(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 683 726**

(51) Int. Cl.:

A61P 31/18	(2006.01)
C08G 8/30	(2006.01)
A61K 31/22	(2006.01)
A61K 31/047	(2006.01)
A61K 31/232	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.03.2013** **PCT/BR2013/000063**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **06.09.2013** **WO13126980**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.03.2013** **E 13754607 (3)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.05.2018** **EP 2821105**

(54) Título: **Derivados de ingenol en la reactivación de VIH latente**

(30) Prioridad:

02.03.2012 BR 102012004739
23.03.2012 BR 102012006549

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.09.2018

(73) Titular/es:

AMAZONIA FITOMEDICAMENTOS LTDA (100.0%)
Rua Francisco Leandro nº 399B sala 01
CEP 60844-150-Fortaleza-CE, BR

(72) Inventor/es:

PIANOWSKI, LUIZ FRANCISCO y
TANURI, AMILCAR

(74) Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 683 726 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).

DERIVADOS DE INGENOL EN LA REACTIVACIÓN DE VIH LATENTE

DESCRIPCIÓN

La presente invención se refiere generalmente al uso de determinados derivados de ingenol como reactivadores de virus VIH latente en reservorios virales. En otro aspecto, la presente invención se refiere a asociaciones y composiciones que comprenden dichos derivados de ingenol y agentes antirretrovirales sustancialmente activos contra virus en replicación activa.

Antecedentes de la invención

Se sabe que el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es el agente etiológico responsable del SIDA, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, una enfermedad mortal que se caracteriza por la destrucción del sistema inmunitario, incapacitando al organismo para reaccionar apropiadamente a infecciones oportunistas potencialmente mortales.

Se ha usado terapia antirretroviral de gran actividad (conocida como TARGA) para suprimir la replicación del VIH. Consiste en el tratamiento comúnmente conocido como “cóctel” contra el SIDA, con al menos tres compuestos antirretrovirales activos, que contiene inhibidores de transcriptasa inversa, integrasa, proteasa y la entrada.

Sin embargo, en pacientes infectados, el virus de los reservorios de células de linfocitos T CD4+ infectadas de manera latente (es decir, que contienen ADN latente, integrado en el genoma de las células huésped) reanuda rápidamente la replicación viral tras el cese del tratamiento de TARGA.

Por tanto, el VIH permanece como una infección viral crónica cuando no se combate tal infección latente persistente.

Según el fundamento actual en la técnica, la activación de virus latentes contenidos en tales reservorios, en presencia de fármacos antirretrovirales, pretende hacerlos detectables por el sistema inmunitario del organismo y accesibles a los medicamentos activos contra el virus para provocar la destrucción de células que expresan proteínas virales, mediante reacción del sistema inmunitario del huésped y/o de manera que se ocasiona la apoptosis de las células, inhibiendo la replicación de virus que surgen de los reservorios mediante la acción de los fármacos antirretrovirales, agotando por tanto el reservorio de infección persistente por VIH y permitiendo la erradicación total de la infección.

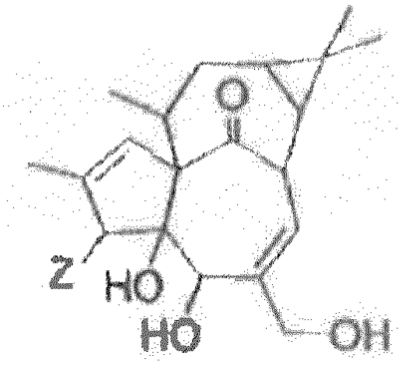
En otras palabras, la inducción selectiva de la infección latente permite que los fármacos antirretrovirales y la respuesta inmunitaria antiviral accedan a y erradiquen la infección por VIH residual, es decir no sólo estabilizando temporalmente el sistema inmunitario sin uso posterior de antirretrovirales, sino suprimiendo definitivamente la infección por VIH en el cuerpo humano.

Descripción de la invención

Se entiende en el texto a continuación que la mención a “agentes antirretrovirales activos contra virus en replicación activa” se refiere a agentes que no actúan sustancialmente, o actúan solo de un modo limitado, sobre reservorios virales de VIH en el cuerpo humano.

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, al uso de uno o más derivados de ingenol de fórmula I a continuación:

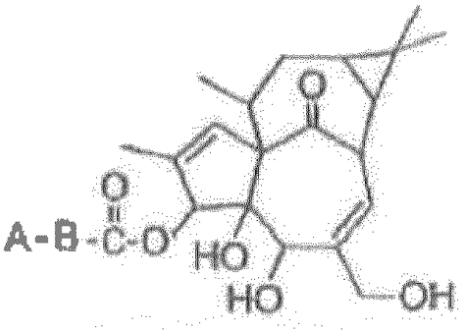
Fórmula I



usados en la preparación de un adyuvante de producto en el tratamiento de infección por VIH o el tratamiento del SIDA, en la que Z es Z2

En relación con la fórmula I, cuando Z = Z2, los derivados de ingenol de la invención son tal como se representa en la fórmula III a continuación:

FÓRMULA III



en la que

A es fenilo, CH_3- o CH_2=CH-, y

B es -CH=CH-, $[-CH_2-]_q$ o $[-CH_2-]_w$,

en donde q es un número entero que oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 2 y 6, y w es un número entero que oscila entre 1 y 10, preferiblemente entre 8 y 10,

siempre que:

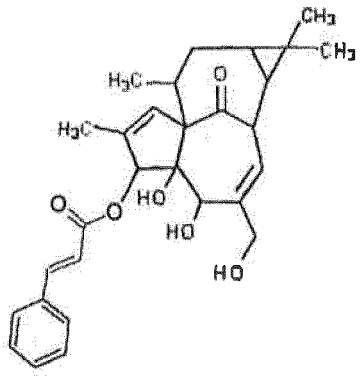
cuando A es fenilo, B es -CH=CH-;

cuando A es CH_3-, B es $[-CH_2-]_q$;

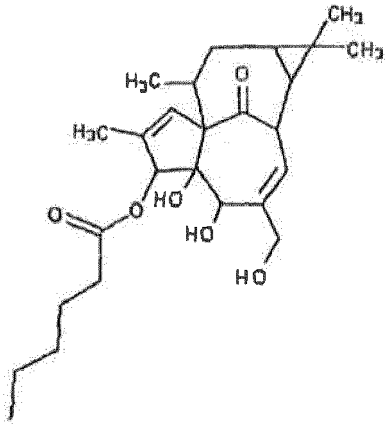
cuando A es CH_2=CH-, B es $[-CH_2-]_w$

Ejemplos particulares de derivados de ingenol de fórmula III adecuados para la invención, de una manera no exclusiva, son las estructuras A, B, C y D a continuación:

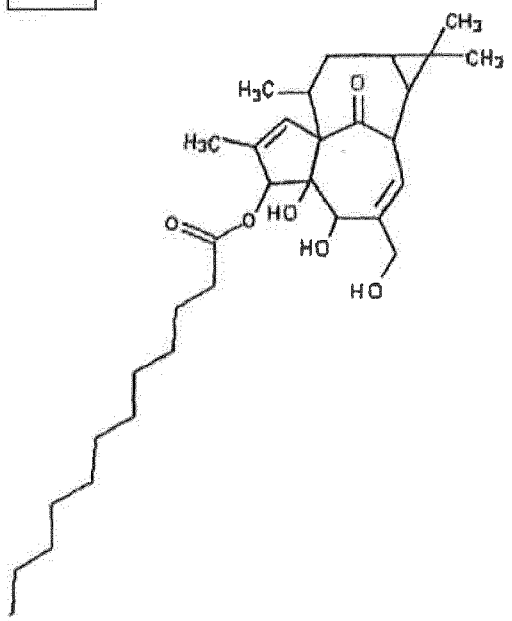
A



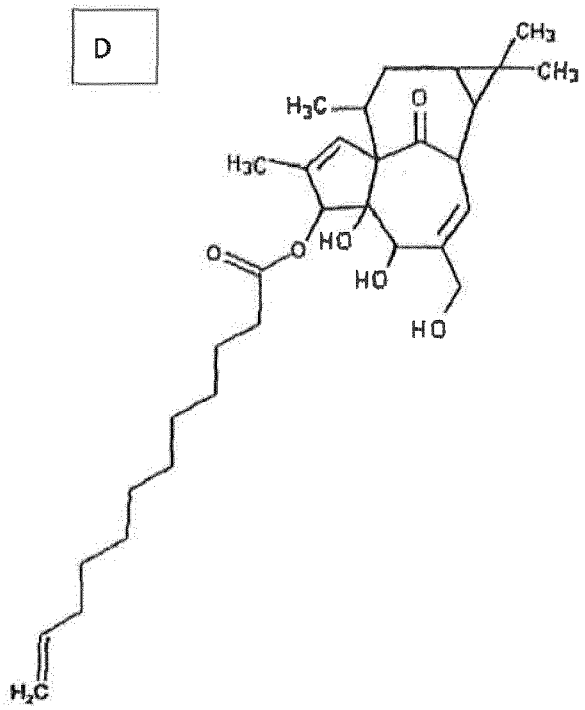
B



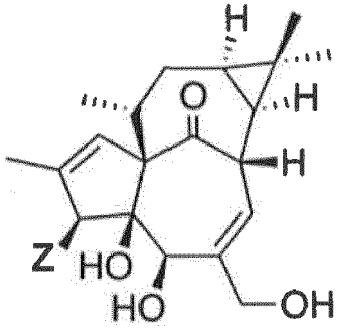
C



D



Particularmente, la fórmula I de derivados de ingenol de la invención presenta la siguiente conformación:



Según la idea central de esta invención, “adyuvante” es un agente o principio activo cuya acción es concomitante o adyuvante a la acción de otro agente o principio activo, en el tratamiento de un estado o enfermedad particular. El efecto individual típico del “adyuvante” (puesto que puede comprender otros) no es el que, solo, trata eficazmente la enfermedad o el trastorno, logrando la cura.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de derivados de ingenol de fórmula I anterior, en la reactivación del virus VIH latente en reservorios virales del cuerpo humano. Es un uso en terapia médica.

En otro aspecto, la invención se refiere a una asociación útil para el tratamiento o la prevención de infección del virus VIH, que comprende uno o más derivados de ingenol de fórmula I, y al menos un agente antirretroviral activo en virus en replicación activa, particularmente seleccionado de entre inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos o no nucleosídicos, inhibidores de proteasa, antagonistas de correceptores, inhibidores de integrasa retroviral, inhibidores de la absorción viral, inhibidores de la transcripción viral específicos, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas y combinaciones de los mismos.

Según el fin de esta invención, “asociación” se entiende como cualquier forma de dosificación apropiada, en combinación, mezcla, formulación, preparación o equivalente, que va a administrarse a una persona, que contiene al menos un derivado de ingenol de fórmula I (componente a) y en unidad de dosificación individual (por ejemplo, comprimido, cápsula, ampolla, bolsa, etc.) o en diferentes unidades de dosificación, en la que los componentes (a) y (b) se proporcionan para administración a un paciente juntos o por separado, o bien simultáneamente o bien secuencialmente.

No hay ninguna limitación particular en la forma de dosificación para la asociación de la invención, incluyendo, además de las ya mencionadas, liposomas y nanopartículas o cualquier otra forma conocida por un experto en la técnica.

Particularmente, la invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen la asociación mencionada anteriormente, y a excipientes farmacéuticamente aceptables. Pueden mencionarse las siguientes publicaciones como fuentes de información sobre tales excipientes: “Remington: The Science and Practice of Pharmacy”, 20ª edición o ediciones posteriores, Lippincott publishing house, Williams y Wilkins; “Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H.C. Ansel *et al*., 7ª ed., Lippincott publishing house, Williams & Wilkins; “Handbook of Pharmaceutical Excipients”(2000) A. H. Kibbe *et al*, 3ª edición, American Pharmaceutical Association Publishing House.

En otro aspecto particular, la composición de la invención puede contener además otro(s) principio(s) activo(s) diferentes de los ingenol(es) de fórmula I y agentes antirretrovirales. Particularmente, la composición de la invención comprende uno o más compuestos que pueden reactivar el virus VIH latente en reservorios virales en el cuerpo humano, distintos de los derivados de ingenol de fórmula I.

En otro aspecto, la invención se refiere a un adjunto útil para reactivar virus VIH latente en reservorios virales en el cuerpo humano, caracterizado porque comprende uno o más derivados de ingenol de fórmula I, y excipientes farmacéuticamente aceptables.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de infecciones por VIH, caracterizado porque comprende la administración de una asociación a un paciente que necesita tal tratamiento, tal como se mencionó anteriormente. Dicho tratamiento comprende administrar los componentes de la asociación al mismo tiempo o secuencialmente.

En aún otro aspecto particular, la invención se refiere a un método para reactivar virus VIH latente en reservorios virales en el cuerpo humano, caracterizado por la administración de uno o más derivados de ingenol de fórmula I a un paciente.

Entre los inhibidores nucleosídicos de transcriptasa inversa adecuados para la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los compuestos AZT (zidovudina), 3TC (lamivudina), d4T (estavudina), abacavir, ddl (didanosina), ddC (zalcitabina), FTC (emtricitabina), PMPA (R)-9-(2-fosfonilmetoxipropil)adenina), tenofovir, adefovir, amdoxovir, elvucitabina, alovudina, racivir, apricitibina, fosfazida y fozivudina tidoxilo.

Entre los inhibidores no nucleosídicos de transcriptasa inversa de la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los compuestos nevirapina, efavirenz, delavirdina, lovirida, etravirina, (+)calanolida, rilpivirina y lersivirina.

Entre los inhibidores de proteasa adecuados para la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los compuestos ritonavir, lopinavir, nelfinavir, saquinavir, indinavir, atazanavir, amprenavir, darunavir, fosamprenavir y tipranavir.

Entre los inhibidores de integrasa adecuados para la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los compuestos raltegravir, elvitegravir y dolutegravir.

Entre los inhibidores de la fusión adecuados para la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los compuestos enfuvirtida y tifuvirtida.

Entre los inhibidores de correceptores adecuados para la invención, pueden mencionarse, de una manera no exclusiva, los inhibidores del correceptor CCR5 vicriviroc y maraviroc.

Los derivados de ingenol de la invención, los antirretrovirales activos activos sobre el virus en replicación o la asociación de la invención que los contiene pueden administrarse a un paciente por cualquier vía adecuada, por ejemplo, mediante administración oral, parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, transdérmica, sublingual, rectal, intramuscular, transbucal, intranasal, liposomal, por inhalación, vaginal, subcutánea, intraadiposa, intraocular, intraarticular o intratecal, así como administración usando un catéter o una endoprótesis, etc.

No hay ninguna restricción específica con respecto a las formas de dosificación usadas con derivados de ingenol de la invención o con la asociación de la invención. Por ejemplo, pueden usarse comprimidos, píldoras, cápsulas, gránulos, grajeas y similares para la administración oral. Para administración oral líquida, pueden usarse disoluciones, dispersiones, suspensiones, emulsiones, aceites, etc.

La forma de dosificación puede ser de liberación inmediata, lenta o controlada.

Breve descripción de las figuras

La figura 1A representa un gráfico de la inducción de latencia en el clon Jlat 8.4 con diferentes concentraciones de un derivado de ingenol de la invención, a continuación en el presente documento KyoII, cuando Z = Z1 en la

estructura de Markush mostrada anteriormente. Se usaron 20 ng de TNF-α como control positivo y los resultados se muestran como % de células inducidas.

La figura 1B representa un gráfico de inducción de latencia en el clon Jlat 6.3 con diferentes concentraciones del derivado KyoII mencionado anteriormente. Se usaron 20 ng de TNF-α como control positivo y los resultados se muestran como % de células inducidas.

La figura 1C es un histograma que muestra la inducción de latencia en el clon Jlat 6.3 con 4 μm del derivado KyoII mencionado anteriormente. En este caso, se usaron 20 ng de TNF-α como control positivo y los resultados se muestran también como % de células inducidas.

La figura 2 es un histograma que muestra la activación de la apoptosis en PBMC humanas (células mononucleares de sangre periférica) cultivadas durante 72 h con las diferentes concentraciones del derivado de ingenol KyoII mencionado anteriormente. La concentración de fármaco se muestra al lado de cada gráfico y el % de células en apoptosis está marcado en el cuadrante izquierdo de cada gráfico.

Las figuras 3 a 6 son gráficos compuestos que muestran la inducción de latencia de VIH en el clon Jlat 6.3 y la citotoxicidad correspondiente, para tanto el derivado KyoII (en donde Z = Z1) como los derivados A, B y C (en donde Z = Z2).

Las figuras 7 y 8 son gráficos de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para células sanguíneas de pacientes tratados exclusivamente con efavirenz (figura 7), y con una mezcla de efavirenz y el derivado de ingenol B de la invención (figura 8).

Las figuras 9 a 12 son lecturas de citometría de flujo, que indican la modulación por disminución del receptor de VIH-1 CD4 sobre la superficie de linfocitos humanos y de mono, para el derivado KyoII (en donde Z = Z1) y para los derivados de ingenol A, B y C (en donde Z = Z2).

Ejemplos

Se facilitan a continuación realizaciones a modo de ejemplo de la invención, en un sentido no limitado a tales ejemplos, puesto que las limitaciones de la invención se exponen sólo en las reivindicaciones adjuntas.

Derivados de ingenol Z1 de la invención

Los ejemplos 1 y 2 se refieren a una mezcla 1:1 de dos derivados de ingenol de fórmula (I), cuando Z = Z1, que son 3-(2,4,6-dodecatrienoil)-ingenol (x = 3 e y = 4) y 3-(2,4,6,8-tetradecatetranoil)-ingenol (x = 4 e y = 4), una mezcla denominada en el presente documento KyoII, en disolución de dimetilsulfóxido a una concentración de 20 mM. Se usa una disolución de este tipo para preparar diluciones en medios de cultivo para lograr la concentración activa.

Ejemplo 1

Se realizó la prueba a continuación con la línea celular denominada J-lat, derivada de linajes de Jurkat, que funciona como modelo *in vitro* de VIH-1 latente. De manera similar a células T CD4+ en reposo infectadas con virus VIH-1, las células J-Lat portan un genoma completo de VIH-1 integrado en las regiones del genoma celular que puede activarse; sin embargo, la transcripción de estas regiones está inhibida temporalmente. De manera adicional, el provirus latente integrado en líneas celulares J-Lat codifica para un gen de GFP (proteína fluorescente verde), proporcionando así un indicador fluorescente de la actividad transcripcional de VIH-1. Se trataron estas células con TNF-α (20 ng/ml) para la reactivación viral como control positivo y se comparó el efecto con la mezcla de derivados de ingenol Z1. Se monitorizó la expresión de genes virales de VIH mediante el gen indicador de GFP durante 48-72 horas tras el tratamiento con TNF-α a través de citometría de flujo.

Se mantuvieron células del clon Jlat 6.3 y 8.4 (proporcionadas por el Dr. B. Matija Peterlin, Universidad de California, San Francisco, CA, EE.UU.) en medio de cultivo RPMI (Rosewell Park Memorial Institute, comercializado por Invitrogen, EE.UU.) que contenía FBS (suero bovino fetal) al 10%. Se indujeron las células del clon Jlat 6.3 y 8.4, en una concentración de 10^6 células/ml, con diferentes concentraciones del derivado KyoII durante 24 horas y se usó TNF-α como control positivo a una concentración de 20 ng/ml.

Tras la etapa de inducción, se lavaron las células con medio RPMI y luego se resuspendieron en medio RPMI que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron durante más de 24 horas para obtener la inducción de virus latente.

Tras la inducción, se leyeron 30.000 células en un citómetro de flujo BD-Excalibur (Beckton Dickinson Company and Co., EE.UU.) para leer las células que expresan la proteína marcadora GFP. No se indujo una muestra celular y permaneció 48 horas en cultivo para servir como control simulado (denominado “simulacro”), marcando por tanto la

inducción espontánea del provirus (fondo).

El histograma de las figuras 1A y 1B muestra que la muestra de KyoII, tras una inducción de 24 horas, podía activar el virus latente presente en los clones de Jlat 6.3 y 8.4 de una manera dependiente de la dosis, e incluso a dosis muy bajas (0,4 pm) podía inducir hasta el 8% de células del clon Jlat 6.3 y 8.4 en cultivo, y a una concentración de 40 μm inducía casi el 30% de las células, superando por tanto la potencia de TNF-α.

La figura 1c muestra histogramas que presentan datos sin procesar obtenidos a partir del software Cellquest (Becton Dickinson and Company, EE.UU.) que muestran la inducción de latencia en un clon de Jlat 6.3, siguiendo el mismo protocolo mencionado anteriormente con KyoII 4 μm. En este caso, se usaron 20 ng de TNF-α como control positivo y los resultados se muestran también como el % de células inducidas.

Ejemplo 2 - Toxicidad

Se verifica en esta prueba que los derivados en la mezcla de KyoII del ejemplo 1, a concentraciones que inducen latencia en células J-lat, no son tóxicos para células PBMC humanas. Por tanto, se cultivaron células PBMC humanas a una concentración de 10^6 células/ml en medio RPMI con suero bovino fetal al 10%, se expusieron a diferentes concentraciones de KyoII y se dejaron en cultivo durante 72 horas. Tras la exposición, se tiñeron las células con yoduro de propidio. Por tanto, se centrifugaron las células a 1000G durante 3 minutos y se lavaron con el mismo volumen con 1 x PBS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}, n.º de cat. 9240, Irvine Scientific Company, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal al 2%. PBS, o "solución salina tamponada con fosfato", es una solución salina tamponada con fosfato. Se repitió este lavado 3 veces y se resuspendieron las células en 1 X PBS que contenía 500 μg de yoduro de propidio y se permitió que se incubaran durante 5 min a 4ºC hasta que se leyeron mediante citometría de flujo. Tras la incubación, se leyeron 30.000 células en un citómetro de flujo BD-Excalibur. Con este protocolo, era posible observar la cantidad de células con ADN degradado o en fases avanzadas de apoptosis (figura 2). Era posible observar que, para concentraciones de hasta 10 μM, el derivado de ingenol no es tóxico para células PBMC y había un 100% de muerte a 100 μM.

Ejemplo 3 - Verificación de la citotoxicidad frente a la reactivación

Este ejemplo tiene como objetivo correlacionar los efectos de citotoxicidad y la reactivación de VIH tanto para la mezcla de KyoII de derivados de ingenol, en la que Z = Z1 de los ejemplos 1 y 2 anteriores, como para 3 derivados de ingenol de fórmula I, en los que Z = Z2, indicados anteriormente como A, B y C. En estos casos, se indujo una concentración de JLat 6.3 10^6 células/ml con diferentes concentraciones de KyoII, A, B, y C durante 24 horas. Tras la etapa de inducción, se lavaron las células con medio RPMI y se resuspendieron en medio RPMI que contenía suero bovino fetal al 10% y se cultivaron durante otras 24 horas para la inducción de virus latente.

Tras la inducción, se leyeron 30.000 células en un citómetro de flujo BD-Excalibur para leer células que expresan la proteína marcadora GFP. No se indujo una muestra celular y permaneció 48 horas en cultivo para servir como control simulado (denominado "simulacro"), marcando por tanto la inducción espontánea del provirus (fondo). Se usó la técnica de tinción con yoduro de propidio para medir la citotoxicidad de los compuestos. Por tanto, se centrifugaron las células a 1000G durante 3 minutos y se lavaron con el mismo volumen con 1 x PBS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}, n.º de cat. 9240, Irvine Scientific Company, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal al 2%. Se repitió este lavado 3 veces y se resuspendieron las células en 1 x PBS que contenía 500 μg de yoduro de propidio y se incubaron durante 5 min a 4ºC hasta que se leyeron mediante citometría de flujo. Tras la incubación, se leyeron 30.000 células en un citómetro de flujo BD-Excalibur (Beckton Dickinson and Co., EE.UU.). Con este protocolo, era posible determinar de manera precisa la cantidad de células con ADN degradado o en fases avanzadas de apoptosis midiendo con precisión la viabilidad celular (figura 2). Se representaron gráficamente los resultados en un gráfico compuesto, que comparaba la capacidad de inducción de los compuestos frente a su actividad citotóxica.

Ejemplo 4 - Prueba con células humanas VIH+ originadas a partir de pacientes en tratamiento antirretroviral.

Se sometió a prueba, en este experimento, la capacidad del derivado de ingenol, de fórmula I, en la que Z = Z2, mencionado como B, de activar células latentes de pacientes que estaban ya en tratamiento antirretroviral durante más de 1 año con carga viral indetectable. Se seleccionó un paciente (identificado como MLV), que había estado ya en tratamiento con zidovudina + lamivudina (AZT + 3TC) y efavirenz durante más de 14 meses, con carga viral indetectable y CD4 > 500 células/mm^3. Se recogieron 20 ml de sangre del paciente en un tubo con EDTA (ácido etilendiaminatetraacético) y se aislaron células PBMC, que se colocaron en medio de cultivo RPMI con suero bovino fetal al 10% y 50 UI/ml de IL2 (interleucina 2), y se hicieron crecer en 2 frascos con 5 ml de células idénticas (106/ml) con diferentes composiciones selectivas. Se añadió efavirenz 10 μM (antiviral) al frasco de control para bloquear la replicación viral que surgiría finalmente de las células cultivadas. En otro frasco de prueba, se incluyeron tanto efavirenz (10 μM) como el derivado B de la invención (1 μM). Se cultivaron ambos frascos a 37ºC durante 72 horas y luego se extrajo el ARN intracelular de las PBMC con un kit RNEasy (QiaGen Company, EE.UU.) y se dosificó la cantidad de ARN genómico de VIH-1 mediante reacción PCR en tiempo real semianidada usando cebadores que se hibridan con la región gag del genoma de VIH-1 tomando el ARN viral no sometido a corte y empalme GAG1 sentido

I, II ((5' TCAGCCCAGAAGTAATACCCATGT 3'; posición en el genoma 1280-1303; TM = 58,3ºC) y SK431 antisentido I (5' TGCTATGTCAGTTCCCCTTGGTTCTCT 3'; posición en el genoma 1474-1500; TM = 61,5ºC) como 10 rondas de PCR y seguido por una reacción en tiempo real semianidada con los cebadores GAG1 sentido I, II (5' TCAGCCCAGAAGTAATACCCATGT 3'; posición en el genoma 1280-1303; TM = 58,3ºC) y antisentido AG2 II (5' CACTGTGTTTAGCATGGTGTTT 3'; posición en el genoma 1341-1362 55,1 TM = 57ºC) y se identificaron con la sonda GAG3 (FAM-ATTATCAGAAGGAGCCACCCCACAAGA-TAMRA; posición en el genoma 1311-1337; TM = 61ºC). La reacción en tiempo real PCR semianidada para detectar ARNv de VIH-1 se llevó a cabo tal como sigue: se diluyó el ARN celular extraído 10 veces en agua y se trató con ADNasa I (Invitrogen Corporation, EE.UU.) durante 15 minutos para eliminar cualquier traza de ADN proviral. Entonces, se inactivó la ADNasa I bajo incubación a 70ºC durante 10 min en presencia de EDTA 1 mM y DTT (ditiotreitol) 50 mM. Se realizó la transcripción inversa de ARN con cebadores de hexámeros al azar y SuperScript III (enzima comercial para la síntesis de ADNc, de Invitrogen, EE.UU.) a 42ºC durante 60 min. Entonces se sometió el ADNc a reacciones PCR. El par de cebadores usado en la 1ª ronda de PCR fue GAG1 y SK431, que amplifica la región interna de gag de VIH-1. Se ejecutó esta primera ronda en una máquina de PCR convencional en un volumen de 25 μl con 5 μl de ADNc, tris(hidroximetil)aminometano 20 mM (pH 8,3), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2 mM, DNTP 0,4 mM (desoxinucleótidos trifosfato) y 1 U de Ampli-Taq (ADN polimerasa, de Applied Biosystems, EE.UU.), y 50 ng de cada cebador. Las condiciones de PCR fueron: 94ºC durante 3 min, seguido por 15 ciclos a 94ºC durante 30 s, 55ºC durante 30 s y 72ºC durante 1 min. El producto de esta primera PCR se sometió a una 2ª PCR en tiempo real semianidada, en una máquina de PCR en tiempo real ABI Prism 7000 (de Applied Biosystems, EE.UU.) usando una mezcla de reacción TaqMan en un volumen total de 25 μl, con 2 μl de la 1ª ronda diluidos 50 veces con 0,2 μm de los cebadores GAG1 y GAG2, y sonda FAM GAG3 0,2 μm. Las condiciones de PCR en tiempo real fueron: 50ºC durante 2 min y 95ºC durante 10 min, seguido por 50 ciclos de 95ºC durante 15 segundos y 60ºC durante 1 min. Los tamaños de los amplicones fueron 221 pb para la 1ª ronda y 83 pb para la PCR (en tiempo real).

Puede observarse en la figura 7 que los cultivos de PBMC del paciente MLV que contenían efavirenz 10 μM no producían ARNv intracelular y, por tanto, no generaban producto detectable en la PCR semianidada en tiempo real.

Por otro lado, en cultivo de PBMC en el que se añadieron efavirenz 10 μm y derivado B 1 μM de la invención (figura 8), se verifica la aparición de ARNv de VIH-1 intracelular, un signo de virus VIH latente en estas células sanguíneas.

Ejemplo 5

Regulación por disminución del receptor CD4 sobre la superficie de macrófagos y linfocitos T CD4+ humanos y macacos cola de cerdo (*Macaca nemestrina*).

Se verifica en esta prueba que los derivados de ingenol de fórmula 1, cuando Z = Z2, a concentraciones que activan VIH de la latencia células Jlat en el ejemplo 3, regulan por disminución la expresión del receptor celular CD4 sobre la superficie macrófagos y linfocitos T CD4+ con VIH humano y VIS de macaco cola de cerdo. Para este experimento, se aislaron células PBMC de seres humanos y monos de la sangre periférica con aislamiento a través de gradiente de densidad en Ficoll-Hipaque (mezcla de polisacáridos neutros hidrófilos de alta densidad que se disuelve fácilmente en disolución acusa. "Ficoll" es una marca comercial de GE Healthcare Bio-Sciences, EE.UU.). Por tanto, se cultivaron células PBMC de ser humano y monos, a una concentración de 10^6 células/ml, en medio RPMI con suero bovino fetal al 10% durante 24 horas y se separaron las células adheridas (monocitos que se diferencian en macrófagos) del sobrenadante celular que contenía los linfocitos totales. Se expusieron esas dos poblaciones de células distintas a diferentes concentraciones de derivados A, B y C de la invención, y se dejaron en cultivo durante 72 horas. Tras la exposición, se tiñeron las células con anticuerpos monoclonales frente a linfocitos (anti-CD3) y monocitos/macrófagos (anti-CD14) específicos simultáneamente con un anticuerpo anti-CD4. Por tanto, se centrifugaron las células a 1000G durante 3 minutos y se lavaron con el mismo volumen de PBS (sin Ca^{2+} ni Mg^{2+}, n.º de cat. 9240, Irvine Scientific, EE.UU.) que contenía suero bovino fetal al 2%. Se repitió este lavado 3 veces y se resuspendieron las células en 1 x PBS que contenía una dilución 1/1000 de anticuerpos relevantes y se dejaron incubar durante 30 min a 4ºC hasta que se leyeron en citometría de flujo. Tras la incubación, se leyeron 30.000 células en un citómetro de flujo BD-Excalibur (de Beckton Dickinson and co., EE.UU.) y se separaron las poblaciones y se estimó la densidad de receptores CD4 a diferente concentraciones del derivado B, suponiendo la densidad celular sin derivado B como el 100%. También se colocaron moléculas que ya se sabe que regulan por disminución CD4 en estos experimentos, para fines de comparación con los derivados A, B y C, tales como prostratina, briostatina y PMA (éster de forbol).

Se indica que los derivados de Z2 de la invención podían regular por disminución la expresión del receptor de VIH-1 CD4 sobre la superficie de linfocitos humanos (figura 11) y de *Macaca nemestrina* (figura 9). De manera similar, estos compuestos también regulaban por disminución CD4 en monocitos/macrófagos humanos (figura 12) y de *Macaca nemestrina* (figura 10). Era destacable la mayor potencia de los derivados de ingenol Z2 en la regulación por disminución de CD4 de células de mono en comparación con moléculas comparativas (prostratina, briostatina y PMA, véanse las figuras 9 y 10).

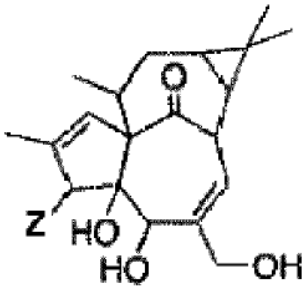
Los derivados de ingenol A, B y C podían regular por disminución el receptor de VIH principal (CD4) en la superficie

de las células seleccionadas como diana por la infección. Por tanto, se ha demostrado que los derivados de ingenol de la invención, además de activar VIH de la latencia, dificultan la continuación de la infección del virus bloqueando su entrada a nuevas células.

El experto en la técnica puede evaluar fácilmente, por medio de las enseñanzas contenidas en el texto y en los ejemplos presentados, las ventajas de la invención, así como proponer modificaciones y alternativas equivalentes a las realizaciones, sin apartarse del alcance de la invención, tal como se define en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Derivados de ingenol de fórmula I o una combinación de los mismos



Fórmula I

para su uso en el tratamiento de infección por virus VIH o el tratamiento del SIDA, en la que Z es Z2

de manera que

A es fenilo, CH_3- o CH_2=CH-,

y (B) es -CH=CH-, $[-CH_2-]_q$ o $[-CH_2-]_w$,

en donde q es un número entero que varía entre 1 y 10, preferiblemente entre 2 y 6, y w es un número entero que varía entre 1 y 10, preferiblemente entre 8 y 10,

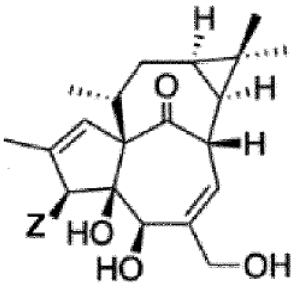
siempre que:

cuando A es fenilo, B es -CH=CH-;

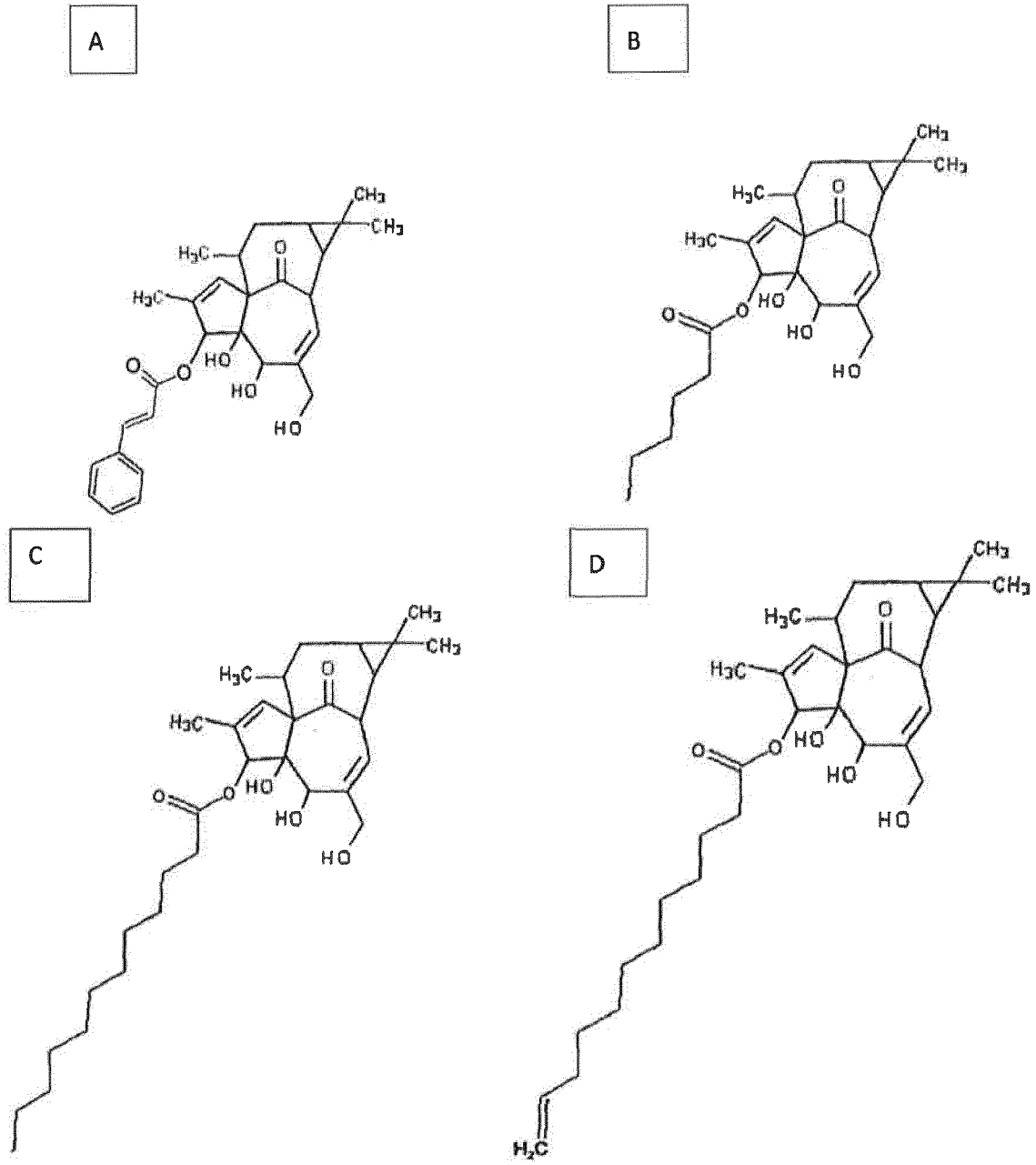
cuando A es CH_3-, B es $[-CH_2-]_q$;

cuando A es CH_2=CH-, B es $[-CH_2-]_w$.

2. Derivados de ingenol para su uso según la reivindicación 1, caracterizados porque dichos derivados de ingenol de fórmula I o combinación de los mismos tienen la estructura



3. Derivados de ingenol para su uso según la reivindicación 1, caracterizados porque dichos derivados son uno o más de entre A, B, C y D:



4. Derivados de ingenol de fórmula I para su uso según la reivindicación 1, caracterizados porque se usan en la reactivación del virus VIH latente en reservorios virales del cuerpo humano.

5. Asociación farmacéutica para su uso en el tratamiento de infección por virus VIH, caracterizada porque comprende derivados de ingenol según la reivindicación 1 o una combinación de los mismos, y al menos un agente antirretroviral activo contra virus en replicación activa.

6. Asociación farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho al menos un agente antirretroviral activo activo contra virus en replicación activa se selecciona de entre inhibidores de transcriptasa inversa nucleosídicos o no nucleosídicos, inhibidores de proteasa, antagonistas de correceptores, inhibidores de integrasa retroviral, inhibidores de la absorción viral, inhibidores de la transcripción viral específicos, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas y combinaciones de los mismos.

7. Asociación farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque dichos derivados de ingenol según la reivindicación 1 o combinación de los mismos y dichos uno o más agentes antirretrovirales están comprendidos en la misma forma de dosificación.

8. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de infección por virus VIH, caracterizada porque contiene una asociación farmacéutica según la reivindicación 5 y excipientes farmacéuticamente aceptables.

9. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, caracterizada porque contiene además otro(s) principio(s) activo(s) diferente(s) de derivados de ingenol según la reivindicación 1, o de agentes antirretrovirales activos contra virus en replicación activa.

10. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, caracterizada porque comprende derivados de ingenol según la reivindicación 1 o una combinación de los mismos útil en la reactivación de virus VIH latentes en reservorios virales en el cuerpo humano.

11. Adyuvante para su uso en el tratamiento de la infección provocada por virus VIH, caracterizado porque comprende derivados de ingenol según la reivindicación 1 o una combinación de los mismos y excipientes farmacéuticamente aceptables.

12. Asociación farmacéutica para su uso según la reivindicación 5, caracterizada porque la administración de componentes de dicha asociación farmacéutica es concomitante o secuencial.

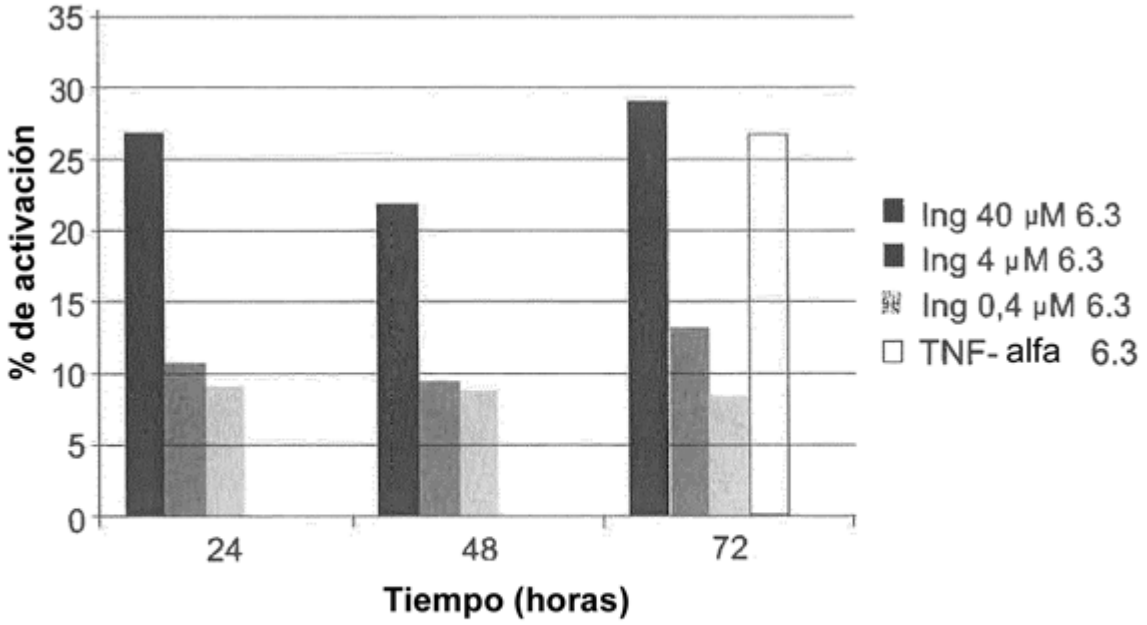

35
30
25
20
15
10
5
0
% de activación
24
48
72
Tiempo (horas)
Ing 40 μM 6.3
Ing 4 μM 6.3
Ing 0,4 μM 6.3
TNF- alfa 6.3

FIG. 1A

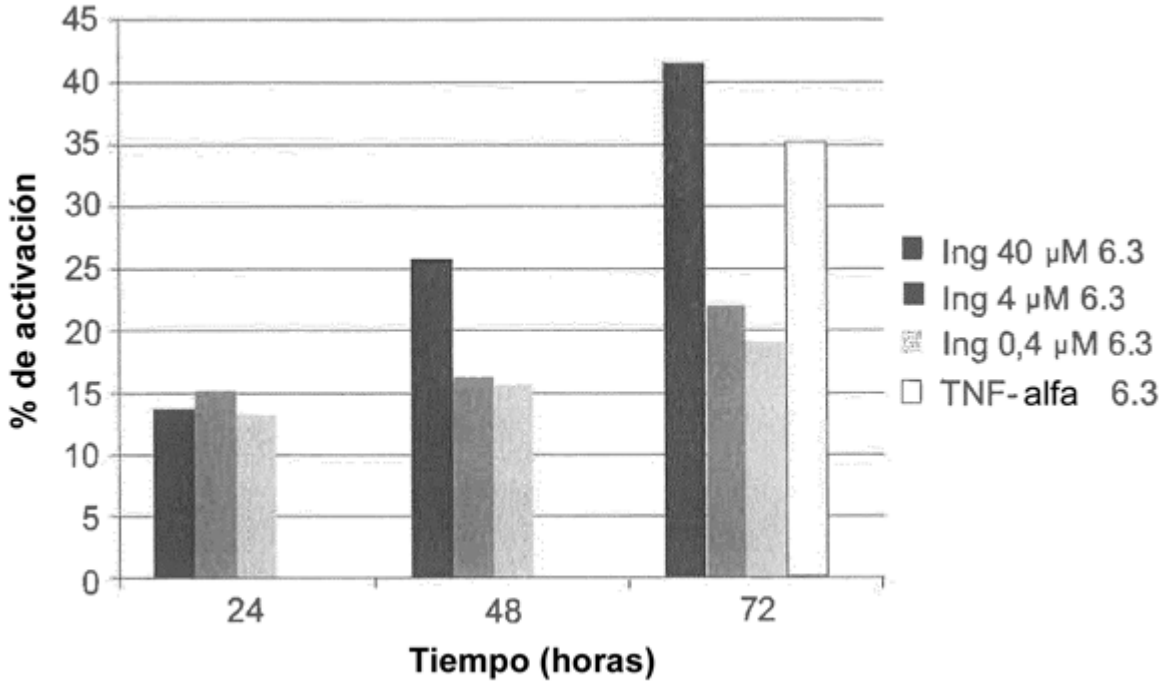

45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
% de activación
24
48
72
Tiempo (horas)
Ing 40 μM 6.3
Ing 4 μM 6.3
Ing 0,4 μM 6.3
TNF- alfa 6.3

FIG. 1B

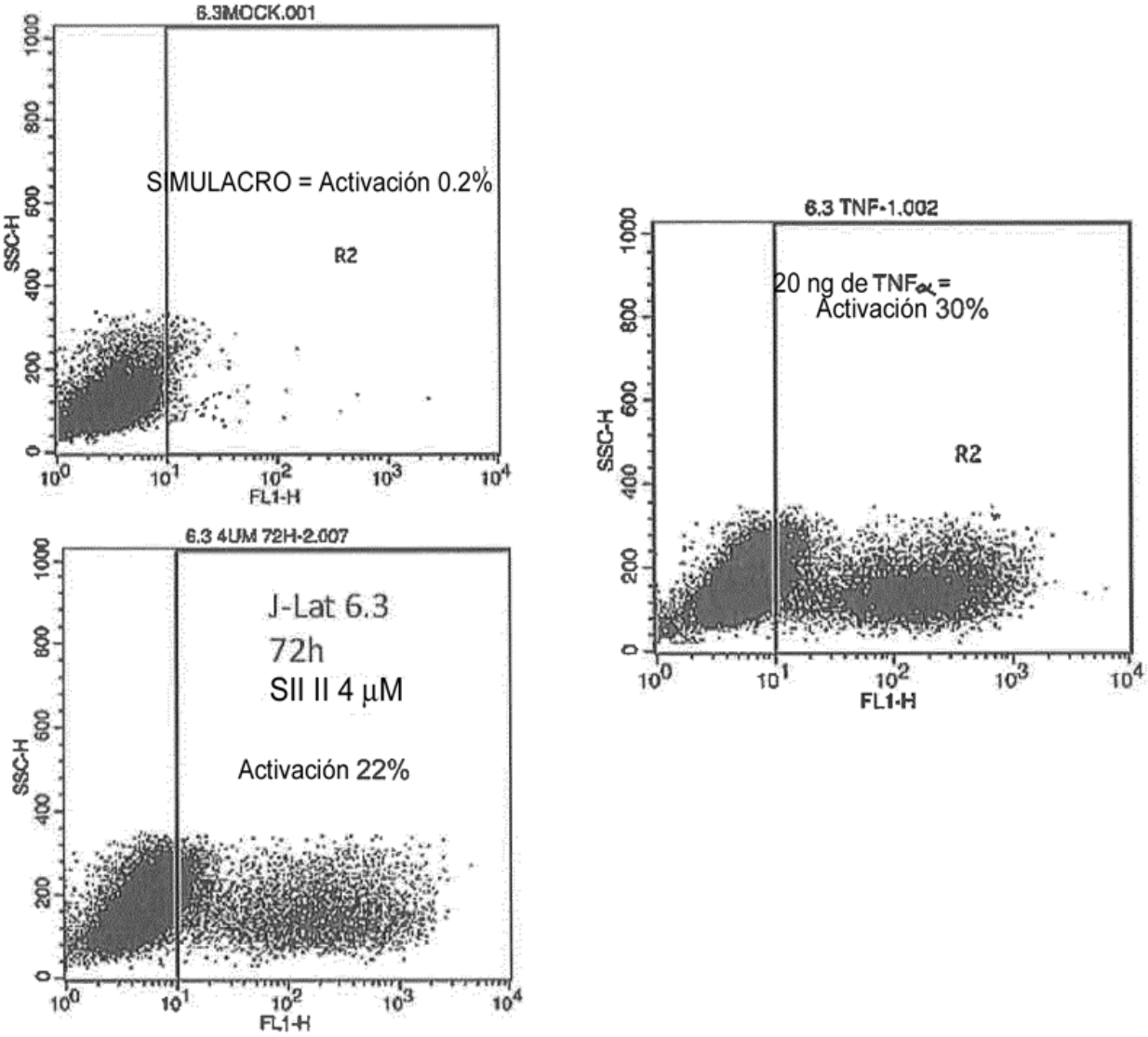

6.3MOCK.001
SIMULACRO = Activación 0.2%
R2
SSC-H
FL1-H
6.3 TNF-1.002
20 ng de TNFα =
Activación 30%
R2
SSC-H
FL1-H
6.3 4UM 72H-2.007
J-Lat 6.3
72h
SII II 4 μM
Activación 22%
SSC-H
FL1-H

FIG. 1C

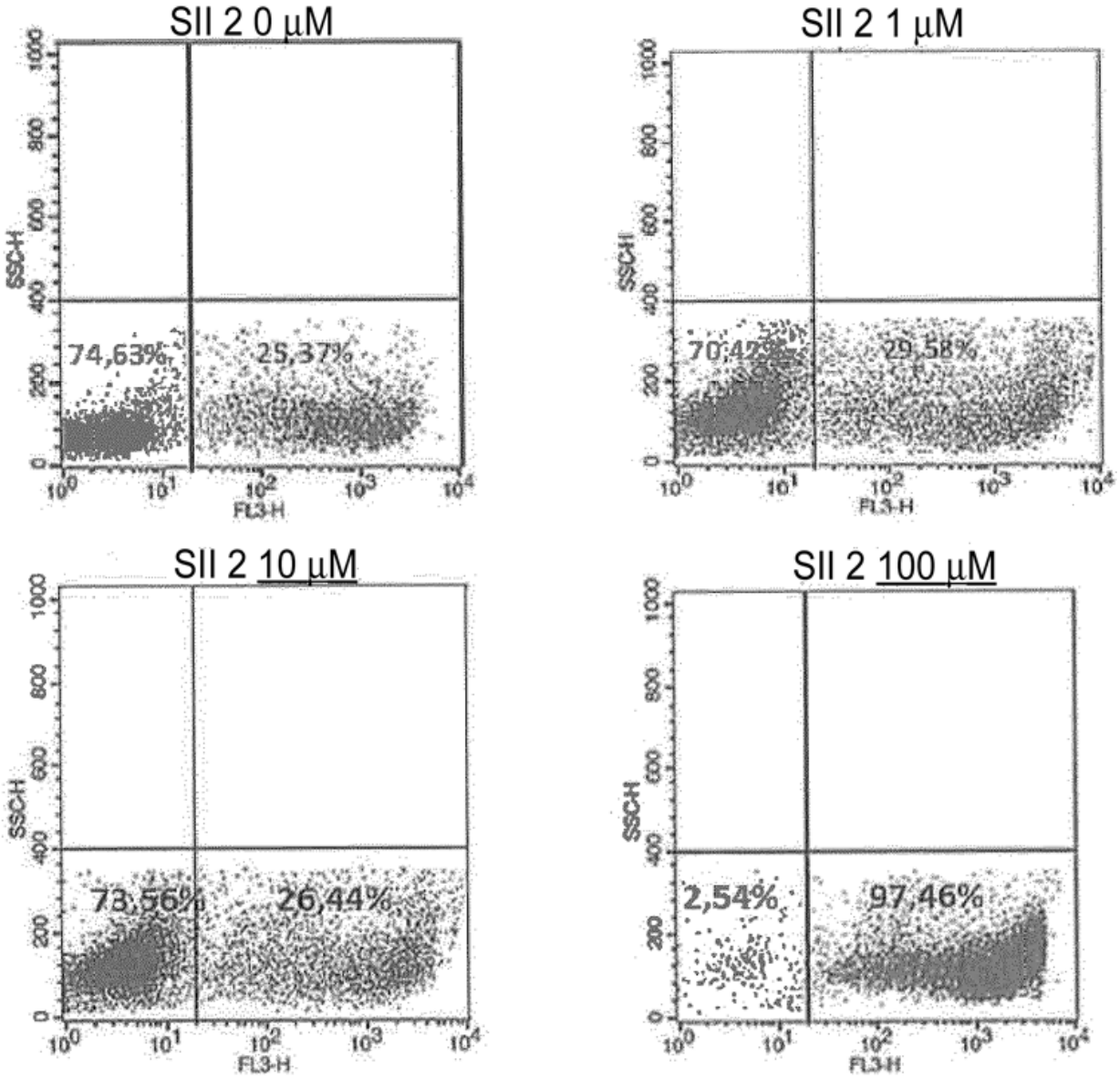

SII 2 0 µM
74,63%
25,37%
SII 2 1 µM
70,42%
29,58%
SII 2 10 µM
73,56%
26,44%
SII 2 100 µM
2,54%
97,46%
SSC-H
FL3-H

FIG. 2

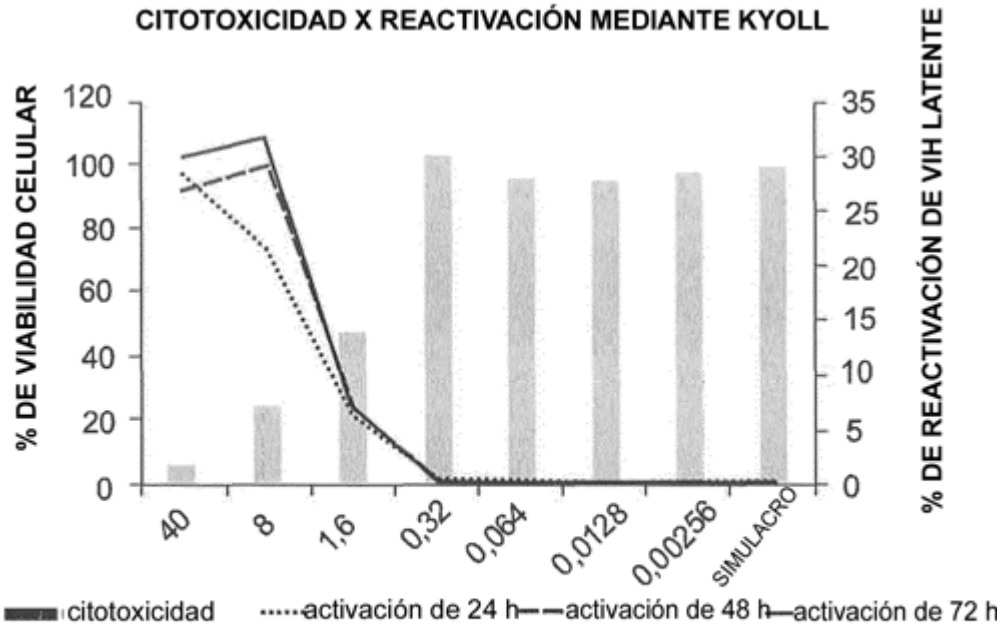

CITOTOXICIDAD X REACTIVACIÓN MEDIANTE KYOLL
% DE VIABILIDAD CELULAR
% DE REACTIVACIÓN DE VIH LATENTE
120
100
80
60
40
20
0
35
30
25
20
15
10
5
0
40
8
1,6
0,32
0,064
0,0128
0,00256
SIMULACRO
citotoxicidad
activación de 24 h
activación de 48 h
activación de 72 h

FIG. 3

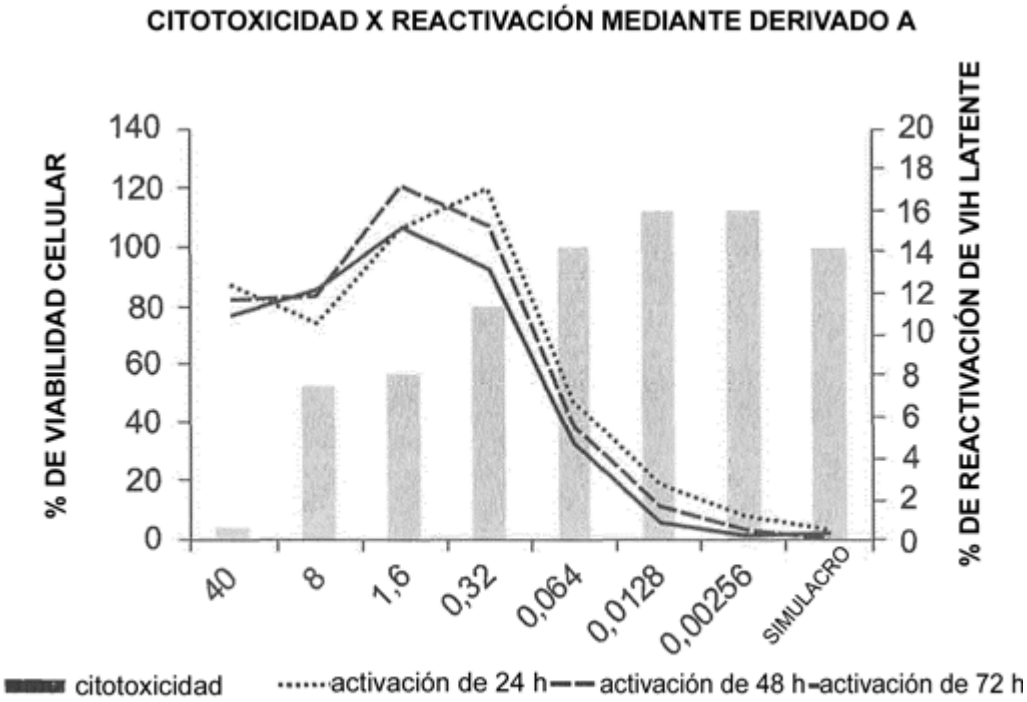

CITOTOXICIDAD X REACTIVACIÓN MEDIANTE DERIVADO A
% DE VIABILIDAD CELULAR
% DE REACTIVACIÓN DE VIH LATENTE
140
120
100
80
60
40
20
0
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
40
8
1,6
0,32
0,064
0,0128
0,00256
SIMULACRO
citotoxicidad
activación de 24 h
activación de 48 h
activación de 72 h

FIG. 4

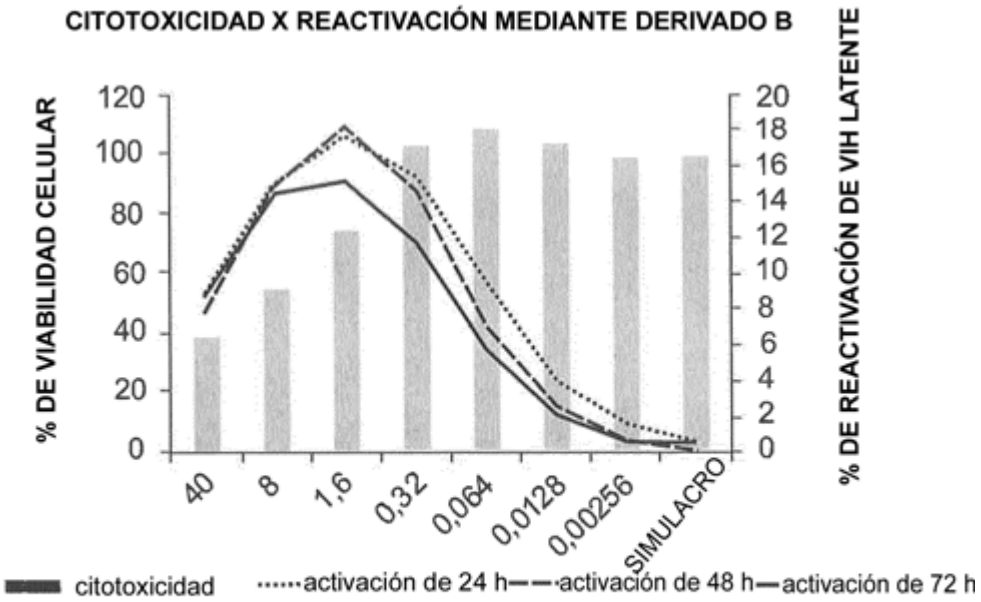

CITOTOXICIDAD X REACTIVACIÓN MEDIANTE DERIVADO B
% DE VIABILIDAD CELULAR
% DE REACTIVACIÓN DE VIH LATENTE
120
100
80
60
40
20
0
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
40
8
1,6
0,32
0,064
0,0128
0,00256
SIMULACRO
citotoxicidad
activación de 24 h
activación de 48 h
activación de 72 h

FIG. 5

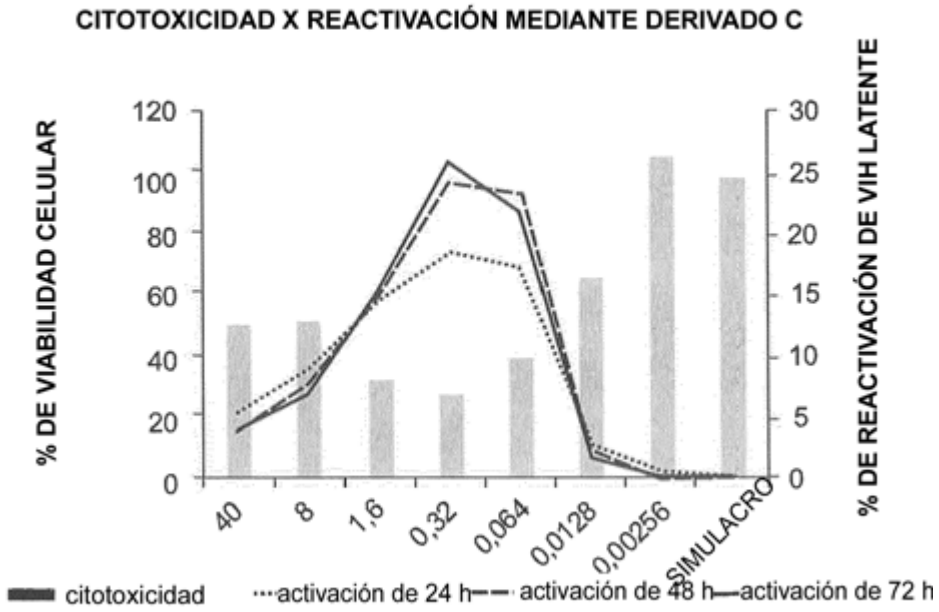

CITOTOXICIDAD X REACTIVACIÓN MEDIANTE DERIVADO C
% DE VIABILIDAD CELULAR
% DE REACTIVACIÓN DE VIH LATENTE
120
100
80
60
40
20
0
30
25
20
15
10
5
0
40
8
1,6
0,32
0,064
0,0128
0,00256
SIMULACRO
citotoxicidad
activación de 24 h
activación de 48 h
activación de 72 h

FIG. 6

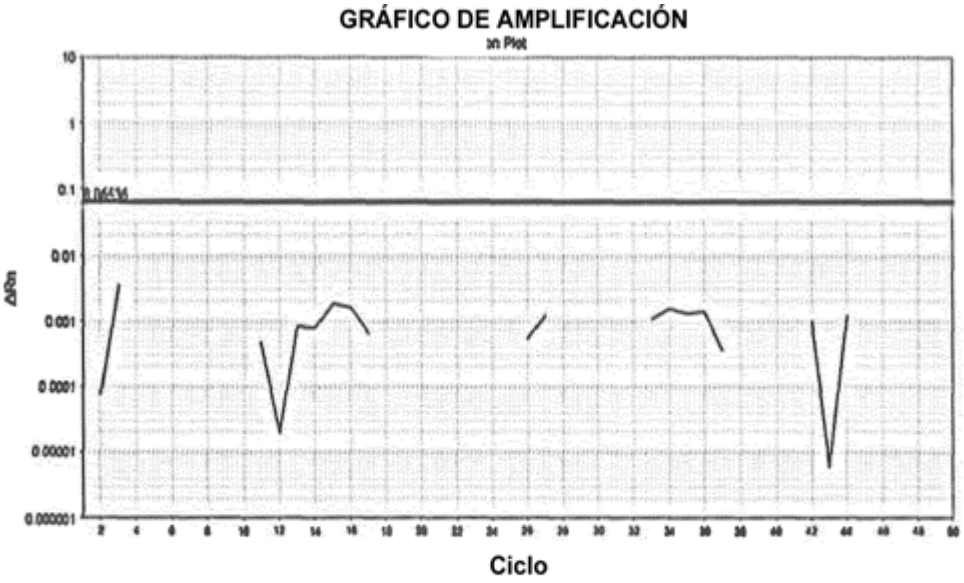


GRÁFICO DE AMPLIFICACIÓN
ΔRn
Ciclo

FIG. 7

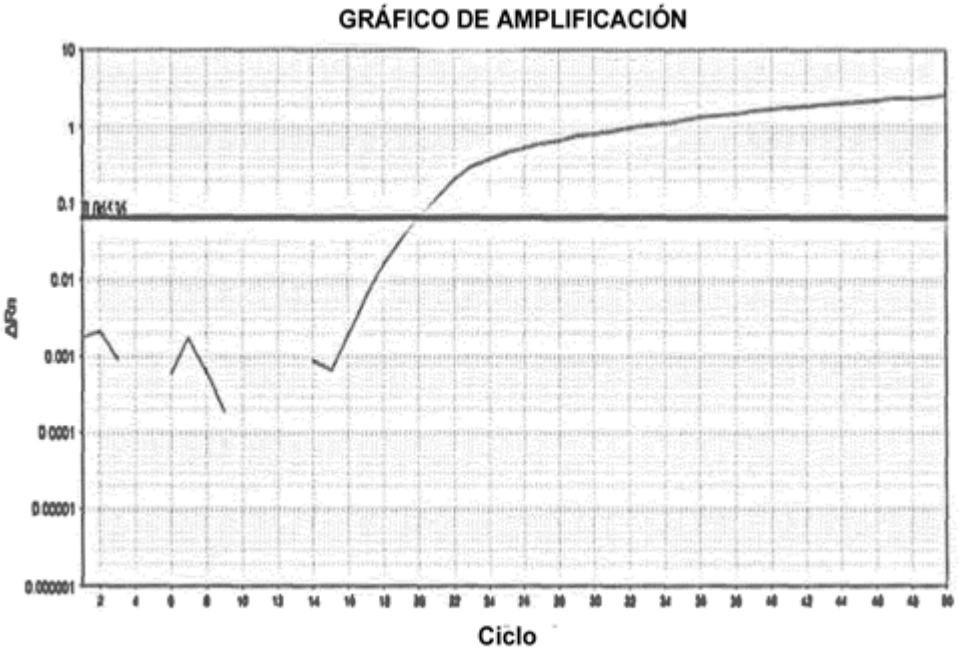


GRÁFICO DE AMPLIFICACIÓN
ΔRn
Ciclo

FIG. 8

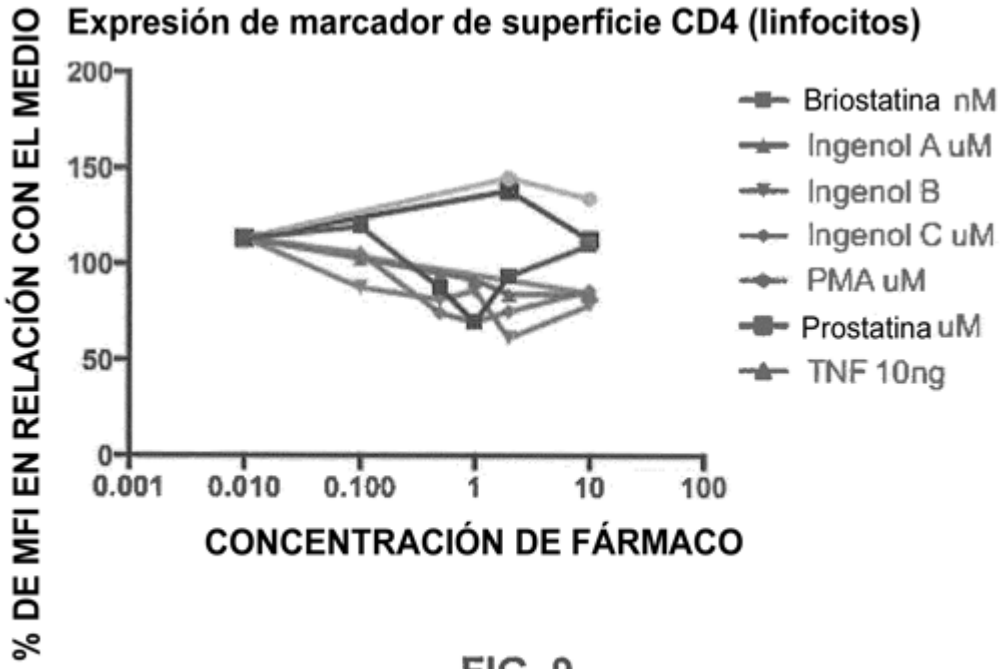

Expresión de marcador de superficie CD4 (linfocitos)
% DE MFI EN RELACIÓN CON EL MEDIO
200
150
100
50
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO
Briostatina nM
Ingenol A uM
Ingenol B
Ingenol C uM
PMA uM
Prostatina uM
TNF 10ng

FIG. 9

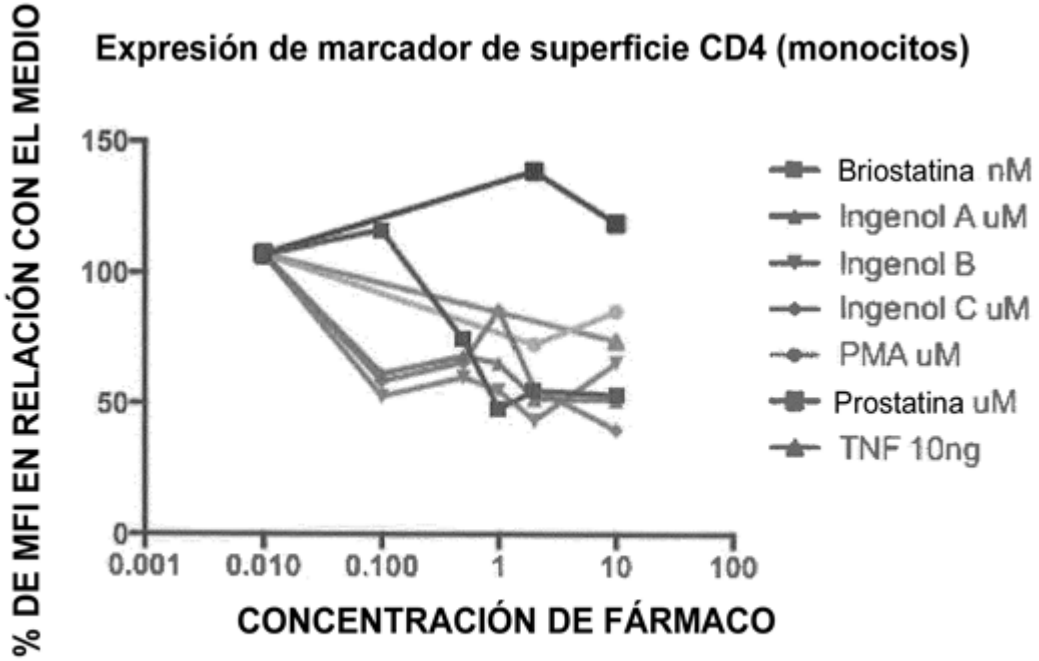

Expresión de marcador de superficie CD4 (monocitos)
% DE MFI EN RELACIÓN CON EL MEDIO
150
100
50
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO
Briostatina nM
Ingenol A uM
Ingenol B
Ingenol C uM
PMA uM
Prostatina uM
TNF 10ng

FIG. 10

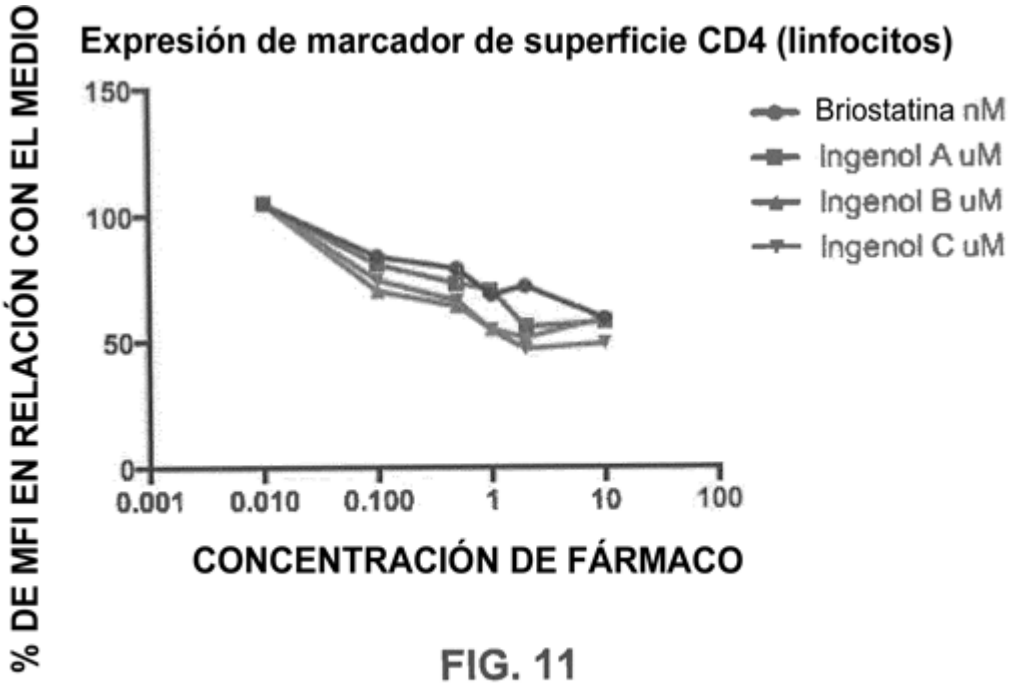

Expresión de marcador de superficie CD4 (linfocitos)
% DE MFI EN RELACIÓN CON EL MEDIO
150
100
50
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO
Briostatina nM
Ingenol A uM
Ingenol B uM
Ingenol C uM

FIG. 11

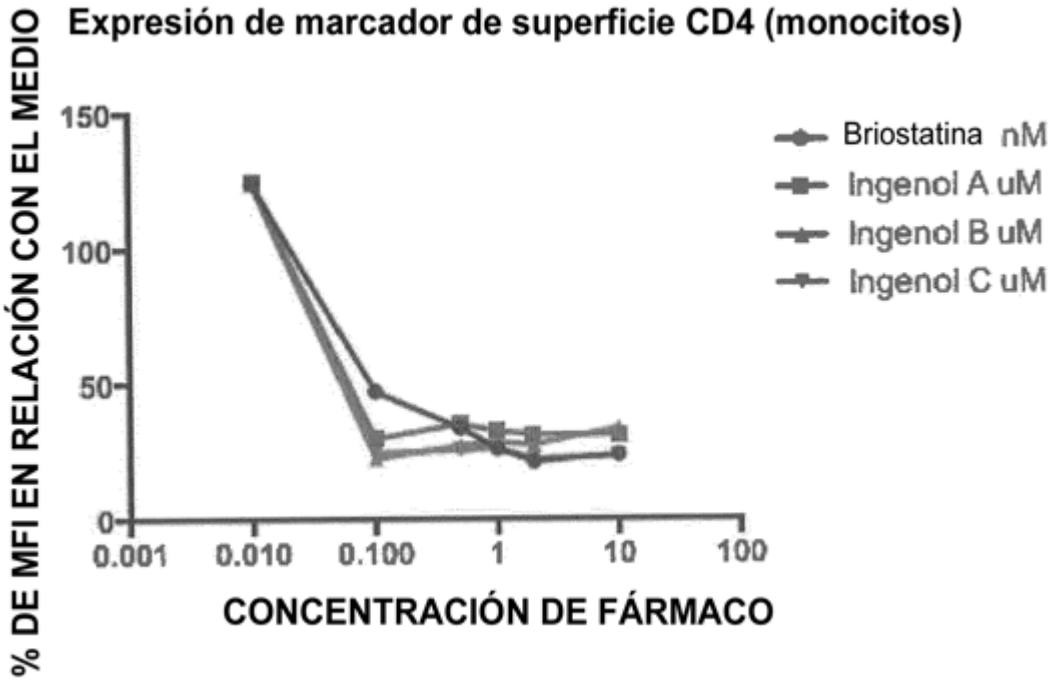

Expresión de marcador de superficie CD4 (monocitos)
% DE MFI EN RELACIÓN CON EL MEDIO
150
100
50
0
0.001
0.010
0.100
1
10
100
CONCENTRACIÓN DE FÁRMACO
Briostatina nM
Ingenol A uM
Ingenol B uM
Ingenol C uM

FIG. 12