejemplo, seleccionados de, por ejemplo, inhibidores de la proteasa, incluyendo, pero sin limitarse a, saquinavir, indinavir, ritonavir, nelfinavir, atazanavir, darunavir, fosamprenavir, tipranavir y amprenavir; nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo pero sin limitarse a, zidovudina, didanosina, estavudina, lamivudina, zalcitabina, emtricitabina, tenofovir disoproxil fumarato, AVX754 y abacavir; no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, incluyendo, pero sin limitarse a, nevirapina, delavirdina, calanolida A, TMC125 y efavirenz; fármacos de combinación, incluyendo, pero sin limitarse a, efavirenz/emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, lamivudina/zidovudina, abacavir/lamivudina, abacavir/lamivudina/zidovudina, emtricitabina/tenofovir disoproxil fumarato, sulfametoxazol/trimetoprim, y lopinavir/ritonavir; inhibidores de la entrada y de la fusión, incluyendo, pero sin limitarse a, enfuvirtida, AMD070, BMS-488043, fozivudina tidoxil, GSK-873,140, PRO 140, PRO 542, Péptido T, SCH-D, TNX-355 y UK-427,857; tratamientos para las infecciones oportunistas y otras afecciones asociadas con el SIDA y el VIH incluyendo, pero sin limitarse a, aciclovir, adefovir dipivoxil, aldesleucina, anfotericina B, azitromicina, hidroxiapatita de calcio, claritromicina, doxorubicina, dronabinol, entecavir, epoetina alfa, etopósido, fluconazol, ganciclovir, inmunoglobulinas, el interferón alfa-2, isoniazida, itraconazol, megestrol, paclitaxel, peginterferón alfa-2, pentamidina, ácido poliláctico 1, ribavirina, rifabutina, rifampicina, somatropina, testosterona, trimetrexato, y valganciclovir; inhibidores de la integrasa, incluyendo, pero sin limitarse a, GS 9137, MK-0518; microbicidas, incluyendo, pero sin limitarse a, BMS-378806, C31G, carbopol 974P, carragenina, sulfato de celulosa, cianovirina-N, sulfato de dextrano, hidroxietilcelulosa, PRO 2000, SPL7013, tenofovir, y UC-781 e IL-2.

- 40 En otra realización, dichos métodos de tratamiento coordinados pueden seguir, por ejemplo, o ser derivados de varios protocolos quimioterapéuticos. Otros métodos de tratamiento coordinados pueden incluir, por ejemplo, un éster de forbol y/o tratamientos para los síntomas adicionales de las enfermedades neoplásicas. Un aspecto distintivo de todos estos métodos de tratamiento coordinados es que el compuesto éster de forbol de la fórmula II ejerce al menos alguna actividad, lo que produce una respuesta clínica favorable, junto con una reducción complementaria de los síntomas de la enfermedad neoplásica, o una respuesta clínica distinta proporcionada por el agente terapéutico secundario o adyuvante. A menudo, la administración coordinada del compuesto éster de forbol de la fórmula II con el agente terapéutico secundario o adyuvante producirá mejores resultados terapéuticos o profilácticos en el sujeto más allá del efecto terapéutico provocado por el compuesto éster de forbol de la fórmula II, o el agente terapéutico secundario o adyuvante administrado solo. Esta calificación contempla tanto los efectos directos como los efectos indirectos.

- 50 Dentro de las realizaciones a modo de ejemplo, un compuesto éster de forbol de la fórmula II se administrará de forma coordinada (de forma simultánea o secuencial, en formulación o formulaciones en combinación o separadas), con uno o más agentes secundarios de tratamiento del cáncer, u otros agentes terapéuticos indicados o adyuvantes, por ejemplo, la doxorubicina, vitamina D3, citarabina, arabinósido de citosina, daunorubicina, ciclofosfamida, gemtuzumab ozogamicina, idarubicina, mercaptopurina, mitoxantrona, tioguanina, aldesleucina, asparaginasa, carboplatino, fosfato de etopósido, fludarabina, metotrexato, etopósido, dexametasona, y trisalicilato de colina y magnesio.

- 60 Como se ha señalado antes, en todas las diversas realizaciones contempladas en la presente memoria, los métodos y formulaciones de tratamiento de las enfermedades citopáticas pueden emplear un compuesto éster de forbol de la fórmula II en cualquiera de una variedad de formas, incluyendo una cualquiera o una combinación de las sales, solvatos, isómeros, enantiómeros, polimorfos, solvatos, hidratos, y/o profármacos farmacéuticamente aceptables del compuesto de la invención. En realizaciones ejemplares de la invención, se emplea TPA dentro de las formulaciones terapéuticas y métodos con fines ilustrativos.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción se pueden administrar por cualquier medio que consiga su propósito terapéutico o profiláctico deseado. Las vías de administración adecuadas para las composiciones de la descripción incluyen, pero no se limitan a, las vías, dispositivos y métodos convencionales de administración, incluyendo métodos inyectables, tales como, pero sin limitarse a las vías, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, 5 intraespal, intratecal, intracerebroventricular, intraarterial, subcutánea e intranasal.

Las composiciones de la presente descripción pueden incluir además un vehículo farmacéuticamente aceptable apropiado para el modo particular de administración a emplear. Las formas farmacéuticas de las composiciones incluyen excipientes reconocidos en la técnica de la formulación farmacéutica como adecuados para la preparación de unidades de dosificación como se ha expuesto anteriormente. Dichos excipientes incluyen, sin intención de limitación, aglutinantes, cargas, lubricantes, emulsionantes, agentes de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, conservantes, tampones, agentes humectantes, disgregantes, agentes efervescentes y otros excipientes y aditivos convencionales. 10

Si se desea, las composiciones se pueden administrar en una forma de liberación controlada mediante el uso de un vehículo de liberación lenta, tal como un polímero hidrófilo de liberación lenta. Los ejemplos de agentes de liberación controlada en este contexto incluyen, pero no se limitan a, hidroxipropil metil celulosa, con una viscosidad en el intervalo de aproximadamente 100 cps a aproximadamente 100.000 cps u otras matrices biocompatibles tales como colesterol. 15

Algunas composiciones de éster de forbol de la fórmula II se diseñan para administración parenteral, por ejemplo, para ser administradas por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal, incluyendo soluciones inyectables estériles acuosas y no acuosas que, como muchas otras composiciones contempladas, pueden contener opcionalmente antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y/o solutos que hacen a la formulación isotónica con la sangre del mamífero; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y/o agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en envases de dosis unitarias o en envases multi-dosis. Las composiciones y formulaciones adicionales pueden incluir polímeros para la liberación prolongada después de administración parenteral. Las preparaciones parenterales pueden ser soluciones, dispersiones o emulsiones adecuadas para dicha administración. Los agentes se pueden formular también en polímeros para la liberación prolongada después de administración parenteral. Las formulaciones e ingredientes farmacéuticamente aceptables típicamente serán estériles o fácilmente esterilizables, biológicamente inertes, y de fácil administración. Dichos materiales poliméricos son bien conocidos por los expertos en las técnicas de formulación farmacéutica. Las preparaciones parenterales contienen típicamente agentes tampones y conservantes, y fluidos inyectables que son farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, solución salina fisiológica, soluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares. Las soluciones, emulsiones y suspensiones para inyección extemporánea se pueden preparar a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente. Las formulaciones de dosificación unitaria preferidas son aquellas que contienen una dosis o unidad diaria, subdosis diaria, como se ha descrito antes en esta memoria, o una fracción apropiada de la misma, del ingrediente o 20 25 30 35 ingredientes activos.

En realizaciones más detalladas, las composiciones pueden comprender un compuesto éster de forbol de la fórmula II encapsulado para administración en microcápsulas, micropartículas, o microesferas, preparado, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente; en sistemas coloidales de administración de fármacos (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas); o dentro de macroemulsiones. 40

Como se ha indicado antes, en ciertas realizaciones, los métodos y composiciones pueden emplear sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, sales de adición de ácido o de base de los compuestos ésteres de forbol descritos anteriormente de la fórmula II y/o compuestos relacionados o derivados. Los ejemplos de sales de adición farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos. Las sales de adición de ácido adecuadas se forman a partir de ácidos que forman sales no tóxicas, por ejemplo sales hidrocioruro, hidrobromuro, hidroyoduro, sulfato, hidrogenosulfato, nitrato, fosfato, e hidrogenofosfato. Sales adicionales farmacéuticamente aceptables incluyen, pero no se limitan a, sales de metales tales como sales de sodio, sales de potasio, sales de cesio y similares; sales de metales alcalinotérreos tales como sales de calcio, sales de magnesio y similares; sales de aminas orgánicas tales como sales de trietilamina, sales de piridina, sales de picolina, sales de etanolamina, sales de trietanolamina, sales de dicitlohexilamina, sales de N,N'-dibenciletilendiamina y similares; sales de ácidos orgánicos tales como sales acetato, citrato, lactato, succinato, tartrato, maleato, fumarato, mandelato, acetato, dicloroacetato, trifluoroacetato, oxalato, y formiato; sales sulfonatos tales como metanosulfonato, bencenosulfonato, y p-toluenosulfonato; y sales de aminoácidos tales como sales arginato, asparginato, glutamato, tartrato, y gluconato. Las sales de bases adecuadas se forman a partir de bases que forman sales no tóxicas, por ejemplo, sales de aluminio, calcio, litio, magnesio, potasio, sodio, zinc y dietanolamina. 45 50 55

Otras realizaciones detalladas, los métodos y composiciones descritos en la presente memoria pueden emplear profármacos de ésteres de forbol de la fórmula II. Los profármacos se considera que son cualquier portador unido covalentemente que libera el fármaco original activo *in vivo*. Los ejemplos de profármacos útiles dentro de la 60

descripción incluyen ésteres o amidas con hidroxialquilo o aminoalquilo como sustituyente, y éstos se pueden preparar por reacción de compuestos tales como los descritos anteriormente con anhídridos tales como anhídrido succínico.

5 Se debe entender que la descripción de la presente memoria abarca también métodos y composiciones que comprenden los ésteres de forbol de la fórmula II utilizando *in vivo* los productos metabólicos de dichos compuestos (ya sea generados *in vivo* después de la administración del compuesto precursor, o administrados directamente en la forma del propio producto metabólico). Dichos productos pueden resultar por ejemplo de la oxidación, reducción, hidrólisis, amidación, esterificación y similares del compuesto administrado, principalmente debido a procesos enzimáticos. Por consiguiente, la descripción incluye métodos y composiciones de la descripción que emplean compuestos producidos por un procedimiento que comprende poner en contacto un compuesto éster de forbol de la fórmula II con un sujeto mamífero durante un período de tiempo suficiente para dar un producto metabólico del mismo. Dichos productos se identifican típicamente preparando un compuesto radiomarcado de la descripción, administrándolo parenteralmente en una dosis detectable a un animal tal como una rata, ratón, cobaya, mono, o al hombre, dando tiempo suficiente para que tenga lugar el metabolismo y aislando sus productos de conversión de la orina, sangre u otras muestras biológicas.

15 Se debe entender también que la descripción de la presente memoria abarca composiciones de diagnóstico para diagnosticar el nivel de riesgo, la presencia, gravedad, o indicios de tratamiento, o de otra manera para gestionar las enfermedades citopáticas incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedades neoplásicas incluyendo enfermedades neoplásicas malignas tales como leucemia, y el SIDA o una enfermedad o afección relacionada en un sujeto mamífero, que comprende poner en contacto un compuesto de éster de forbol de la fórmula II marcado (por ejemplo, marcado isotópicamente, marcado con fluorescencia o marcado de otro modo para permitir la detección del compuesto marcado utilizando métodos convencionales) a un sujeto mamífero (por ejemplo, a una célula, tejido, órgano, o individuo) en riesgo o que presenta uno o más síntomas de cáncer y/o de SIDA, y detectar después la presencia, localización, el metabolismo, y/o el estado de unión (por ejemplo, detectar la unión a un copartícipe de unión no marcado implicado en la fisiología/metabolismo del receptor de VIH o en la fisiología/metabolismo del receptor de células malignas) del compuesto marcado utilizando cualquiera de un amplio conjunto de ensayos conocidos y métodos de marcado/detección. En realizaciones de ejemplo, un compuesto de éster de forbol de la fórmula II se marca isotópicamente teniendo uno o más átomos reemplazados por un átomo que tiene una masa atómica o número másico diferente. Los ejemplos de isótopos que se pueden incorporar a los compuestos descritos incluyen isótopos de hidrógeno, carbono, nitrógeno, oxígeno, fósforo, flúor y cloro, tales como  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  y  $^{36}\text{Cl}$ , respectivamente. El compuesto marcado isotópicamente se administra entonces a un individuo u otro sujeto y, posteriormente se detecta como se ha descrito antes, produciendo datos útiles de gestión de diagnóstico y/o terapéuticos, de acuerdo con técnicas convencionales.

### Ejemplos

35 Los experimentos descritos a continuación demuestran usos nuevos y potentes para los ésteres de forbol y compuestos derivados como fármacos para el tratamiento del VIH que pueden disminuir de modo efectivo los síntomas del SIDA. En los ensayos clínicos ejemplares, los individuos que no respondían a los tratamientos tradicionales para el VIH y el SIDA fueron sensibles a los tratamientos con TPA. El tratamiento con TPA se permitió como "compasivo" y la recuperación de algunos pacientes se consideró como salvación de vidas según los médicos. 40 Los experimentos descritos a continuación demuestran adicionalmente la utilidad de los ésteres de forbol y compuestos derivados en el tratamiento de enfermedades neoplásicas. Estos y otros resultados adicionales se amplían y se aclaran además en los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo I

45 Efecto del TPA en los recuentos de glóbulos blancos periféricos (WBC) y en la hemoglobina (Hb) en ratones inyectados con células S180:

Se inyectaron células de sarcoma 180 (S180) a ratones Kwen-Ming. El tercer día, se administró a los ratones TPA intraperitonealmente (i.p.) a 50, 100 o 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  durante 7 días. El segundo día después de completar el tratamiento, se tomaron muestras de sangre de las colas de los ratones tratados para WBC y análisis de Hb. Los recuentos de glóbulos blancos para los grupos tratados (50, 100, o 200  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$  durante 7 días) fueron  $16,1 \pm 7,4$ ,  $18,7 \pm 3,0$  y  $20,7 \pm 3,4 \times 10^9/\text{L}$  respectivamente; el recuento de glóbulos blancos para el grupo control fue  $13,6 \pm 1,8 \times 10^9/\text{L}$ . Las Hb de los grupos tratados fueron  $136 \pm 11$ ,  $149 \pm 12$  y  $149 \pm 10 \text{ g/L}$ , y la Hb del grupo control fue  $134 \pm 15 \text{ g/L}$ . Los resultados indican que la inyección i.p. de TPA podría aumentar los recuentos de leucocitos periféricos en los ratones de una manera dependiente de la dosis, mientras que los niveles de Hb no se vieron afectados en gran medida en los ratones tratados con TPA en comparación con los ratones control.

#### Ejemplo II

Estudio de intervalo de dosis.

Debido a la fuerte irritación local causada por la aplicación de TPA, se administró el TPA a los pacientes por perfusión intravenosa (i.v.). Se inyectó solución de TPA en una jeringa estéril en 200 ml de solución salina estéril y se mezcló bien para perfusión i.v.

Toxicidad y efectos secundarios de diferentes dosis de TPA administradas clínicamente:

5 (1) TPA administrado a 1 mg/paciente/semana:

Se mezcló bien 1 mg de TPA en solución con 200 ml de solución salina estéril para perfusión intravenosa que se completó en 1 h a una velocidad de 16 µg/min. Una hora después de la administración de TPA, los pacientes comenzaron a tener escalofríos que se prolongaron durante aproximadamente 30 minutos, seguidos de fiebre, (la temperatura de los pacientes alcanzó 37,5-39,5 °C, que se prolongó durante 3 a 5 horas, después volvieron a la normalidad) con sudación de ligera a fuerte. Los síntomas anteriores se pudieron aliviar dando a los pacientes glucocorticoides. El TPA a esta dosis causó que una minoría de los pacientes sangraran, varios pacientes sufrieron durante un corto periodo de tiempo dificultad para respirar, y se detectó Hb en la orina. Sin embargo, estos efectos secundarios fueron de corta duración y reversibles. Se encontró que todas las funciones cardíaca, hepática, renal y pulmonar eran normales.

15 (2) TPA administrado a 0,5 mg/paciente x 2/semana: (dos dosis a la semana)

Se mezclaron bien 0,5 mg de TPA en solución con 200 ml de solución salina para perfusión intravenosa que se completó en 1 h a una velocidad de 8 µg/min. Las reacciones después de la administración fueron similares a las de la dosis de 1 mg de TPA, pero en menor medida que la dosis de 1 mg. Los pacientes toleraron la dosis más baja con mayor facilidad. Ocasionalmente se detectó Hb en la orina de los pacientes. No se observó dificultad para respirar. Las funciones cardíaca, hepática, renal y pulmonar fueron todas normales.

(3) TPA administrado a 0,25 mg/paciente x 4/semana:

Se mezclaron bien 0,25 mg de TPA en solución con 200 ml de solución salina para perfusión intravenosa que se completó en 1 h a una velocidad de 4 µg/min. Después de la administración, también se observaron síntomas tales como escalofríos y fiebre, pero en un grado mucho menor que con las dosis más altas. No se detectó Hb en la orina, y ningún paciente tuvo dificultad para respirar. Las funciones cardíaca, hepática, renal y pulmonar fueron todas normales.

Ejemplo III

Primer estudio clínico de pacientes VIH+ tratados con TPA

30 Doce pacientes sintomáticos (cinco hombres y siete mujeres) entre las edades de 35 a 52 años, todos los cuales fueron infectados con el VIH en 1995 a través de una transfusión de sangre y eran refractarios a los tratamientos estándar para VIH, fueron tratados con TPA. Se administró a cada paciente una dosis de TPA ajustada al peso (75 µg/metros cuadrados) en 200 ml de solución salina estéril por vía intravenosa durante una hora. Esta dosis se administró una vez al día durante los tres primeros días de tratamiento. Se administró después a cada paciente esta dosis en días alternos durante los días 4 a 18, seguido por un período de descanso de seis meses antes de un segundo ciclo de tratamiento según el mismo protocolo.

35 Se recogieron muestras de sangre antes de la administración de la primera dosis de TPA y los días 4 y 40 del ciclo de tratamiento. Se midieron los niveles de CD3, CD4 y CD8 en la sangre periférica utilizando anticuerpos monoclonales (Becton Dickson Scientific Co., Franklin Lakes, NJ) y un citómetro de flujo (B.D. Bioscience, San Diego, CA).

40 Como se puede ver en la Tabla 1, no se observó ningún cambio consistente ni correlación en los niveles de CD3, CD4, o CD8.

Tabla 1				
Resultados del recuento de CD <sub>4</sub> , CD <sub>8</sub> , CD <sub>3</sub> en doce pacientes de VIH				
Paciente nº	Tiempo de ensayo	CD <sub>4</sub>	CD <sub>8</sub>	CD <sub>3</sub>
01-1	Antes de TPA	3	196	341
01-2	Cuatro días después de TPA	3	180	299
01-3	Cuarenta y dos días después de TPA	2	111	203
02-1	Antes de TPA	26	614	687
02-2	Cuatro días después de TPA	105	<2000	2316
02-3	Cuarenta y dos días después de TPA	54	700	799
03-1	Antes de TPA	32	524	543
03-2	Cuatro días después de TPA	36	366	427
03-3	Cuarenta y dos días después de TPA	33	374	424
04-1	Antes de TPA	173	735	975
04-2	Cuatro días después de TPA	123	770	941
04-3	Cuarenta y dos días después de TPA	44	493	581
05-1	Antes de TPA	106	1556	1646
05-2	Cuatro días después de TPA	119	1330	1282
05-3	Cuarenta y dos días después de TPA	191	1429	1643
06-1	Antes de TPA	232	865	1221
06-2	Cuatro días después de TPA	179	570	808
06-3	Cuarenta y dos días después de TPA	49	429	537
07-1	Antes de TPA	10	988	1022
07-2	Cuatro días después de TPA	7	570	598
07-3	Cuarenta y dos días después de TPA	1	139	146
08-1	Antes de TPA	524	725	1332
08-2	Cuatro días después de TPA	318	355	739
08-3	Cuarenta y dos días después de TPA	241	527	858
09-1	Antes de TPA	442	1021	1479
09-2	Después de TPA	663	<2000	2920
10-1	Antes de TPA	407	328	778
10-2	Después de TPA	445	591	1077
11-1	Antes de TPA	40	322	373
11-2	Después de TPA	131	724	874
12-1	Antes de TPA	84	256	375

## ES 2 584 327 T3

12-2	Después de TPA	78	268	362
------	----------------	----	-----	-----

Como se puede ver en la Tabla 2, a continuación, los resultados fueron similarmente inconsistentes en el cambio de la carga viral con cinco pacientes que tienen un aumento en el VIH y ningún cambio ni reducción en los otros siete.

Tabla 2				
Recuento de VIH en sangre de los doce pacientes antes, durante y después del tratamiento con TPA				
Paciente nº	Tiempo de ensayo	Resultados (copias/ml)	Valor log	Nota al pie
01-1	3 días antes de TPA	$3,36 \times 10^5$	5,526	
01-2	4 días después de TPA inicial	$1,41 \times 10^4$	6,151	
01-3	15 días después de TPA inicial	$2,02 \times 10^4$	4,306	
01-4	25 días después de TPA inicial	$2,60 \times 10^4$	4,416	
02-1	3 días antes de TPA	$9,97 \times 10^4$	4,999	
02-2	4 días después de TPA inicial	$7,92 \times 10^6$	6,899	
02-3	15 días después de TPA inicial	$6,33 \times 10^6$	6,801	
02-4	25 días después de TPA inicial	$8,72 \times 10^6$	6,941	
03-1	3 días antes de TPA	$3,77 \times 10^5$	5,577	
03-2	4 días después de TPA inicial	$8,13 \times 10^4$	4,910	
03-3	15 días después de TPA inicial	$6,11 \times 10^3$	3,786	
03-4	25 días después de TPA inicial	$8,59 \times 10^5$	5,934	
04-1	3 días antes de TPA	$1,11 \times 10^6$	6,045	
04-2	4 días después de TPA inicial	$1,75 \times 10^7$	7,243	
04-3	15 días después de TPA inicial	$1,11 \times 10^6$	6,614	
04-4	25 días después de TPA inicial	$1,21 \times 10^4$	4,084	
05-1	3 días antes de TPA	$2,49 \times 10^4$	6,637	
05-2	4 días después de TPA inicial	$9,42 \times 10^5$	5,974	
05-3	15 días después de TPA inicial	$2,34 \times 10^7$	7,369	
05-4	25 días después de TPA inicial	$5,56 \times 10^6$	6,745	
06-1	3 días antes de TPA	$4,57 \times 10^5$	5,660	
06-2	4 días después de TPA inicial	$1,44 \times 10^4$	4,160	
06-3	15 días después de TPA inicial	$1,88 \times 10^5$	5,274	
06-4	7 días después de TPA	$2,28 \times 10^5$	6,357	
07-1	3 días antes de TPA	$2,40 \times 10^5$	5,623	
07-2	4 días después de TPA inicial	$1,51 \times 10^5$	5,179	
07-3	15 días durante TPA	$9,74 \times 10^4$	4,988	
07-4	25 días después de TPA inicial	$5,30 \times 10^3$	3,724	
08-1	3 días antes de TPA	$8,02 \times 10^5$	5,904	
08-2	4 días después de TPA inicial	$9,09 \times 10^5$	5,959	
08-3	15 días después de TPA inicial	$5,46 \times 10^6$	6,737	

08-4	25 días después de TPA inicial	$7,77 \times 10^6$	6,890	
09-1	3 días antes de TPA	indetectable		
09-2	25 días después de TPA	indetectable		
10-1	3 días antes de TPA	$1,51 \times 10^4$	4,180	Muestra tomada del segundo ciclo de tratamiento
10-2	25 días después de TPA inicial	$2,79 \times 10^4$	4,446	
11-1	3 días antes de TPA	$1,59 \times 10^5$	5,201	Muestra tomada del segundo ciclo de tratamiento
11-2	25 días después de TPA inicial	$1,25 \times 10^5$	5,096	
12-1	3 días antes de TPA	$1,32 \times 10^4$	4,122	Muestra tomada del segundo ciclo de tratamiento
12-2	25 días después de TPA inicial	$6,27 \times 10^3$	3,798	

5 A pesar de la falta de correlación con los niveles virales y de los niveles de CD3, CD4 y CD9, once de los pacientes mostraron una mejoría significativa después del tratamiento. Ocho pacientes se convirtieron en asintomáticos y cinco de ellos han estado en remisión durante 6 a 12 meses. Tres pacientes adicionales tuvieron una disminución de los síntomas.

#### Ejemplo IV

#### Segundo estudio clínico de pacientes VIH+ tratados con TPA

10 Se administró a nueve de los pacientes del Ejemplo III un segundo tratamiento de TPA. De estos nueve, siete eran asintomáticos al comienzo del segundo ensayo. Se añadió al estudio un décimo paciente (paciente n° 2a) que era sintomático y que no había sido tratado previamente con TPA. Se administró a cada paciente una dosis de TPA ajustada al peso ( $75 \mu\text{g}/\text{metros cuadrados}$ ) en 200 ml de solución salina estéril por vía intravenosa durante una hora. Esta dosis le fue administrada a cada paciente una vez al día durante diez días consecutivos, seguido de un período de descanso de diez días durante tres ciclos y un total de 30 dosis de TPA. Los pacientes 5a, 6a y 8a dejaron de tomar los fármacos anti-SIDA un mes antes de empezar el tratamiento con TPA y empezaron de nuevo un mes después del tercer ciclo. Los pacientes 1-4a, 7a, y 9<sup>a</sup>-10a continuaron tomando los fármacos anti-SIDA a lo largo de todo el tratamiento.

15 Se tomaron muestras de sangre tres días antes de empezar el tratamiento, después de completar el primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA y de nuevo después de la última perfusión de TPA y se midieron las CD3, CD4, CD8, WBC, RBC, HGB y las plaquetas.

20 Como se muestra en la Tabla 3, se produjo un aumento en CD3 en todos los pacientes después de la primera y tercera perfusión con TPA apareciendo el valor más alto después del tercer ciclo, con la excepción de dos pacientes (5a y 10a). Hubo una tendencia de aumento en CD8 y en CD4. Estos resultados sugieren un fortalecimiento de los sistemas inmunitarios con el tratamiento con TPA. Se obtuvieron resultados variados en el recuento de VIH (Tabla 4). Las medidas de VIH en alguno de los pacientes estuvieron por debajo de los límites de detección del método (menos de 200), mientras que aumentó algo en otros. Hubo una variación normal en la medida de WBC, RBC, HGB y plaquetas (Tabla 5).

ES 2 584 327 T3

Tabla 3				
Resultados del recuento de CD <sub>4</sub> , CD <sub>8</sub> , CD <sub>3</sub> de 10 pacientes de VIH				
Paciente nº	Tiempo del ensayo	CD <sub>4</sub>	CD <sub>8</sub>	CD <sub>3</sub>
01-1	Antes de TPA	5	576	1071
01-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	7	907	1323
01-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	19	1129	2037
02a-1	Antes de TPA	26	307	339
02a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	76	335	476
02a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	137	543	625
03a-1	Antes de TPA	295	571	870
03a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	460	729	1200
03a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	1002	980	2033
04a-1	Antes de TPA	152	672	896
04a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	189	584	823
04a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	205	916	1193
05a-1	Antes de TPA	92	1097	1175
05a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	91	1507	1598
05a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	94	1127	1257
06a-1	Antes de TPA	230	378	669
06a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	285	429	758
06a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	276	466	938
07a-1	Antes de TPA	567	1736	2258
07a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	729	>2000	3148
07a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	786	>2000	3347
08a-1	Antes de TPA	361	569	1023
08a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	519	547	1143
08a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	495	733	1295
09a-1	Antes de TPA	101	533	672
09a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	136	574	712
09a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	100	1221	1317
10a-1	Antes de TPA	49	178	240
10a-2	Después del primer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	74	261	333
10a-3	Después del tercer ciclo de 10 días de perfusión de TPA	63	208	308

ES 2 584 327 T3

Tabla 4			
Recuento de VIH en sangre de los diez pacientes antes, durante y después de las tres perfusiones de TPA de diez días			
Paciente nº	Tiempo de ensayo	Resultados (copias/ml)	Valor log
01-1	3 días antes del TPA	4,57 x 10 <sup>6</sup>	6,660
01-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	2,99 x 10 <sup>5</sup>	5,475
01-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	9,41 x 10 <sup>5</sup>	5,973
02a-1	3 días antes del TPA	2,71 x 10 <sup>5</sup>	5,433
02a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	3,09 x 10 <sup>5</sup>	5,490
02a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	9,24 x 10 <sup>5</sup>	5,966
03a-1	3 días antes del TPA	indetectable	-
03a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	Inferior a 500	2,371
03a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	9,55 x 10 <sup>3</sup>	3,980
04a-1	3 días antes del TPA	Inferior a 500	2,312
04a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
04a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	2,38 x 10 <sup>3</sup>	3,376
05a-1	3 días antes del TPA	indetectable	-
05a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
05a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
06a-1	3 días antes del TPA	indetectable	-
06a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
06a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
07a-1	3 días antes del TPA	indetectable	-
07a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
07a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	indetectable	-
08a-1	3 días antes del TPA	1,13 x 10 <sup>4</sup>	4,054
08a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	6,68 x 10 <sup>4</sup>	4,825
08a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	6,20 x 10 <sup>4</sup>	4,792
09a-1	3 días antes del TPA	1,38 x 10 <sup>5</sup>	5,139
09a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	1,65 x 10 <sup>5</sup>	5,217
09a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	2,35 x 10 <sup>5</sup>	5,371
10a-1	3 días antes del TPA	7,20 x 10 <sup>5</sup>	5,857
10a-2	después del primer ciclo de perfusión de TPA	2,82 x 10 <sup>5</sup>	5,450
10a-3	después del tercer ciclo de perfusión de TPA	1,86 x 10 <sup>5</sup>	5,270

Tabla 5					
Hematograma en sangre periférica de los diez pacientes antes y después de los tres tratamientos de diez días con TPA					
Paciente nº	Tiempo de ensayo	WBC (X10 <sup>9</sup> /L)	RBC /X10 <sup>12</sup> /L)	HGB (g/L)	PLt (X10 <sup>9</sup> /L)
01-1	Antes del TPA	2,3	2,55	92	199
01-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	4,4	2,61	99	325
01-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	6,1	2,91	102	182
02a-1	Antes del TPA	5,7	2,44	114	227
02a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	3,7	2,14	88	238
02a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	11,1	2,52	100	124
03a-1	Antes del TPA	7,8	4,04	147	309
03a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	9,8	3,83	1,38	338
03a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	13,6	4,54	140	549
04a-1	Antes del TPA	3,9	3,34	127	232
04a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	3,6	2,92	107	306
04a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	9,2	2,85	105	105
05a-1	Antes del TPA	5,1	3,54	146	243
05a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	5,7	3,46	1,35	315
05a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	10,1	3,61	144	130
06a-1	Antes del TPA	5,0	4,21	171	198
06a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	4,2	3,48	142	256
06a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	6,5	3,66	154	169
07a-1	Antes del TPA	6,6	3,62	102	306
07a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	6,0	3,76	143	258
07a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	6,0	3,92	123	293
08a-1	Antes del TPA	3,1	4,03	125	116

Hematograma en sangre periférica de los diez pacientes antes y después de los tres tratamientos de diez días con TPA					
Paciente n°	Tiempo de ensayo	WBC (X10 <sup>9</sup> /L)	RBC /X10 <sup>12</sup> /L)	HGB (g/L)	PLt (X10 <sup>9</sup> /L)
08a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	4,3	3,86	128	221
08a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	6,8	4,19	128	138
09a-1	Antes del TPA	3,5	1,43	41	114
09a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	2,6	1,99	57	214
09a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	4,0	2,33	67	170
10a-1	Antes del TPA	2,6	2,65	78	297
10a-2	Después de la primera perfusión de 10 días de TPA	2,9	2,58	92	187
10a-3	Después de la tercera perfusión de 10 días de TPA	7,0	4,31	130	138

5 De nueve pacientes previamente tratados con TPA en el primer estudio clínico, solamente uno (n° 9a) presentaba algunos síntomas de SIDA antes del comienzo del segundo estudio clínico. Después del tratamiento con tres ciclos de TPA en el segundo estudio, este paciente y otro (n° 2a), que nunca había sido tratado con TPA, experimentaron la desaparición de los síntomas del SIDA y los dos llegaron a sentirse suficientemente bien como para reanudar sus actividades normales. Los otros ocho pacientes comenzaron el estudio sin síntomas de SIDA y estaban libres de síntomas al final del estudio. Todos los pacientes permanecen en observación. El tratamiento con fármacos anti-SIDA continúa sin interrupción.

10 Como se puede ver en la Tabla 4, se produjo un aumento en todos los pacientes en los niveles de CD3, CD4 y CD8 con los más sorprendentes y constantes aumentos en los niveles de CD3. La carga viral de VIH varió. Fue indetectable en tres pacientes (<200); aumentó ligeramente en otros seis y se redujo en uno.

#### Ejemplo V

##### Tercer estudio clínico de pacientes VIH+ tratados con TPA

15 Seis pacientes, dos varones y cuatro mujeres en edades entre 37 y 52 años (Pacientes n° 13-18), fueron tratados con TPA. Cuatro de estos pacientes recibieron previamente tratamiento con TPA en combinación con fármacos anti-VIH en los dos estudios clínicos previos. Los dos pacientes restantes no habían sido nunca tratados con TPA, pero habían recibido previamente regímenes de fármacos anti-VIH. Todos los tratamientos se pararon tres días antes de la iniciación del tercer estudio clínico y no se reanudaron hasta 60 días después de completar el tratamiento con TPA. La reanudación de los tratamientos estándar para el VIH fue requerida por las autoridades de salud locales.

20 Cada paciente del estudio recibió 150 µg de TPA en 200 ml de solución salina estéril por perfusión intravenosa durante un periodo de 1,5 a 2 horas diarias durante 60 días para una dosis total administrada de 9,0 mg. Después de completar los 60 días de tratamiento con TPA, estos pacientes se mantuvieron en observación durante 60 días más, aunque no recibieron ningún tratamiento adicional.

25 Los niveles de CD3, CD4 y CD8 en la sangre periférica se cuantificaron antes de iniciar el tratamiento, y de nuevo a los 30 y 60 días utilizando citometría de flujo y los anticuerpos apropiados obtenidos de BD Bioscience, San Diego, CA. La carga viral se determinó utilizando métodos convencionales en Kuang Ann men Hospital, Beijing, China. Se midieron también los niveles de RBC, WBC, hemoglobina y plaquetas de los pacientes.

30 Como se puede ver en la Tabla 6, la carga viral en los seis pacientes era o baja o indetectable al comienzo del ensayo y se mantuvo baja durante todo el periodo de ensayo clínico a pesar de la interrupción del tratamiento antirretroviral tradicional. Además, no hubo ningún rebote en los niveles virales 6 a 15 días después de la interrupción del tratamiento antirretroviral como se ha informado anteriormente que ocurre en los pacientes con una

carga viral en plasma por debajo de 50 copias de VIH por ml. (Harrigan et al., AIDS 13, F59-F62 (1999). Los niveles de CD3, CD4 y CD8 fueron variables y no concluyentes.

Tabla 6 - Estudio 3					
Resultados de CD <sub>4</sub> , CD <sub>8</sub> , CD <sub>3</sub> y carga de VIH de 6 pacientes					
Paciente nº	*tiempo de ensayo	CD3	CD4	CD8	**VIH (copias/ml)
13	1	3500	1135	>2000	Indetectable
	2	2771	735	1938	0,533
	3	2689	721	1897	0,133
14	1	1415	677	664	0,374
	2	1522	613	796	0,353
	3	902	369	485	0,038
15	1	759	9	542	0,533
	2	1865	8	1408	1,99
	3	2099	11	1507	Indetectable
16	1	1368	128	1166	Indetectable
	2	1477	105	1318	1,28
	3	1305	46	1220	0,012
17	1	428	95	297	0,002
	2	594	112	424	0,152
	3	317	31	246	0,056
18	1	1041	392	457	Indetectable
	2	703	229	343	0,174
	3	579	165	290	Indetectable

\* Tiempo de ensayo

1 Antes de TPA, 2 treinta días después de TPA, 3 sesenta días después de TPA

\*\* Todas las cifras están en millones.

5 Los glóbulos blancos (WBC), glóbulos rojos (RBC), hemoglobina (Rb) y plaquetas (PLT) se midieron antes de comenzar el tratamiento con TPA, 15, 30, 45 y 60 días después de iniciar el tratamiento con TPA y 30 días después de parar el tratamiento con TPA. Como se puede ver en la Tabla 7, la mayor parte de los valores estaban dentro del intervalo normal.

10 Los pacientes que participaron en el tercer estudio clínico no experimentaron ningún rebote de la carga viral como se ve normalmente cuando se interrumpen las terapias antirretrovirales. Ellos, además, no tuvieron recurrencia de los síntomas del SIDA durante el período de observación y tratamiento de 120 días, se sintieron normales y fueron capaces de llevar a cabo sus actividades vitales habituales.

ES 2 584 327 T3

Tabla 7 ---- Estudio 3					
Perfil de la sangre periférica de 6 pacientes					
Paciente nº	*tiempo de ensayo	WBC (X10 <sup>9</sup> /L)	RBC /X10 <sup>12</sup> /L)	HGB (g/L)	PLt (X10 <sup>9</sup> /L)
13	1	9	3,75	139	246
	2	9	3,88	140	240
	3	8,9	4,35	148	275
	4	4,6	3,9	125	304
	5	8,8	4,55	126	221
	6	7,5	4,55	130	272
14	1	4,2	4,16	111	188
	2	4,1	4,03	114	169
	3	5,9	4,48	116	232
	4	3,9	4,44	109	152
	5	4,4	4,31	96	227
	6	6,5	4,4	104	193
15	1	5,9	3,67	110	397
	2	5	3,41	101	219
	3	5,2	3,83	113	247
	4	6,2	4,13	110	262
	5	6,2	4,04	99	239
	6	8,4	3,9	110	278
16	1	6	3,62	144	297
	2	8,1	3,65	142	415
	3	4,3	4,03	145	345
	4	4,6	3,86	124	291
	5	5,1	4,1	123	276
	6	3,8	4,71	144	224
17	1	5,5	3,06	124	242
	2	6,4	2,96	118	151
	3	4	3,2	121	177
	4	3,9	3,49	116	131
	5	7,7	3,34	99	121
	6	4,8	3,42	100	176

Tabla 7 ---- Estudio 3					
Perfil de la sangre periférica de 6 pacientes					
Paciente nº	*tiempo de ensayo	WBC (X10 <sup>9</sup> /L)	RBC /X10 <sup>12</sup> /L)	HGB (g/L)	PLt (X10 <sup>9</sup> /L)
18	1	7,4	3,91	156	240
	2	8,1	3,69	141	208
	3	4,5	4,32	154	228
	4	4,9	4,14	131	149
	5	3,5	4,56	136	222
	6	NA	NA	NA	NA

\* Tiempo de ensayo

1 Antes de TPA. 2 Quince días después de TPA. 3 Treinta días después de TPA. 4 Cuarenta y cinco días después de TPA. 5 Sesenta días después de TPA. 6 Treinta días después de parar el TPA.

Ejemplo VI

Estudios de casos

Resultados del tratamiento de los pacientes de SIDA inicialmente sintomáticos tratados con TPA según los protocolos de los ejemplos III, IV y V. Los pacientes que participaron en estudios múltiples están identificados en algunos casos por más de un número de paciente. Todos los números de identificación de los pacientes corresponden a los números de paciente de las Tablas 1-7.

Paciente nº 1 y 15: H. L. Y., mujer, 35 años, participó en los tres estudios clínicos, fue diagnosticada de SIDA y tenía síntomas claros de esta enfermedad en 2003. En el momento en que comenzó el primer estudio, tuvo fiebre frecuente, diarrea, lesiones orales, falta de apetito, pérdida de peso, pérdida de la visión del ojo izquierdo (formación de sincitios) y tos (tuberculosis). La paciente comenzó a recibir medicamentos antivirales estavudina (D<sub>4</sub>T), lamivudina (3TC), nevirapina (NVP) y zidovudina (AZT) en 2004. A pesar de los fármacos anti-SIDA, ella tenía un recuento de CD4 de 3 y era incapaz de realizar ningún trabajo físico.

Durante el primer estudio siguiendo el protocolo del ejemplo III, anterior, ella experimentó un aumento de la temperatura corporal de 38-39 °C en cuatro ocasiones diferentes, que duró de 2 a 4 horas. Después del tratamiento con TPA, se produjo una mejora gradual de los síntomas. Su apetito mejoró y la diarrea, lesiones orales, y la fatiga desaparecieron, pero su vista siguió deteriorada. La paciente ganó algo de peso e informó que estaba siendo capaz de reanudar el trabajo doméstico. Ella sigue recibiendo terapia antiviral. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejora de los síntomas y los cambios en sus niveles de CD3, CD4, CD8 y el recuento viral.

H. L. Y. participó en el segundo estudio descrito en el ejemplo IV, anterior. En el inicio del segundo estudio, ella no tiene síntomas del SIDA. Durante este tratamiento posterior con TPA no experimentó ningún efecto adverso. Después de los dos ciclos, primero y tercer ciclo de tratamiento con TPA, sus niveles de CD3, CD4, y CD8 aumentaron al igual que su recuento de glóbulos blancos. Su recuento de VIH fue algo más alto, pero ella es capaz de funcionar normalmente y continúa sin tener síntomas de SIDA.

H. L. Y. participó en el tercer estudio descrito en el ejemplo V, anterior. Al inicio del tercer estudio, seguía teniendo problemas con su ojo. Durante el tercer estudio, experimentó una fiebre de 38-38,5 °C durante el tercero y cuarto día de la perfusión de TPA. Los síntomas de SIDA no volvieron ni durante el estudio ni en el período de observación de 60 días. A excepción de su vista, ella permanece libre de síntomas, se siente normal y es capaz de llevar a cabo actividades normales. Ella reinició la terapia antiviral después de completar el periodo de observación de 60 días y sigue estando bajo el cuidado de un médico.

Paciente nº 2: C.X., mujer, 49 años, participó en el primer estudio clínico, fue diagnosticada de SIDA y tenía claros síntomas de esta enfermedad en 2004. Tenía lesiones orales leves, fatiga, candidosis cutánea, fiebre y falta de apetito. Algunos de estos síntomas eran debidos al herpes virus. Ella había sido tratada con AZT, DDI y NVP, pero el tratamiento con fármacos había terminado debido a los efectos secundarios. Ella no recibió ningún fármaco durante los 3 meses previos al tratamiento con TPA. Ella era hospitalizada con frecuencia y no podía trabajar. Su recuento de CD4 antes del tratamiento era de 26.

Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, ella experimentó un aumento de la temperatura corporal de 37,5 a 38 grados centígrados en tres ocasiones diferentes que duró 1-2 horas. Después del tratamiento

con TPA, sus lesiones orales, candidosis cutánea y fiebre desaparecieron. Su apetito mejoró lo suficiente como para que ganara peso y tuviera la energía suficiente para reanudar el trabajo doméstico. Ella permaneció libre de síntomas durante cinco meses y no recibió ningún fármaco anti-SIDA durante este período. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejoría de los síntomas y sus niveles de CD3, CD4, CD8 y el recuento viral.

- 5 Paciente nº 2a M.S., varón, de 48 años, participó solamente en el segundo estudio clínico, tenía fiebre frecuente, diarrea, pérdida de peso, un sistema inmunitario débil, depresión severa y no podía trabajar.

Durante el tratamiento con TPA según los protocolos del ejemplo IV, su temperatura corporal aumentó de 38,5 a 39 grados centígrados en cinco ocasiones durante 2 a 4 horas.

- 10 Después del tercer ciclo de tratamiento con TPA, la fiebre y la diarrea ya no fueron un problema. Sus recuentos de células CD3, CD4 y CD8 tendieron al alza como lo hizo el recuento de glóbulos blancos y el VIH. Su estado físico y mental volvió a la normalidad y es capaz de trabajar.

- 15 Paciente nº 3: Y.P., varón, 51 años, participó solamente en el primer estudio clínico, fue diagnosticado de SIDA y tenía claros síntomas de esta enfermedad en 2004. Sus síntomas principales eran diarrea, fatiga, pérdida de peso, anemia y marcas púrpura en la piel de ambas piernas; y sólo podía hacer un trabajo ligero. Él estaba siendo tratado con AZT, DDI y NVP, pero tuvo una anemia grave en la terminación del tratamiento farmacológico cuatro meses antes de que se le administrara TPA. Su recuento inicial de CD4 fue de 32.

- 20 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo descrito en el ejemplo III, experimentó un aumento de la temperatura corporal de 38 a 39 °C en tres ocasiones que duró 1 a 2 horas. Después del tratamiento con TPA, tuvo una marcada mejoría en sus síntomas y fue capaz de volver al trabajo que implicaba un trabajo pesado y lleva una vida normal. Él estuvo libre de síntomas durante cinco meses después de la terapia con TPA y no fue tratado con fármacos antivirales durante este período. Parece que no hay ninguna correlación entre los niveles de CD3, CD4, y CD8 y la mejoría de los síntomas, pero hubo algún aumento en el recuento viral.

- 25 Paciente nº 4: L.W., varón, 34 años, participó solamente en el primer estudio clínico, dio positivo para VIH y tenía claros síntomas de esta enfermedad en 2004. Sus principales síntomas fueron diarrea, fiebre, pérdida de peso, tos (tuberculosis), dilatación de los ganglios linfáticos del lado derecho del cuello y era incapaz de trabajar. Su respuesta inicial al tratamiento fue mala. El horario de la medicación antiviral de 3TC, DDI y NVP era irregular y se paró durante el tratamiento con TPA. Su recuento inicial de CD4 fue de 173.

- 30 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, experimentó un aumento de la temperatura corporal de 38 a 39 °C en cinco ocasiones que duró 0,5 a 1 horas. Después del tratamiento, el brote ocasional de diarrea fue tratado satisfactoriamente con un fármaco anti-diarrea. Una mejora en el apetito tuvo como consecuencia un aumento de peso y energía que dio como resultado su vuelta a un programa de trabajo regular. El ganglio linfático volvió a su tamaño normal. Él sigue siendo tratado con fármacos antivirales. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejoría de los síntomas, los niveles de CD3, CD4, CD8 y el recuento viral.

- 35 Paciente nº 5 y 3a: H.S., mujer, 37 años, participó en los dos primeros estudios clínicos, dio positivo para el VIH y tenía claros síntomas de la enfermedad en 2004. En el momento en que comenzó el primer estudio, sus principales síntomas eran candidosis cutánea, pérdida de cabello, infección en la boca, pérdida de peso y fatiga. Ella estaba siendo tratada con D<sub>4</sub>T, DDI, y NVP, pero el tratamiento se interrumpió debido a la pérdida de la función renal. Ella tenía un recuento inicial de CD4 de 106, pero podía realizar un trabajo regular.

- 40 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, experimentó un aumento en la temperatura corporal de 37,5 a 38 °C en cinco ocasiones que duró de 0,5 a 1,0 horas. Después del tratamiento con TPA, no apareció ninguna mejoría de los síntomas. El tratamiento con fármacos anti-virales se reanudó sin retorno de los efectos secundarios anteriores y la intensidad de sus síntomas se redujo después de un mes. Este tratamiento se continúa y ella ha vuelto al trabajo. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejoría de los síntomas y los cambios en los niveles de CD3, CD4, CD8 o el recuento de VIH.

- 45 En el momento del segundo estudio, ella no tenía síntomas de SIDA y no sufrió ningún efecto adverso durante el curso del tratamiento descrito en el ejemplo IV. Después del segundo estudio, sus niveles de CD3, CD4 y CD8 tuvieron una tendencia al alza al igual que su recuento de leucocitos y niveles de plaquetas. Su recuento de VIH fue inicialmente indetectable, pero aumentó después del tercer ciclo de tratamiento. En la actualidad es capaz de trabajar.

- 50 Paciente nº 6, nº 4a, y nº 17: H. S. C., varón, 36 años, participó en los tres estudios clínicos, dio positivo para el VIH y tenía claros síntomas, pero leves, en el año 2004. En el momento en que comenzó el primer estudio, él sufría mareos, dolor de cabeza, falta de apetito y un aumento de la sensibilidad a las infecciones del tracto respiratorio superior, pero fue capaz de trabajar regularmente como obrero. Él estaba siendo tratado con fármacos antivirales AZT, DDI y NVP, pero terminó su uso debido a reacciones adversas. Su nivel de CD4 inicial fue de 232.

- 55 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, el paciente no experimentó ningún aumento de la temperatura corporal o cualquier otro efecto secundario. Después del tratamiento, sus síntomas se mantuvieron sin

cambios y apareció una reducción en las plaquetas no relacionada con el tratamiento con TPA. El paciente continuó siendo tratado con fármacos antivirales y es capaz de trabajar como antes. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejora de los síntomas y los niveles de CD3, CD4, CD8 y la carga viral.

5 En el momento del segundo estudio, el paciente no tenía síntomas y su sistema inmunitario parecía que estaba funcionando normalmente. Durante el segundo estudio según el ejemplo IV, no volvió a sufrir ningún efecto secundario del tratamiento con TPA. Su recuento de CD3, CD4, CD8 aumentó algo como también su recuento de glóbulos blancos. La carga viral fue indetectable inicialmente, pero aumentó después del tercer ciclo de tratamiento. Sin embargo, él no tiene ningún síntoma de SIDA y ha vuelto al trabajo.

10 Al inicio del tercer estudio clínico, el paciente no tenía síntomas. Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo V, experimentó un incidente de irritación local debido a una aguja de fugas el día 32, pero fue tratado satisfactoriamente en tres días. Él permanece asintomático, se siente normal, y es capaz de hacer trabajo pesado. Comenzó la terapia antiviral después de la finalización de los períodos de observación de 60 días y permanece bajo el cuidado de un médico.

15 Paciente nº 7, nº 16 y nº 5a: H. C. L., varón, 49 años, participó en los tres estudios clínicos, dio positivo para el VIH y tenía claros síntomas de la enfermedad en 2004. Sus principales síntomas en el momento del primer estudio eran pérdida de peso, candidosis cutánea, fatiga, falta de apetito y tos (tuberculosis), pero él era capaz de hacer un trabajo ligero. El paciente fue tratado simultáneamente con D<sub>4</sub>T, DDI, NVP y medicación antituberculosa. Su recuento inicial de CD4 era de 10.

20 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo descrito en el ejemplo III, experimentó un aumento de la temperatura corporal a 38 °C en dos ocasiones acompañadas de mareo leve y dolor de cabeza. Después del tratamiento, sus síntomas se mantuvieron sin cambios y la terapia antiviral se reanudó un mes más tarde. Con el tiempo, su nivel de la tos, apetito y energía mejoró y es capaz de trabajar. Continuó tanto la medicación antiviral como la medicación anti-tuberculosis. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejoría de los síntomas y los niveles de CD3, CD4, CD8 o la carga viral.

25 En el momento de la segunda investigación clínica, el paciente no tenía síntomas de SIDA y su sistema inmunitario parecía que funcionaba normalmente. No sufrió efectos adversos del tratamiento con TPA durante la segunda investigación clínica. Después del tratamiento, su nivel de CD4 se mantuvo sin cambio, pero sus niveles de CD3 y CD8 tendieron al alza al igual que su recuento de glóbulos blancos. Su carga viral era indetectable. No ha tenido ningún síntoma de SIDA y ha vuelto a trabajar.

30 Al comienzo de la tercera investigación clínica, el paciente no tenía síntomas del SIDA. Durante el tratamiento según el protocolo descrito en el ejemplo V, sufrió de fiebre en una ocasión. Él permanece asintomático, se siente normal, y es capaz de hacer trabajo pesado. Ha vuelto a los fármacos antivirales después de la finalización del periodo de observación de 60 días y sigue estando bajo el cuidado de un médico.

35 Paciente nº 8, nº 6a, y 18: Y. X. O., mujer, 36 años, participó en los tres estudios clínicos, dio positivo por VIH en 2004. Su principal síntoma en el momento del primer estudio era un aumento de la sensibilidad a la infección del tracto respiratorio superior. Fue tratada con AZT, DDI y NVP. Al inicio del estudio, su nivel de CD4 fue de 524 y la paciente podía realizar un trabajo regular.

40 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, experimentó un aumento de la temperatura corporal a 38,5 °C en una ocasión que duró cuatro horas. Después del tratamiento, la frecuencia de sus resfriados disminuyó y no tenía otros síntomas. Ella continuó siendo tratada con fármacos antivirales y es capaz de trabajar. Parece que no hay ninguna correlación entre la mejoría de los síntomas y sus niveles de CD3, CD4, CD8 o la carga viral.

45 En el momento de la segunda investigación clínica, la paciente no tenía síntomas de SIDA y su sistema inmunitario parecía que funcionaba normalmente. Durante el segundo estudio, según los protocolos del ejemplo IV, su temperatura corporal de nuevo se elevó a 38,5 grados centígrados durante dos horas en una sola ocasión. Después del tratamiento, sus niveles de CD3 y CD8 aumentaron algo, mientras que su CD4 y recuento de glóbulos blancos se mantuvieron sin cambios. Su carga viral es indetectable. Ella parece normal y es capaz de trabajar en tareas físicamente exigentes.

50 En el momento de la tercera investigación clínica la paciente estaba libre de síntomas. Los únicos efectos secundarios del tratamiento según el protocolo del ejemplo V fue fiebre de 38-39 °C en el segundo día del tratamiento, que duró dos horas y la irritación de la piel por una aguja de fugas el día 36 que se aclaró en dos días. Ella permanece libre de síntomas, se siente normal y es capaz de hacer trabajo pesado. Ella ha reiniciado la terapia antiviral después de la finalización del periodo de observación de 60 días y sigue estando bajo el cuidado de un médico.

55 Paciente nº 9 y nº 7a: C. T. F., varón, 44 años, participó en los dos primeros estudios clínicos, dio positivo para el VIH y tenía claros síntomas de la enfermedad en 2004. Sus síntomas al inicio del primer estudio incluyeron diarrea persistente, mareos, dolores de cabeza, falta de apetito, pérdida de peso y fatiga. Él tuvo una respuesta positiva al

tratamiento con AZT, DDI y NVP y el recuento de VIH en la sangre estaba cerca del límite más bajo. A pesar de la respuesta positiva, sus síntomas persistieron y el paciente ingresó en el hospital debido a la diarrea que persistió durante 20 días. Estaba muy deprimido e incapaz de hacer ningún trabajo.

5 Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, experimentó un aumento de la temperatura corporal de 37,5 a 38 °C en seis ocasiones que duró 2 a 4 horas. Una aguja de fugas causó una seria irritación de la piel durante una administración de TPA, pero fue tratada satisfactoriamente. Después de ocho tratamientos con TPA, el mareo leve y el dolor de cabeza persistieron, pero la incidencia de diarrea empezó a disminuir y su apetito mejoró. Una semana más tarde, su diarrea había desaparecido por completo y tenía un apetito normal. Él fue capaz de volver a trabajar y está recibiendo terapia con fármacos antivirales. Parece que había una tendencia al alza de los niveles de CD3, CD4 y CD8 y el recuento de VIH era indetectable.

10 En el momento de la segunda investigación clínica, el paciente no tenía síntomas de SIDA y su sistema inmunitario parecía estar funcionando normalmente. Durante el tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo IV, no sufrió ningún efecto adverso. Después del tratamiento, sus niveles de CD3, CD4 y CD8 aumentaron algo, mientras que su recuento de glóbulos blancos se mantuvo sin cambios. Su recuento de VIH continúa siendo indetectable. Él es capaz de hacer un trabajo fatigoso.

15 Paciente nº 10 y nº 8a: W. F. W., mujer, 47 años, participó en los dos primeros estudios, dio positivo para el VIH y tenía claros síntomas de la enfermedad en 2003. Sus síntomas al inicio del primer estudio incluyeron baja temperatura corporal, diarrea, bajo recuento de plaquetas, tos con sangre, deposiciones sanguinolentas, mareos, dolor de cabeza, falta de apetito, pérdida de peso, fatiga con candidosis cutánea leve y depresión profunda. Ella fue hospitalizada en una ocasión durante dos meses debido a las deposiciones sanguinolentas. Estaba muy deprimida y no podía trabajar. Ella no respondió positivamente al tratamiento con AZT, DDI y NVP y sus síntomas no estaban bajo control.

20 Durante su primer tratamiento con TPA según el protocolo del ejemplo III, experimentó un aumento en la temperatura corporal a 38,5 °C en una ocasión que duró 4 horas. Después de tratamiento con TPA, sus mareos, dolor de cabeza y diarrea disminuyeron gradualmente. Finalmente, su apetito condujo a un aumento de peso y una mejora en su nivel de energía. Su recuento de plaquetas aumentó de 30.000 a 110.000 por microlitro y la candidosis cutánea y la diarrea fueron eliminadas. Ella fue capaz de trabajar de nuevo y fue tratada con fármacos antivirales. Ella tenía fiebre y diarrea de vez en cuando que fue capaz de controlar con fármacos.

25 Seis meses más tarde ella sufría dolores de cabeza y mareos leves y fue sometida a un segundo tratamiento con TPA. Durante su segundo tratamiento con TPA, experimentó un aumento de la temperatura corporal de 37,5 a 38 °C en cinco ocasiones que duró de 2 a 4 horas. Veinte horas después de la 13ª inyección de TPA, su temperatura alcanzó 40,5 grados centígrados y duró varias horas. Se llegó a la conclusión de que el aumento de temperatura no estaba relacionado con la terapia de TPA.

30 Después de su segundo tratamiento con TPA, sus síntomas desaparecieron, su apetito mejoró y la paciente ganó peso, lo que le permitió recuperar su energía, volver a trabajar y llevar una vida normal. Ella estuvo libre de síntomas durante un año y ha tenido algunos resfriados en los primeros seis meses después del segundo tratamiento con TPA. Parece que hay una tendencia ascendente para los niveles de CD3, CD4, y CD8 y los recuentos de VIH.

35 En el momento del segundo ensayo clínico según el protocolo del ejemplo IV, esta paciente continuó sin presentar síntomas de SIDA y su sistema inmunitario pareció que funcionaba normalmente. Ella no sufrió efectos adversos durante el tratamiento. Después del tratamiento, sus recuentos de CD3, CD4 y CD8 aumentaron algo al igual que su WBC. El recuento de VIH aumentó algo. Desde los estudios, ella ha estado sana y comprometida con un trabajo laborioso.

40 Paciente nº 11 y 9a: C. T. L., mujer, 40 años, participó en los dos primeros estudios, fue diagnosticada con SIDA y tenía claros síntomas de esta enfermedad en 2003. En el inicio del primer estudio tenía diarrea persistente, temperatura corporal baja, lesiones orales, candidosis severa de la piel, prurito, manchas moradas en la cara y labios, mareos, dolor de cabeza, falta de apetito y fatiga y depresión. Ella respondió deficientemente al tratamiento de AZT, 3TC y NVP. Sus síntomas no estaban bajo control y no podía trabajar. Su recuento inicial de CD4 fue de 40.

45 Durante su primer tratamiento con TPA, experimentó un aumento de la temperatura corporal de 38 a 39 °C en cuatro ocasiones que duró de 2 a 4 horas. Ella tuvo dificultad para respirar en dos ocasiones que duró de 20 a 30 minutos cada una.

50 Después de la sexta dosis de TPA, su candidosis cutánea empezó a desaparecer y al terminar el tratamiento con TPA, los mareos, dolor de cabeza, fiebre y candidosis cutánea estaban mejorando y gradualmente se desvanecieron. Su apetito, estado físico y depresión mejoraron lo suficiente como para que volviera al trabajo.

55 Esta paciente tuvo un segundo tratamiento con TPA 18 meses más tarde debido a la reaparición de síntomas leves, incluyendo candidosis cutánea suave, diarrea y mareos. Durante este segundo tratamiento, ella experimentó un aumento de la temperatura corporal de 37,5 a 38 °C tres veces que duraron 2 a 4 horas. No hubo otras reacciones adversas. Después del tratamiento con TPA, sus síntomas desaparecieron por completo y su estado físico mejoró lo

suficiente como para permitirle regresar al trabajo. Ella ha estado sin síntomas durante un año y rara vez ha tenido un resfriado. Parece que hay una tendencia al alza en los niveles de CD3, CD4, y CD8, pero su recuento de VIH no cambió.

5 En el momento del segundo estudio clínico según el protocolo del ejemplo IV, esta paciente presentó síntomas del SIDA, incluyendo dolor de cabeza, mareos, falta de apetito y una función inmunitaria débil. Ella no sufrió efectos adversos durante el tratamiento. Después del tratamiento, sus niveles de CD3 y CD8 aumentaron mientras que su recuento de CD4 se mantuvo sin cambio. Su recuento de VIH aumentó ligeramente pero no se observaron otros cambios. Su estado mental y físico ha mejorado considerablemente y está haciendo un trabajo físico fatigoso.

10 Paciente nº 12 y nº 10a: C. C. L., mujer, 39 años, participó en los dos primeros estudios, fue diagnosticada de SIDA y tenía claros síntomas de esta enfermedad en 2003. En el inicio del primer estudio ella tenía temperatura corporal baja persistente, candidosis cutánea, mareos, dolor de cabeza, falta de apetito, lesiones orales, fatiga y depresión profunda. Ella fue tratada con AZT, 3TC y NVP, pero tuvo pobres resultados y era incapaz de trabajar. Su recuento inicial de CD4 era de 84.

15 Esta paciente fue tratada con TPA dos veces durante el período de marzo 2005 a marzo 2006. Durante el primer tratamiento con TPA, ella experimentó un aumento de la temperatura corporal de 38 a 38,5 °C en ocho ocasiones que duró 2 a 4 horas. Ella experimentó dificultad para respirar en una ocasión durante 15 minutos y sufrió una irritación de la piel debido a una aguja de fugas.

Después de la séptima inyección, sus lesiones orales desaparecieron. Una vez finalizadas todas las inyecciones, todos los síntomas desaparecieron y su estado físico mejoró lo suficiente como para que volviera al trabajo.

20 Seis meses más tarde, esta paciente se volvía a tratar con TPA debido a la vuelta de diarrea ligera y mareos. Ella experimentó un aumento en la temperatura corporal de 37,5 a 38 °C en seis ocasiones asociada con la administración de TPA que duró de 2 a 6 horas. A partir de la octava inyección, la dosis se aumentó de aproximadamente 150 µg a 250 µg de TPA. No aparecieron efectos adversos. Tras la finalización de la terapia de TPA, todos sus síntomas desaparecieron. Su estado físico se restableció a su estado normal y ella regresó al trabajo  
25 y ha tenido una vida normal. Ella ha estado libre de síntomas durante un año y rara vez tiene un resfriado. No hubo cambios en los niveles de CD3, CD4 o CD8, pero su recuento de VIH aumentó.

30 En el momento del segundo estudio clínico, esta paciente no tenía síntomas de SIDA a pesar de que tenía un sistema inmunitario debilitado. Ella se trató según el protocolo del ejemplo IV y no sufrió ningún efecto adverso. Después del tratamiento, hubo ligeros aumentos en sus niveles de CD3, CD4 y CD8, y modestos aumentos en WBC, RBC y HGB, mientras que las plaquetas parece que disminuían. El recuento de VIH se redujo un poco. Ella ha estado sana y comprometida con un trabajo físico fatigoso desde su tratamiento.

35 Paciente nº 13: L.F.L., mujer, 53 años, fue diagnosticada de SIDA en 2004, participó solamente en el tercer estudio clínico. Ella se presentó con síntomas leves de falta de apetito y pérdida de peso. Los fármacos antivirales a largo plazo fueron eficaces y causaron que su recuento de virus disminuyera por debajo de niveles detectables y que los recuentos de CD3, CD4 y CD8 aumentaran a un nivel alto. Ella no tenía síntomas antes del tratamiento con TPA y no tenía efectos secundarios debidos a su administración. Ella permanece libre de síntomas, se siente normal, y es capaz de llevar a cabo actividades normales. La paciente ha reiniciado la terapia con fármacos antivirales después de la finalización del periodo de observación de 60 días.

40 Paciente nº 14: K. S. M., mujer, 45 años, fue diagnosticada de SIDA en 2004, participó solamente en el tercer estudio clínico. Sus síntomas fueron leves y consistieron en falta de apetito y resfriados frecuentes. Ella había sido tratada con fármacos antivirales, pero paró debido a toxicidad hepática grave. Ella no tenía síntomas previos al tratamiento con TPA y el único efecto secundario del TPA fue la irritación debida a una aguja de fugas el día 43 que fue tratada fácilmente. No hubo síntomas de SIDA durante todo el período de tratamiento y observación. La paciente se siente normal y es capaz de realizar sus actividades habituales. Después de la terminación del período de  
45 observación de 60 días, dejó el estudio y no reanudó la terapia antiviral.

#### Ejemplo VII

##### Tratamiento de las neoplasias malignas recidivantes/refractarias con TPA

50 Los pacientes con neoplasias malignas hematológicas recidivantes/refractarias histológicamente documentadas/trastornos de la médula ósea se tratan con una combinación de TPA (Xichuan Pharmaceuticals, Nan Yang, Henan, China), dexametasona y trisalicilato de colina y magnesio. Métodos comparables a los que se exponen a continuación para demostrar el uso terapéutico del TPA en el tratamiento de la leucemia mielógena aguda (AML) se aplicarán para demostrar el uso del TPA para tratar otras afecciones neoplásicas y neoplasias malignas. Otras afecciones neoplásicas y trastornos malignos susceptibles de tratamiento utilizando los métodos y composiciones de la invención incluyen diversas formas de cáncer, incluyendo las neoplasias malignas de la sangre  
55 y huesos y loa tumores sólidos de varios tipos. En adición a los protocolos específicos de esta memoria, el tratamiento y/o remisión satisfactorios será determinado para diferentes afecciones neoplásicas y malignas objetivos, utilizando cualquiera de una amplia variedad de métodos bien conocidos de detección y evaluación del

cáncer - por ejemplo mediante la determinación de la reducción de tamaño de los tumores sólidos, estudios histopatológicos para evaluar el crecimiento del tumor, la fase, el potencial metastásico, la presencia/niveles de expresión de marcadores histológicos de cáncer, etc.

5 La AML es una enfermedad agresiva que, generalmente justifica una terapia urgente e intensiva. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico de AML es 64-68 años de edad, y los pacientes mayores de 60 años tratados con quimioterapia estándar se curan de su enfermedad < 20 % del tiempo. Los pacientes que desarrollan AML después de un trastorno hematológico antecedente o quimioterapia leucomogénica/radioterapia anterior, tienen similarmente pobres resultados, al igual que los pacientes cuya enfermedad está asociada con características citogenéticas y clínicas adversas específicas. Por lo tanto, la mayor parte de los pacientes diagnosticados con AML  
10 tienen características de los pacientes y/o relacionadas con la enfermedad que se asocian con un pronóstico muy malo. Para los pacientes con enfermedad recidivante, ninguna terapia estándar de no trasplante ha demostrado capacidad de curación. Para estos pacientes, la AML es a menudo una enfermedad mortal. Se necesitan nuevas estrategias para el tratamiento de la AML.

15 Empleando los métodos y composiciones descritos en la presente memoria, se desarrolló TPA como un agente terapéutico para el tratamiento de pacientes con AML, basándose en el nuevo papel de TPA en la modulación de las rutas de señalización intracelular, en la capacidad del mismo para inducir la diferenciación y/o apoptosis en las líneas celulares, y en los datos clínicos que indican la eficacia de TPA en el tratamiento de trastornos neoplásicos y malignos, incluyendo las neoplasias malignas mieloides.

20 Hasta ahora la evaluación clínica del TPA ha demostrado que el TPA ejerce efectos terapéuticos citotóxicos directos en al menos un subconjunto de casos de AML, medido por los ensayos de viabilidad celular y de apoptosis. En todos los cultivos primarios analizados por análisis de Western, el TPA indujo fuertemente la fosforilación de ERK en 1 hora en cultivo. El efecto citotóxico de TPA sobre las células primarias de AML se asocia con la subsiguiente pérdida de la señal de pro-supervivencia fosfo-ERK después de 24 horas de exposición *ex vivo*. Esta observación concuerda con otros estudios que informaron de la disminución de la supervivencia de AML primaria después de la interrupción farmacológica de la señalización de ERK por los inhibidores de MEK, tales como PD98059, U0126 y PD184352. En los estudios de esta memoria, la pérdida de la señalización de ERK se asoció con la inducción de fosfatasas ERK.  
25

30 En adición a activación de la proteína cinasa C y la ERK, el TPA es un inductor conocido de NF-κB, un factor de transcripción pro-supervivencia a menudo constitutivamente activo en los blastos de AML y las células madre leucémicas. Un trabajo reciente de nuestro laboratorio ha demostrado que las células NF-κB de AML se pueden inhibir *in vivo* con 48 horas de tratamiento con dexametasona + trisalicilato de colina y magnesio (CMT). Además, se ha demostrado que la dexametasona puede inducir la expresión de la fosfatasa MKP-1 ERK y mejorar la citotoxicidad de TPA sobre muestras de AML primarias. En este contexto, se ha elegido en realizaciones a modo de ejemplo a continuación, utilizar dexametasona y CMT como medicaciones adyuvantes a utilizar 24 h pre-tratamiento y 24 h post-tratamiento con TPA. Estas medicaciones son bien toleradas y se prevé que reducen los efectos  
35 adversos inflamatorios de tratamiento y mejoran la citotoxicidad del TPA aumentando la expresión de la fosfatasa ERK e inhibiendo NF-κB. Además, la dexametasona y CMT serán utilizadas como medicaciones adyuvantes porque son anti-inflamatorias, pueden mejorar los efectos adversos, y pueden mejorar la actividad anti-leucémica mediante la inhibición de los efectos anti-apoptóticos de la expresión de NF-κB constitutiva y la inducción de fosfatasas que disminuyen la actividad de la ruta de señalización.  
40

45 Un estudio inicial de Fase 1 de TPA incluyó 35 pacientes [23 con AML recidivante/refractaria, 2 con otras neoplasias mieloides (crisis blástica de CML, mielodisplasia con exceso de blastos), 3 con enfermedad de Hodgkin, 3 con linfoma no Hodgkin y 4 con tumores sólidos]. La mayor parte de los pacientes tenía AML recidivante/refractaria. Los resultados clínicos incluyen un paciente de AML con enfermedad estable durante > 5 meses, que recibió 8 perfusiones de TPA. En un segundo paciente con AML, se vio una disminución pronunciada (5 veces) en el número de blastos circulantes después de la administración de TPA. Esta disminución de los blastos leucémicos persistió durante 4 semanas, y el paciente finalmente murió a causa de una infección fúngica. Finalmente, un paciente con enfermedad de Hodgkin recidivante y refractaria a pesar de la quimioterapia en dosis altas con rescate de células madre autólogas tuvo una remisión parcial de la masa de la pared torácica después de la administración de TPA. Se ha completado el escalado de la dosis de TPA, en la última cohorte 2 de 3 pacientes tratados con una dosis de 0,188 mg/m<sup>2</sup> los días 1-5, 8-12 experimentaron toxicidades no hematológicas de grado III limitantes de la dosis (DLT), estableciendo la dosis máxima tolerada de TPA como agente único en 0,125 mg/m<sup>2</sup>/d los días 1-5 y 8-12.  
50

55 En el caso de la AML y otras neoplasias malignas hematológicas, los pacientes reciben una dosis inicial de TPA de 1 mg/semana x 3 semanas (días 1, 8, 15) administrada con oximetría continua/intermitente a pulsos durante 6 horas. Veinticuatro horas antes de la iniciación de la terapia de TPA, los pacientes reciben 10 mg de dexametasona cada seis horas y 1500 mg de trisalicilato de colina y magnesio (CMT) cada ocho horas continuando hasta 24 horas después de la administración de TPA. Después de la administración de la dosis inicial de TPA, los pacientes tienen un período de dos semanas de descanso, tras el cual pueden ser reevaluados. Aquellos pacientes que tienen una respuesta o estabilización de la enfermedad desde la dosis inicial de TPA son tratados durante seis ciclos, como máximo, de veintiocho días según el protocolo que sigue.  
60

Después del período de descanso de dos semanas, los pacientes son pre-medicados con Tylenol 650 mg y Benadryl 25-50 mg (dependiendo del tamaño y la edad del paciente) treinta minutos antes de la administración de TPA. A continuación, se les administra una perfusión intravenosa de TPA a través de un catéter venoso central diariamente durante 5 días a la semana durante dos semanas consecutivas, seguido por un período de descanso de 2 semanas. Se administra el TPA a una dosis de 1 mg en 200 ml de solución salina normal durante 1 hora. Veinticuatro horas antes de la iniciación de la terapia de TPA, los pacientes reciben 10 mg de dexametasona cada seis horas y 1500 mg de trisalicilato de colina y magnesio continuando cada ocho horas hasta 24 horas después de la administración de la TPA.

Los niveles sanguíneos de TPA se miden antes y después de la perfusión utilizando un bioensayo que mide la actividad de diferenciación extraíble por un disolvente orgánico. Se extrae 1 ml de sangre dos veces con 5 ml de acetato de etilo, redisolviendo el residuo de extracción en 50  $\mu$ L de etanol y la adición de una alícuota de células HL60. Después de 48 horas, se miden las células adherentes.

Los tests se llevan a cabo también en muestras de sangre tomadas antes y después de la perfusión con TPA para determinar los niveles de glóbulos blancos, plaquetas y neutrófilos. Las muestras se analizan, además, en cuanto a la presencia de mieloblastos y bastones de Auer. Estos experimentos continuos aclararán adicionalmente el efecto terapéutico citotóxico y otros efectos que provoca el TPA frente a las células neoplásicas en AML y otras afecciones neoplásicas y malignas.

#### Ejemplo VIII

##### Medida de la modulación de la activación de ERK

Los niveles de fosfato ERK se miden en las células malignas circulantes en pacientes con leucemia y en las células mononucleares de sangre periférica en pacientes con linfoma/tumor sólido. Se toma una muestra de sangre de los pacientes tratados según el protocolo del ejemplo VII, tanto antes como después de la administración de TPA.

En los pacientes de leucemia con un WBC  $\geq$  1000 por  $\mu$ L, se realiza la citometría de flujo en una muestra de sangre utilizando anticuerpos específicos de antígenos de la superficie celular y anticuerpos específicos de fosfo-ERK directamente conjugados con fluoróforos (BD Biosciences, San Jose, CA). Se toman muestras pre-administración de TPA y una hora después de la perfusión de TPA los días 1, 2 y 11 en el tratamiento inicial según el protocolo del ejemplo VII y los días 1 y 11 en los ciclos posteriores. En los pacientes de leucemia con un número blástico leucémico absoluto  $\geq$  2500 por  $\mu$ L, y en otros pacientes no leucémicos, se toman muestras de sangre periférica los días 1, 8 y 15 del ciclo inicial según el protocolo del ejemplo VII antes de la perfusión y 1 y 4 horas después de la perfusión. Se analizan también las muestras utilizando análisis de transferencia de Western para fósforo-ERK, y los niveles totales de ERK1/2 para confirmar los resultados obtenidos de la citometría de flujo y correlacionarlos con las respuestas clínicas.

Los análisis anteriores aclararán adicionalmente el papel de TPA en el tratamiento de las afecciones neoplásicas y malignas, incluyendo el efecto citotóxico de TPA sobre las células malignas, ejemplificado por las células de AML primarias, y la reducción asociada por el TPA de la señal pro-supervivencia de fósforo-ERK.

#### Ejemplo IX

##### Medida de la modulación de NF- $\kappa$ B

En estudios anteriores se ha demostrado que la actividad de NF- $\kappa$ B se puede modular en los pacientes después de la administración de TPA con dexametasona. Además, se ha demostrado que la dexametasona induce la expresión de la fosfatasa MKP-1 ERK y mejora la citotoxicidad del TPA. Los siguientes estudios están diseñados para dilucidar adicionalmente cómo se modula de forma terapéutica la actividad de NF- $\kappa$ B en los pacientes tratados con TPA más dexametasona.

Se mide la unión de NF- $\kappa$ B en muestras de sangre periférica de pacientes en la línea base y antes y después de la perfusión de los pacientes tratados con TPA según el ejemplo VII utilizando ensayos basados en ELISA (BD Bioscience, San José, USA). Los niveles de NF- $\kappa$ B se cuantifican utilizando la intensidad de quimioluminiscencia para detectar la unión en cantidades limitantes de extracto celular utilizando un formato de 96 pocillos. Además, los ensayos de cambio de movilidad electroforética se realizan para medir la unión de NF- $\kappa$ B en muestras de sangre periférica de pacientes de leucemia con un número absoluto de blastocitos leucémicos  $>$  2500 por  $\mu$ l y otros pacientes no leucémicos con recuentos normales de glóbulos blancos.

Los estudios anteriores indican además que PA es un inductor de NF- $\kappa$ B, sin embargo, estos experimentos demuestran que las células NF- $\kappa$ B de AML pueden ser inhibidas con tratamiento con dexametasona y trisalicilato de colina y magnesio.

#### Ejemplo X

##### Determinación de los cambios en la expresión génica leucémica

El TPA induce los niveles de RNA de varias fosfatasas de especificidad dual capaces de terminar la señalización de la ruta ERK pro-supervivencia. Una muestra de sangre tomada pre y post perfusión de los pacientes con AML tratados con TPA según el ejemplo VII se utiliza para estudiar la expresión de RNA de los componentes de señalización de AML, tales como los DUSPs específicos de MAPK utilizando RT-PCR cuantitativa en tiempo real y análisis de microarrays de oligonucleótidos.

5

## Referencias

Abrahm J. L., Gerson S. L., Hoxie J. A., Tannenbaum s. h., Cassileth p. A., Cooper R. A. Differential effects of phorbol esters on normal myeloid precursors and leukemic cells. *Cancer Res.* 46, 3711-3716 (1986).

Altuwaijri S, Lin H K, Chuang K H, Lin W J, Yeh S, Hanchett L A, Rahman M M, Kang H Y, Tsai M Y, Zhang Y, Yang L, y Chang C. Interruption of nuclear factor kappaB signaling by the androgen receptor facilitates 12-O-tetradecanoylphorbolacetate-induced apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer LNCaP cells. *Cancer Res* 2003; 63: 7106-12.

Ando I, Crawford D. H. *et al.* Phorbol ester-induced expression and function of the interleukin 2 receptor in human B lymphocytes. *Eur J Immunol.* 15(4), 341-4 (1985).  
Aye M. T., Dunne J.V. Opposing effects of 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate on human myeloid and lymphoid cell proliferation. *J Cell Physiol.* 114(2), 209-14 (1983).

Bauer I., Al Sarraj J. *et al.* Interleukin-1 beta and tetradecanoylphorbol acetate-induced biosynthesis of tumor necrosis factor alpha in human hepatoma cells involved the transcription factors ATF2 and c-Jun and stress-activated protein kinases. *J Cell Biochem.* 100(1), 242-255 (Epub ahead of print), (2006).

Beaupre D M : y Kurzrock R. RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1071-9.

Becker Y. The changes in the T helper I (TH1) and T helper (TH2) cytokine balance during HIV infection are indicative of an allergic response to viral proteins that may be reversed by TH2 cytokine inhibitors and immune response modifiers -a review and hypothesis. *Virus Genes* 28(1). 5-18 (2004).

Beetz A., Messer G. *et al.* Induction of interleukin 6 by ionizing radiation in a human epithelial cell line: control by corticosteroids. *Int j Radiat Biol* 72(1), 33-43 (1997).

Berenblum I. A re-evaluation of the concept of co-carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 21-30 (1969).

Blockland S. *et al.* Activation of latent HIV-1 expression by the potent anti-tumor promoter 12-dexyphorbol-13-phenylacetate. *Antiviral Res.* 59, 89-98 (2003).

Boutwell R.K. Biochemical mechanism of tumor promotion, in mechanisms of tumor promotion and co-carcinogenesis. Eds. Slaga, T.J., Sivak, A.J y Boutwell, R.K. Raven, New York, 49-58 (1978).

Boutwell R.K. The function and mechanism of promoters of carcinogenesis. *CRC Crit. Rev. Toxicol* 2, 419-443 (1974).

Brose N, Rosenmund C. Move over protein kinase C, you've got company: alternative effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *JCell Sci*;115:4399-411 (2002).

*Cancer Chemother Pharmacol*. Jun;57(6):789-95 (2006).

Cheson B D, Cassileth P A, Head D R, Schiffer C A, Bennett J M, Bloomfield C D, Brunning R, Gale R P, Grever M R, Keating M J, et al. Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 1990; 8: 813-9.

Chun T.W., Siliciano R. F. *et al.* Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 387 (8), 183-188 (1997).

Clerici M., Sheare G. M. A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol.Today* 14(3), 107-110 (1993).

Cui X X, Chang R L, Zheng X, Woodward D, Strair R, y Conney A H. A sensitive bioassay for measuring blood levels of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients: preliminary pharmacokinetic studies. *Oncol Res* 2002; 13: 169-74.

Deegan M. J., Maeda k. Differentiation of chronic lymphocytic leukemia cells after in vitro treatment with Epstein-Barr virus or phorbol ester. *Immunologic and morphologic studies. Am J Hermatol.* 17(4), 335-47 (1984).

Falcioni F., Rautmann A. *et al.* Influence of TPA (12-O-tetradodecanoyl-phorbol-13-acetate) on human B lymphocyte function. *Clin Exp Immunol.* 62(3), 163-2 (1985).

Forbes I. J., Zalewski P. D., Letarte M. Human B-lymphocyte maturation sequence revealed by TPA-induced differentiation of leukaemia cells. *Immunobiology* 163(1), 1-6 (1982).

Fujisawa K., Nasu K. *et al.* Production of interleukin (IL)-6 and IL-8 by a choriocarcinoma cell line, BeWo. *Placenta* 21(4), 354-60 (2000).

Gogusev J., Barbey S., Nezelof C. Regulation of TNF-alpha and IL-1 gene expression during TPA-induced differentiation of "Malignant histiocytosis" DEL cell line t(5:6) (q35:P21). *Anticancer Res.* 16(1), 455-60 (1996)

Gulakowski R. J., McMahon J. B., Bukheit Jr., *et al.* Antireplicative and anti-cytopathic activities of prostratin, a non-tumor-promoting phorbol ester against human immunodeficiency virus (HIV). *Antiviral Research* 33, 87-97 (1997).

- Han Z T, Zhu X X, Yang R Y, Sun J Z, Tian G F, Liu X J, Cao G S, Newmark H L, Conney A H, y Chang R L. Effect of intravenous infusions of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5357-61.
- Han Z. T., Tong Y. K., He L. M., Zhang Y., Sun J. Z., Wang T. Y., Zhang H., Cui Y. L., Newmark H. L., Conney A. H., Chang R. L. 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) -induced increase in depressed white blood cell counts in patients treated with cytotoxic cancer chemotherapeutic drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 5363-5365 (1998).
- Han Z.T., Zhu X. X., Yang R. Y., Sun J. Z., Tian G. F., Liu X. J., Cao G. S., NewMark H. L., Conney A. H., y Chang R. L. Effect off intravenous infusion of 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) in patients with myelocytic leukemia: preliminary studies on therapeutic efficacy and toxicity. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 95, 5357-5361 (1998).
- Harada S. et alet *al.*: Tumor Promoter, TPA, Enhances Replication of HTLV-III/LAV. *Virology* 154, 249-258 (1986).
- Harrigan, P.R., Whaley, M., Montaner, J.S.G. Rate of HIV-1 RNA rebound upon stopping antiretroviral therapy. *AIDS* 13, F59-F62 (1999).
- Hecker E. In *handbuch der allgemeinen pathologie*, ed. Grundmann, E. (Springer-Verlag, Berlin-Heideiberg, Vol. IV 16, 651-676 (1975).
- Hecker E. Structure -activity relationships in diterpene esters irritant and co-carcinogenic to mouse skin, in *mechanisms of tumor promotion and co-carcinogenesis*. Eds. Slaga, T. J., Sevak, A. j. y Boutwell, R.K. Raven, New York, 11-49 (1978).
- Hofmann J. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11, 649-669 (1997).
- Huberman E., Callaham M. F. Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 1293-1297 (1979).
- Hunter T. Signaling 2000 and beyond. *Cell* 100, 113-117 (2000).
- Jordan C T. Unique molecular and cellular features of acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia* 2002; 16: 559-62.

- Kassel O, Sancono A, Kratzschmar J, Kreft B, Stassen M, y Cato A C. Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *Embo J* 2001; 20: 7108-16.
- Kawakami A., Eguchi K. *et al.* Inhibitory effects of interleukin-10 on synovial cells of rheumatoid arthritis. *Immunology* 81(2), 252-9 (1997).
- Kazanietz M.G. Eyes Wide Shut: protein kinase C isoenzymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters. *Mol. Carcinog.* 28, 5-12 (2000).
- Keoffler H. P., Bar-Eli M., Territo M. C. Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cells lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res.* 41, 919-926 (1981).
- Kim S C, Hahn J S, Min Y H, Yoo N C, Ko Y W, y Lee W J. Constitutive activation of extracellular signal-regulated kinase in human acute leukemias: combined role of activation of MEK, hyperexpression of extracellular signal-regulated kinase, and downregulation of a phosphatase, PAC1. *Blood* 1999; 93: 3893-9.
- Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Jinnai I, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Oh H, Motoji T, Omoto E, Saito H, Ohno R, y Ueda R. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood* 1999; 93: 3074-80.
- Kobayashi M., Okada N. *et al.* Intracellular interleukin-1 alpha production in human gingival fibroblasts is differentially regulated by various cytokines. *J Dent Res.* 78(4), 840-9 (1999).
- Koeffler H. P. Phorbol diester-induced macrophage differentiation of leukemic blasts from patients with human myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* 66, 1101-1108 (1980).
- Kulkosky J., Merantz R. J. *et al.* Prostratin: activation of latent HIV-1 expression suggested a potential inductive adjuvant therapy for HAART. *Blood* 98 (10), 3006-3015 (2001).
- Lebien T. W., Bollum F. J. *et al.* Phorbol ester-induced differentiation of a non-T, non-B leukemia cell line: model for human lymphoid progenitor cell development. *J Immunol.* 128(3), 1316-20 (1982).
- Lehrman G., Hogue I. B., Palme S. *et al.* Depletion of Latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 366 (9485), 523-524 (2005).

- Lotem J., Sachs L. Regulation of normal differentiation in mouse and human myeloid leukemia cells by phorbol esters and the mechanism of tumor promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76 5158-5162 (1979).
- MD Iqbal Hossain Chowdhury *et al.* The Phorbol Ester TPA Strongly Inhibits HIV-1 Induced Syncytia Formation but Enhances Virus Production: possible involvement of protein kinase C pathway. *Virology* 176, 126-132, (1990).
- Meinhardt G, Roth J, y Totok G. Protein kinase C activation modulates pro- and anti-apoptotic signaling pathways. *Eur J Cell Biol* 2000; 79: 824-33.
- Meinhardt G., Roth J., Hass R. Activation of protein kinase C relays distinct signaling pathways in the same cell type: differentiation and caspase-mediated apoptosis. *Cell Death Differ.* 7, 795-803 (2000).
- Milella M, Kornblau S M, Estrov Z, Carter B Z, Lapillonne H, Harris D, Konopleva M, Zhao S, Estey E, y Andreeff M. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest* 2001; 108: 851-9.
- Mochly-Rosen D., Kauvar L. M. Modulating protein kinase C signal transduction. *Adv. Pharmacol.* 44, 91-145 (1998).
- Morgan M A, Dolp O, y Reuter C W. Cell-cycle-dependent activation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK-1/2) in myeloid leukemia cell lines and induction of growth inhibition and apoptosis by inhibitors of RAS signaling. *Blood* 2001; 97: 1823-34.
- Nagasawa K., Chechgik B. E. *et al.* Modulation of human T-cell differentiation markers by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Thymus.* 3(4-5), 307-18, (1981).
- Nakao Y., Matsuda S. *et al.* Paradoxical anti-leukemic effects of plant-derived tumor promoters on a human thymic lymphoblast cell line. *Int J Cancer* 30(6), 687-95 (1982).
- Nakao Y., Matsuda S. *et al.* Phorbol ester-induced differentiation of human T-lymphoblastic cell line HPB-ALL. *Cancer Res.* 42(9), 33843-50 (1982).
- Newton A.C. Protein kinase C: structure, function and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28499 (1995).
- Niederman T. M. J., Ratner L. *et al.* Human Immunodeficiency Virus Type I Nef Protein Inhibits NF-KB Induction in Human T Cells. *J. Virology* 66 (10), 6313-6219 (1992).

- Norwell P., Shankey T. V. *et al.* Proliferation, differentiation and cytogenetics of chronic leukemic B lymphocytes cultured with mitomycin-treated normal cells. *Blood* 57(3), 444-51 (1981).
- O'banion M. K., Miller J. C. *et al.* Interleukin-1 beta induces prostaglandin G/H synthase-2 (cyclooxygenase-2) in primary murine astrocyte cultures. *J Neurochem* 66(6), 2532-40 (1996).
- Okamura J., Geffand E. W., Letarte M. Heterogeneity of the response of chronic lymphocytic leukemia cells to phorbol ester. *Blood* 60(5), 1082-8 (1982).
- Palella FJ, Jr, Delaney KM, Moorman AC, *et al.* Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med.* 338:853-860 (1998).
- Palombella V J, Rando O J, Goldberg A L, and Maniatis T. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 1994; 78: 773-85.
- Persaud D., Theodore P., Siliciano R. F. *et al.* A stable latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes in infected children. *J. Clin. Invest.* 115 (7), 995-1003 (2000).
- Platanias L C. Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 2003; 101: 4667-79.
- Polliack A., Leizerowitz R., Korkesh A., Gurfel D., Gamliel H., Galili U. Exposure to TPA in vitro as an aid in the classification of blasts in human myelogenous and lymphoid leukemias. *Am. J. Hematol.* 13, 199-211 (1982).
- Redondo P., Garci-Foncillas J. *et al.* Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expression in human keratinocytes by buffomedil chlorhydrate and pentoxifylline. *Exp. Dermatol.* 6(4), 186-94 (1997).
- Rovera G., Santoli D., Damsky C. Human promyelocytic cells in culture differentiate into macrophage-like cells treated with a phorbol diester. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 7, 2779-2783 (1979).
- Rullas J., Alcamí J. *et al.* Receptors in peripheral blood lymphocytes. *Antivir. Ther.* 9 (4). 545-554 (2004).
- Sahar El-Mekkawy *et al.* Anti-HIV-1 phorbol esters from the seeds of *Croton tiglium*. *Phytochemistry* 53, 457-464 (2000).
- Schaar D, Goodell L, Aisner J, Cui XX, Han ZT, Chang R, Martin J, Grospe S, Dudek L, Riley J, Manago J, Lin Y, Rubin EH, Conney A, Strair RK. A phase I clinical

trial of 12- O-tetradecanoylphorbol-13-acetate for patients with relapsed/refractory malignancies.

Scheinman R I, Cogswell P C, Lofquist A K, y Baldwin A S, Jr. Role of Transcriptional Activation of IkappaBalpha in Mediation of Immunosuppression by Glucocorticoids. *Science* 1995; 270: 283-286.

Shkolnick T., Schlossman S. F., Griffin J. D. Acute undifferentiated leukemia: induction of partial differentiation by phorbol ester. *Leuk. Res.* 9, 11-17 (1985).

Shwarz M. *et al.* High-level IL-10 production by monoclonal antibody-stimulated human T cells. *Immunology* 86, 364-371 (1995).

Siliciano J. D., Siliciano R. F. *et al.* Longterm follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature Med.* 9(6) 727-728 (2003).

Staber P B, Linkesch W, Zauner D, Beham-Schmid C, Guelly C, Schauer S, Sill H, y Hoefler G. Common alterations in gene expression and increased proliferation in recurrent acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2004; 23: 894-904.

Steube K. G., Meyer C., Drexler H. G. Constitutive excretion of hematopoietic cytokines by human carcinoma cell lines and its up-regulation by interleukin-1 and phorbol ester. *Oncol. Rep.* 6(20), 427-32 (1999).

Strair R K, Schaar D, Goodell L, Aisner J, Chin K V, Eid J, Senzon R, Cui X X, Han Z T, Knox B, Rabson A B, Chang R, y Conney A. Administration of a phorbol ester to patients with hematological malignancies: preliminary results from a phase I clinical trial of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 2512-8

Sumitomo M, Shen R, Goldberg J S, Dai J, Navarro D, y Nanus D M. Neutral endopeptidase promotes phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells by inhibiting neuropeptide-induced protein kinase C delta degradation. *Cancer Res* 2000; 60: 6590-6.

Totterman T. H., Nilsson K., Sundstrom C. Phorbol ester-induced differentiation of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Nature* 288(5787), 176-8 (1980)

Towatari M, Iida H, Tanimoto M, Iwata H, Hamaguchi M, y Saito H. Constitutive activation of mitogen-activated protein kinase pathway in acute leukemia cells. *Leukemia* 1997; 11: 479-84.

Van Duuren, B.L. Tumor-promoting agents in two-stage carcinogenesis. *Prog. Exp. Tumor Res.* 11, 31-68 (1969).

Williams S. W. *et al.* Prostratin Antagonize HIV Latency by Activating NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* 279, 42008-42017 (2004).

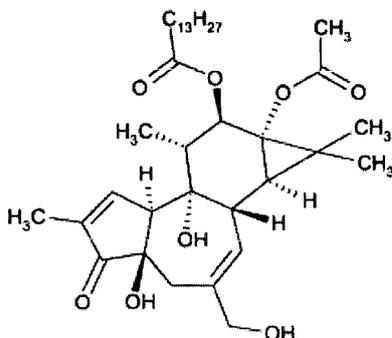
Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, Motoji T, Shinagawa K, Takeshita A, Saito H, Ueda R, Ohno R, y Naoe T. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97: 2434-9.

YIP, Y.K. *et al.* Stimulation of human gamma interferon production by diterpene esters. *Infection and Immunity* 34(1) 131-139 (1981).

Zhao J., Sharma Y., Agarwal R. Significant inhibition by the flavonoid antioxidant silymarin against 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-caused modulation of antioxidant and inflammatory enzymes and cyclooxygenase2 and interleukin-1 alpha expression in SENCAR mouse epidermis: implications in the prevention of stage 1 tumor promotion. *Mol Carcinog.* 26(4), 321-33 (1999).

## REIVINDICACIONES

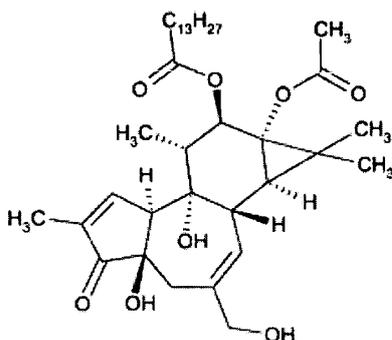
1. El éster de forbol de la fórmula II:



Fórmula II

5 o una de sus sales, isómeros, enantiómeros, solvatos, hidratos, o polimorfos farmacéuticamente aceptables, para uso en la prevención o tratamiento de la infección por VIH en un mamífero.

2. El uso de un éster de forbol de la fórmula II:



Fórmula II

10 o una de sus sales, isómeros, enantiómeros, solvatos, hidratos, o polimorfos farmacéuticamente aceptables, en la fabricación de un medicamento para prevención o tratamiento de la infección por VIH en un mamífero.

3. El uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde el éster de forbol de la fórmula II se administra con al menos un anti-retroviral secundario u otro agente terapéutico adyuvante que es eficaz en una formulación de combinación o régimen de tratamiento coordinado.

15 4. El uso según la reivindicación 3, en donde al menos un anti-retroviral secundario u otro agente terapéutico adyuvante se selecciona del grupo que consiste en: inhibidores de la proteasa, nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, no nucleósidos inhibidores de la transcriptasa inversa, fármacos de combinación, inhibidores de la entrada y de la fusión, aciclovir, adefovir dipivoxil, aldesleucina, anfotericina B, azitromicina, hidroxiapatita de calcio, claritromicina, doxorubicina, dronabinol, entecavir, epoetina alfa, etopósido, fluconazol, ganciclovir, inmunoglobulinas, interferón alfa-2, isoniazida, ribavirina, rifabutina, rifampicina, somatropina, testosterona, trimetrexato, valganciclovir; inhibidores de la integrasa, microbicidas, e IL-2.

5. El uso según las reivindicaciones 1 y 2, en donde dicha cantidad eficaz comprende entre aproximadamente 10 y 1500  $\mu\text{g}$  de dicho éster de forbol o compuesto derivado de la fórmula II, en días alternos.

25 6. Una composición para uso en la prevención o alivio del VIH en un mamífero, comprendiendo la composición una cantidad eficaz de un éster de forbol de la fórmula II, o una de sus sales, isómeros, enantiómeros, solvatos, hidratos, o polimorfos farmacéuticamente aceptables:

