

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 312 168**

⑮ Int. Cl.:

C07C 39/12 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

C07C 43/23 (2006.01)

C07C 69/013 (2006.01)

A61K 36/00 (2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **95933830 .2**

⑯ Fecha de presentación : **22.09.1995**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **0783474**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.1997**

⑭ Título: **Componentes para la supresión de la transactivación del HIV por Tat.**

⑩ Prioridad: **30.09.1994 US 316341**

⑬ Titular/es: **The Johns-Hopkins University
3400 North Charles Street
Baltimore, Maryland 21218, US**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.02.2009

⑭ Inventor/es: **Huang, Ru, Chih y
Gnabbe, John, N.**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.02.2009

⑭ Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 312 168 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

Componentes para la supresión de la transactivación del HIV por Tat.

5 Antecedentes de la invención

1.Campo de la invención

La presente invención está relacionada con el aislamiento, la purificación, y la caracterización de derivados de 10 1,4-bis-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano (ácido nordihidroguaiarético, NDGA). Los derivados fueron aislados a partir de hoja y flor de chaparral (*Larrea tridentata*, Zygophyllaceae) y, conjuntamente con NDGA, pueden ser utilizados para suprimir la transactivación por Tat en lentivirus, incluyendo el virus HIV.

15 2. Descripción de la técnica relacionada

La Tat es una transactivadora de la expresión del gen del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) y es uno de los dos o más factores reguladores víricos necesarios (Tat y Rev) para la expresión del gen del HIV. La Tat actúa mediante unión con el elemento TAR RNA y la activación de la transcripción a partir del promotor de repetición terminal larga (LTR).

20 La proteína Tat estabiliza el alargamiento de transcripción y se ha demostrado que está involucrada con el inicio de la transcripción. Estudios previos han demostrado que la Tat media en la reducción de la proliferación de células T dependiente de anticuerpo, contribuyendo sustancialmente al fracaso de la respuesta inmunitaria. La Tat estimula también directamente el crecimiento de las células de Kaposi.

25 Dado que la Tat no tiene homólogos celulares aparentes, este potente regulador positivo se ha convertido en un objetivo atractivo para el desarrollo de fármacos anti-AIDS (ver Figura 1). Como contrapartida a los inhibidores de transcriptasa inversa HIV disponibles en la actualidad (AZT, DDI) o a los potenciales inhibidores de proteasa que evitan nuevas rondas de infección, un inhibidor que suprime la expresión regulada por Tat del gen vírico de DNA provírico, detendrá el virus en un estado temprano (Hsu *et al.*, *Science* 254: 1799-1802, 1991).

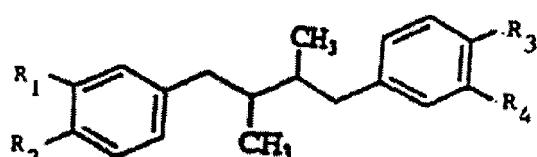
30 Los esfuerzos llevados a cabo para la elucidación de factores que controlan la expresión génica en niveles transcripcionales y post-transcripcionales en eucariotas huésped han hecho posible la valoración cuantitativa de la función Tat (Sim, Ann, N.Y. *Acad. Sci.* 616: 64-70, 1990). Para efectuar un cribado dirigido a localizar inhibidores de la transactivación regulada por Tat (Tat-TRS), el gen informador de la fosfatasa alcalina placentaria secretada (SEAP) es puesto bajo control del promotor HIV-1LTR en el plásmido pBC12/HIV/SEAP. La actividad codificada por Tat es suministrada por una segunda construcción de plásmido pBC12/CMV/t2. La co-transfección de células COS con estos dos plásmidos conduce a la secreción de la fosfatasa alcalina en el medio de cultivo, el cual es analizado a través de un simple ensayo colorimétrico (Berger *et al.*, *Gene* 66:1-10, 1988). El ensayo SEAP, por consiguiente, proporciona una determinación indirecta de la transactivación por Tat. Un inhibidor debería provocar la reducción de la actividad SEAP debida a la inhibición de la expresión de SEAP mRNA a través de la transactivación del promotor HIV-1 LTR, por medio de la proteína Tat (Tat-TRS).

40 Resumen de la invención

45 En la presente solicitud, describimos la actividad inhibidora de Tat-TRS de la planta del desierto denominada *Larrea tridentata*. De entre diversos extractos de planta preparados a partir de plantas medicinales procedentes del desierto y de selvas tropicales, utilizadas en medicina tradicional contra afecciones víricas, tan solo el extracto total procedente de las hojas y las flores del chaparral (*Larrea tridentata*) mostraba actividad inhibidora de Tat-TRS. Este extracto inhibe también los efectos citopáticos del HIV en células linfoblastoides humanas infectadas crónicamente con el virus, según se ha valorado a través del ensayo de formazán soluble recientemente desarrollado (Weislow *et al.*, *JNCI* 81: 577-586, 1989).

50 La presente invención describe un procedimiento *in vitro* para la supresión de la transactivación por Tat de un lentivirus en una célula, que comprende los pasos de:

a) administrar a la célula un compuesto de la siguiente fórmula estructural:



en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno de ellos, seleccionados de entre el grupo que comprende HO-, CH₃O- y CH₃(C=O)O-; y

5 b) permitir que el compuesto suprima la transactivación por Tat del lentivirus en la célula.

Se describe también la utilización de un compuesto, tal y como se ha definido anteriormente, en la preparación de
5 un medicamento para la supresión de la transactivación por Tat en una célula.

Se describe adicionalmente un procedimiento para la producción de una preparación que comprende un compuesto
tal y como se ha definido anteriormente, comprendiendo los pasos de:

10 a) proporcionar hojas de chaparral que han sido secadas y reducidas a polvo;
b) extraer el polvo con una mezcla de cloroformo y metanol para formar un extracto; y
c) tratar el extracto con hexano para producir materiales insolubles en hexano;

15 en donde los materiales insolubles en hexano contienen un compuesto de la fórmula indicada anteriormente.

20 Cada uno de los compuestos fue aislado a partir de extractos de hoja-flor de chaparral *Larrea tridentata* y es un
derivado de 1,4-bis(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano (ácido nordihidroguaiarético, NHGA).

25 Además, el NDGA y cada uno e los derivados pueden ser utilizados para suprimir la transactivación por Tat de un
lentivirus, incluyendo el virus HIV, en una célula, mediante la administración a la misma de NDGA o de uno de sus
derivados.

25 Breve descripción de los gráficos

30 La Figura 1 ilustra, de forma gráfica, el ciclo vital de HIV-1 y diferentes sitios de actuación de potenciales agentes
terapéuticos, incluyendo inhibidores Tat-TRS. El paso de transcripción de base es indicado por 1 y el paso de
transactivación dependiente de proteína reguladora vírica por 2.

La Figura 2 muestra la inducción de la expresión de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP) en el ensayo SEAP
estándar.

35 La Figura 3 muestra la inhibición de la actividad Tat-TRS por medio de extracto total de chaparral en el ensayo de
fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

40 La Figura 4 muestra un análisis de inhibidores HIV Tat obtenidos a partir de plantas en Componente Lo, a través
de cromatografía gaseosa (GC), utilizando un análisis en columna de fenilmethylsiloxano al 5% (HP-5)reticulada
capilarmente, no destructiva. El tiempo de elución (en minutos) aparece en cada uno de los picos.

45 La Figura 5 muestra un análisis de inhibidores HIV Tat obtenidos de plantas en Componente Gr, a través de croma-
tografía gaseosa (GC), utilizando un análisis en columna de fenilmethylsiloxano al 5% (HP-5) reticulada capilarmente,
no destructiva. El Componente Gr es una mezcla compleja. El tiempo de elución (en minutos) aparece sobre cada uno
de los picos.

La Figura 6 ilustra la inhibición de la expresión de SEAP inducida por Tat, por medio del compuesto sencillo
derivado de planta Malachi 4:5-6 (Mal 4) y NDGA, en el ensayo de fosfatasa alcalina secretada (SEAP).

50 La Figura 7 muestra la cuantificación de producción de formazán XTT, como medición de células viables en
cultivos tratados con Mal 4 de células CEM-SS infectadas o no con HIV, en dos experimentos separados. El porcentaje
de producción de formazán XTT para células infectadas sin tratamiento Mal 4 para el experimento 1 era del 8,9% y
para el experimento 2 del 7,5%. Para el experimento 1, las células no infectadas se representan por .- y las células
infectadas por x-x. Se averiguó que la EC₅₀ era de 4,25 µg/ml o 13,4 µM. La IC₅₀ se estimó en 100 µg/ml ó 325 µM.

55 Descripción detallada de las realizaciones preferidas

60 La presente invención describe el aislamiento, la purificación y la caracterización de derivados de 1,4-bis-(3,4-
dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano o ácido nordihidroguaiarético (NDGA). Cada uno de los derivados de NDGA fue
aislado, purificado y caracterizado según los siguientes procedimientos.

Materiales y procedimientos

65 **Línea celular:** células COS-7 con origen de replicación SV40 fueron mantenidas en Medio Dulbecco Modifica-
do por Isocove (IMDM), suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10% y antibióticos. Las células fueron
incubadas en una incubadora humidificada con 95% de O₂/5% de CO₂, a 37°C.

ES 2 312 168 T3

5 *Plásmidos:* el plásmido pBC12/HIV/SEAP, que contiene el promotor HIV LTR sensible a Tat con el gen informador SEAP pero no la función codificada por Tat, fue utilizado para expresar la actividad SEAP de base; el pBC12/CMV/t2 suministraba la función codificada por Tat, a saber, el nivel SEAP inducido. El pBC12/RSV/SEAP, que contiene el promotor de Virus de Sarcoma de Rous (RSV)LTR insensible a Tat, se utilizó como control positivo. Todos los plásmidos fueron obtenidos del Dr. Bryan Cullen, Duke Medical Center. Los plásmidos pSEAP y pBKCMV y HIV LTR y Tat DNA se encuentran disponibles comercialmente en Clontech y Startagene. La transformación de plásmido fue lograda en cepa de *E. coli* MC1061, la cual fue obtenida de la Dr. Barbara Bachmann, Department of Biology, Yale University. La cepa *E. coli* MC1061 puede ser también adquirida en Clontech. Los DNAs de plásmido fueron purificados utilizando el kit de purificación Qiagen® (Qiagen).

10 10 *Reactivos químicos:* la dietanolamina (#31589) y el p-nitrofenilfosfato (#1768) fueron adquiridos en Fluka BioChemika y la L-homoarginina (#H-1007) fue adquirida en Sigma Co. La lipospermina DOGS (Transfectam®, #E123A, Promega) fue utilizada en estudios de transfección de DNA.

15 15 *Preparación de materiales de plantas de prueba:* Las hojas y las flores de chaparral fueron recogidas basándose en informaciones etnofarmacológicas. Los materiales de planta fueron secados y molidos en un molino Willy de 3 mm de tamiz. En estudios piloto, 1 g de planta en polvo fue inicialmente extraído a través de sucesivas maceraciones utilizando una mezcla de cloroformo: metanol. El extracto fue concentrado hasta residuo. La totalidad de los 176 mg generados de extracto crudo fueron tratados 7 veces con 3 ml de hexano. El paso proporcionaba 137 mg de materiales 20 no solubles en hexano (HI) y 31 mg de materiales solubles en hexano (HS). Todos estos extractos fueron monitorizados paso a paso mediante SiO₂ con carbonización con sulfato de cerio, CeSO₄ al 2% (peso/Volumen) en H₂SO₄ al 5,6% (volumen/volumen) y mediante el ensayo SEAP, para determinar la actividad Tat-TRS.

25 25 Para el ensayo SEAP, los materiales fueron disueltos en solución de DMSO al 10%, preparada en PBS exenta de calcio/magnesio. La suspensión fue centrifugada y la solución stock (10 mg/ml) esterilizada con filtro, utilizando un filtro Millex®-GS 22 µm (Millipore). Se prepararon diluciones apropiadas de solución stock en una concentración de DMSO final del 0,2% en PBS, para obtener las diversas concentraciones de los compuestos de prueba.

30 30 *Fraccionación diferencial y purificación del ingrediente activo por medio de cromatografía a contracorriente (CCC):* Sobre la base de los resultados preliminares de las fracciones anteriores en el ensayo SEAP, se llevó a cabo un fraccionamiento adicional del HI insoluble, por medio de CCC. Esto condujo a la identificación de dos destacadas fracciones activas, denominadas componentes "Verde" y "Amarillo". La identificación de las fracciones más activas a partir de estos estudios anticipados trajo como consecuencia un fraccionamiento diferencial en toda regla del polvo de planta, en el intento de generar una gran cantidad de las fracciones Verde y Amarilla. Este fraccionamiento fue 35 llevado a cabo sobre 101,4 gramos de polvo de planta y se inició con un paso de tratamiento con hexano, tal y como se muestra en la Tabla 1.

40 40 Mediante cromatografía de partición líquido-líquido a contracorriente, utilizando la centrifugadora planeta de eje transversal (CPC) descrita por Ito y Conway, CRC Critical Reviews of Analytical Chemistry 17:65 et seq., 1986, se logró un fraccionamiento adicional de los principales componentes a partir de la fase orgánica (OG), después de partición con cloroformo:agua. El sistema de disolventes óptimo consistía en una mezcla de hexano:EtOAC:MeOH:NaCl al 0,5%, en la proporción 6:4:5:5, con la capa superior (capa orgánica) como fase móvil. Cinco gramos de la fracción orgánica fueron disueltos en 23 ml de una mezcla de las dos fases e introducidos en el serpentín a través de una válvula de bucle. La fase móvil fue bombeada a través del serpentín, a la vez que rotaba a razón de 800 rpm. A un caudal de 45 aproximadamente 4 ml por minuto, aproximadamente el 32% de la fase estacionaria se perdió inicialmente (retención del 68%). Tras la aparición de fase móvil en el eluido, fracciones de la fase móvil fueron recogidas, evaporadas a sequedad, monitorizadas a través de TLC y agrupadas en 5 lotes: frente Disolvente (SF), Verde (Gr), Amarilla (Ye), Roja y fase Estacionaria (STP). Todas estas fracciones fueron después monitorizadas por medio del ensayo SEAP, con vistas a determinar la actividad Tat-TRS.

50 50 Se obtuvo una purificación adicional de las fracciones Verde y Amarilla por medio de CCC, utilizando una centrifugadora planeta de eje transversal, conocida como serpentín separador-extractor multicapas Ito (Ito and Conway, CRC Critical Reviews of Analytical Chemistry 17:65 et seq., q986). El sistema disolvente estaba constituido por una mezcla de hexano:EtOAC:MeOH:NaCl al 0,5% (7:3:5:5). Doscientos miligramos de la fracción Verde proporcionaron 6,8 mg de un componente denominado Gr, a saber, 0,051% del rendimiento total basado en el polvo de planta original. Estudios similares sobre la fracción Amarilla (Ye) generaron 9,3 mg de un componente denominado Lo. Estos componentes purificados (Lo y Gr) comprenden cada uno de ellos diversos compuestos y sus correspondientes fracciones "madre" fueron almacenadas a 4°C hasta ser objeto de comprobación para determinar su actividad biológica y utilizadas para posterior caracterización.

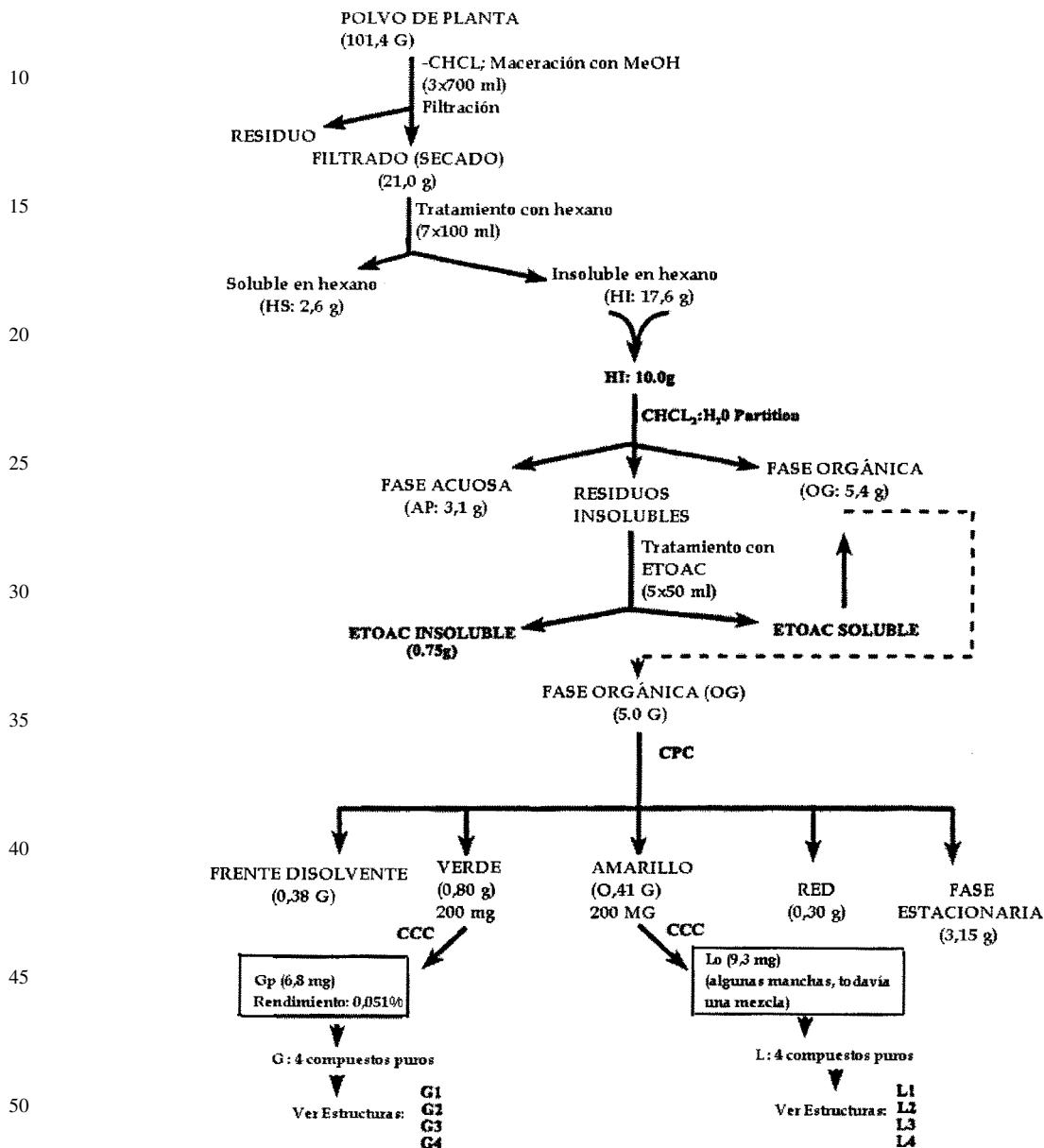
60

65

TABLA 1

*Fraccionamiento diferencial y cromatografía a contracorriente (CCC) de derivados de NDGA procedentes de chaparral (*larrea tridentata*)*

5



55 *Cultivo celular y transfección de DNA:* células COS fueron mantenidas tal como se ha indicado anteriormente (Cullen, Cell 46: 973-982, 1986). La transfección de DNA fue llevada a cabo utilizando un procedimiento modificado de la lipospermina (Tranfectam[®], Promega #E123A), procedimiento descrito originalmente en otra parte (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217: 599-618, 1993). Brevemente, un día antes de la transfección de DNA, pocillos de fondo plano Linbro[®] 24, con placas de 17 mm de diámetro, fueron pretratadas con 0,5 ml de solución estéril de gelatina al 0,1%. Las placas fueron mantenidas en la campana durante 1 hora (todos los pasos de la transfección se llevaron a cabo en la campana, salvo que se indique lo contrario). La solución de gelatina fue aspirada y las placas lavadas con 0,5 ml de IMDM suplementado con suero fetal de ternera al 10% y antibióticos (medio completo). Se sembraron células COS a una densidad de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por placa de 17 mm y se incubaron en una incubadora humidificada con 95% de O_2 /5% de CO_2 , a 37°C. La transfección de DNA fue llevada a cabo a una confluencia celular de entre el 30 y el 50%. La solución stock del reactivo Tranfectam, DOGS, fue preparada según el consejo del fabricante a razón de 1 mg/0,380 ml (2,38 mg/ml ó 3,4 mM) en etanol al 10% en agua destilada (volumen/volumen).

ES 2 312 168 T3

La mezcla de transfección comprende dos soluciones preparadas en tubos estériles:

- 5 a) la Solución A contenía una solución estéril de NaCl 150 mM + DNAs de plásmidos (gen no seleccionado/gen seleccionado, en una proporción 2:1) 0,35 μ g de pBC12/HIV/SEAP por pocillo + 0,175 μ g de pBC12/CMB/t2 (que codifica para la función Tat) por pocillo.
- 10 b) la solución B contenía un volumen igual de NaCl 150 mM y un volumen de Transfectam® determinado como 6 veces la cantidad total de DNAs. Las soluciones A y B fueron homogeneizadas y mezcladas de inmediato.

10

Se dejó que la reacción se desarrollase durante un período de 10 minutos. Entretanto, el medio de cultivo fue extraído de las células COS subconfluentes y se añadieron 300 μ l (100 μ l de medio completo IMDM + 200 μ l de medio exento de suero) a cada uno de los pocillos. La mezcla de transfección fue administrada a los pocillos a igualdad de 15 volumen. Muestras control que no contenían DNA fueron tratadas de forma similar y recibieron tan solo solución de NaCl 150 mM. Todas las muestras fueron incubadas durante un período de entre 10 y 12 horas, después de lo cual se añadieron 700 μ l de medio de crecimiento completo. Compuestos de prueba, preparados en DMSO al 5%/PBS exento de Ca y Mg (para materiales no solubles en agua) fueron añadidos inmediatamente, a diversas concentraciones, a los 20 pocillos. Todas las muestras fueron después incubadas durante un período adicional de 48 horas, transcurrido el cual se extrajeron 300 μ l de cada uno de los sobrenadantes de cultivo, para proceder al análisis SEAP.

25 *El ensayo de la fosfatasa alcalina secretada (SEAP):* el análisis de fosfatasa alcalina secretada fue llevado a cabo tal y como se describió originalmente (Berger *et al.*, Gene 66:1-10, 1988). Brevemente, se extrajo una alícuota de 250 μ l, procedente de sobrenadantes de cultivos celulares COS, se calentó a 65°C durante un período de 5 minutos para 30 inactivar, de forma selectiva, la fosfatasa endógena (la SEAP es estable al calor) y se centrifugó en una Microfusa durante un período de 2 minutos. A 100 μ l de alícuota de las muestras se les añadieron 100 μ l de tampón de ensayo 2 x SEAP (dietenolamina 1,0M, pH 9,8; MgCl₂ 0,5mM; L-homoarginina 10 mM). La solución fue mezclada y transferida a un plato de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Corning). Veinte μ l de la solución sustrato precalentada (p-nitrofenilfosfato 120 mM disuelto en tampón de ensayo 1 x SEAP) fueron administrados con una multipipeta en el interior de cada uno de los pocillos que contienen la mezcla de reacción. La A₄₀₅ de la reacción fue leída a intervalos de 5 minutos a 37°C durante 60 minutos, utilizando el lector de microplaca EL340i (Bio-tek Instruments, Inc.), con agitaciones de 5 segundos antes de cada lectura. El cambio en la absorbancia fue reflejado de forma gráfica frente al tiempo en el ensayo estándar de inducción de SEAP. En el ensayo de cribado de fármaco, se calculó el porcentaje de inhibición de la expresión de SEAP, a los 30 minutos, de acuerdo con lo siguiente:

35

$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(CT^* - C^*) \times 100]$$

40 En donde:

C⁻ : muestra control (sin DNA ni fármaco)

CT⁻ : muestra control (+DNA, sin fármaco)

45 C⁺ : muestra tratada con fármaco (sin DNA, + fármaco)

CT⁺ : muestra tratada con fármaco (+DNA, + fármaco)

50 *Optimización de la técnica de transfección:* En la transfección de DNA de células eucariotas se utilizan diversas técnicas. Estos procedimientos incluyen la co-precipitación de DNA con fosfato cálcico o polímeros catiónicos, el debilitamiento de la membrana celular, ya sea a través de medios químicos (detergentes, disolventes, enzimas, polímeros anfófilos) o por medio de medios físicos (shocks térmicos, osmóticos o eléctricos o bombardeo de partículas). Estas técnicas sufren, en alguna medida, de eficacia variable y de diversos grados de toxicidad.

55 Los requisitos previos para que las células estén en condiciones de absorber el DNA, a saber, de cruzar la membrana citoplásmica intacta, son “la compactación y el enmascaramiento de las cargas de DNA” (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217: 599-618, 1993). Estos requisitos se han cumplido de forma satisfactoria con el procedimiento Transfectam® desarrollado recientemente. El reactivo Transfectam (dioctadecilamidoglicil espermina) es una lipopoliamina catiónica sintética que contiene un grupo cabecera espermina cargado positivamente, con una fuerte 60 afinidad para el DNA ($K_d = 10^{-5} - 10^{-7}$ M). Este grupo cabecera espermina está covalentemente unido a un resto lípido por medio de un enlace péptido. Las moléculas lipospermina se unen al DNA, revistiéndolo con una capa lipídica. En presencia de lipospermina en exceso, se forman vesículas de DNA plásmido catiónico revestidas con lípido y la parte lipídica del complejo se fusiona con la membrana celular. Se cree que la internalización del DNA tiene lugar por medio de endocitosis.

65

Se ha demostrado que la transfección mediada por transfectam proporciona una eficacia superior a la de los procedimientos actuales (Barthel *et al.*, DNA and Cell Biology 12(6): 553-560, 1993). Además, el Transfectam® es un reactivo estable y virtualmente no citotóxico. No obstante, tuvieron que valorarse factores que intervienen en la op-

timización de la transfección en la línea celular específica COS. Entre dichos factores se incluyen, la duración de la transfección, la proporción de reactivo Transfectam a DNA, la concentración de DNA y otros factores de dilución, tales como el volumen y la concentración de NaCl. Los resultados de optimización de las condiciones de transfección se muestran más adelante:

5 a) *Duración de la transfección:* se cultivaron células COS, con una concentración de DNA plásmido determinada, en estudios de desarrollo temporal. Estos estudios se dirigían a la selección del punto temporal de incubación sub-óptima para estudios de inhibición de la expresión de SEAP, a través de diversos compuestos de prueba. Los resultados de la inducción en el transcurso del tiempo de la expresión de SEAP (resultados n mostrados) indican un incremento gradual de la expresión de SEAP en función del tiempo. El inicio de esta inducción se inició por debajo de las 4 horas y alcanzó un máximo a las 24 horas. No se observó ninguna diferencia significativa entre los valores correspondientes a las 10, las 12 y las 15 horas. Por consiguiente, el punto final entre las 12 y las 15 horas fue seleccionado como el período de incubación para la inhibición de la expresión de SEAP en todos los estudios subsiguientes de cribado de fármaco.

10 b) *Concentración de DNA:* La concentración de DNA óptima para la transfección fue determinada basándose en estudios previos con el reactivo Transfectam (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217: 599-618, 1993). Para la co-transfección, se averiguó que la proporción 2:1 (gen no seleccionado/gen seleccionado) resultaba la más adecuada, tal y como se había informado en otras partes (Hsu *et al.*, Science 254: 1799-1802, 1991). El plásmido pBC12/HIV/SEAP no seleccionado fue utilizado a una concentración de 0,35 µg/pocillo y el plásmido pBC12/CMV/t2, que codifica para la función Tat, a una concentración de 0,75 µg/pocillo, en un pocillo de fondo plano Linbro® 24, con placas de 17 mm de diámetro.

15 c) *Proporción de transfectam a DNA y determinación de la concentración iónica:* la proporción óptima de Transfectam® (DOGS) a DNA plásmido y la concentración iónica de NaCl utilizada constituyan una modificación de los valores reportados previamente (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217: 1799-1801, 1993) y se determinaron de acuerdo con lo siguiente: a partir de la solución stock original de 1 mg/0,400 ml (2,38 mg/ml) de Transfectam® preparado en etanol al 10% (volumen/volumen) en agua destilada, se requirieron 6 veces el volumen (µl) de solución stock para cada µg de DNA utilizado. La concentración iónica óptima de la solución fue proporcionada por medio de un volumen adecuado de NaCl 150 mM, determinado por medio de la relación:

$$\text{Volumen (µl) de NaCl} = \text{volumen (µl) Transfectam}/0,6$$

35 Los resultados de niveles SEAP inducidos por Tat en el ensayo estándar, después de la optimización de estas condiciones, se ilustran en la Figura 2. Brevemente, las células COS fueron mantenidas en Medio Dulbecco Modificado por Isocobe (IMDM), suplementado con suero fetal de ternera (FCS) al 10% y antibióticos. Muestras de células por triplicado fueron sembradas, a una densidad de aproximadamente $1,5 \times 10^5$ células por pocillo, en pocillos de fondo plano Linbro® 24 de 17 mm de diámetro y se incubaron en una incubadora humidificada con 95% de O₂/5% de CO₂, a 37°C, hasta que se alcanzó una confluencia del 50%. Las células subconfluentes fueron transfectadas utilizando el procedimiento de lipospermina (Loeffler and Behr, Methods in Enzymology 217: 599-618, 1993). El medio de las células subconfluentes fue aspirado y sustituido por 300 µl de medio mínimo fresco (IMDM suplementado con FCS al 3%). Las células COS fueron transfectadas con, o bien pBC12/HIV/SEAP en solitario (0,35 µg/pocillo) o pBC12/CMV/t2 (que codifica para la función Tat) a razón de 0,175 µg/pocillo + pBC12/HIV/SEAP (0,35 µg/pocillo) o con tampón en solitario (sin muestras control de DNA). Las placas fueron incubadas durante un período de tiempo de entre 12 y 15 horas, transcurrido el cual, se añadieron 700 µl del medio completo (IMDM que contenía FCS al 10%). Las células fueron después incubadas durante un período de 48 horas, transcurrido el cual, se extrajo una alícuota de 250 µl procedente de los sobrenadantes de cultivo de las células COS y se calentó a 65°C por espacio de 5 minutos, con vistas a inactivar, de forma selectiva, las fosfatases endógenas (la SEAP es estable al calor). Las muestras fueron después centrifugadas en una Microfusa durante un período de 2 minutos. A 100 µl de alícuota de las muestras se les añadieron cien µl de tampón de ensayo 2 x SEAP (dietanolamina 1,0M, pH 9,8; MgCl₂ 0,5M; L-homoarginina 10mM). La solución fue mezclada y transfectada en un plato de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Corning). Veinte µl de solución sustrato precalentada (p-nitrofenilfosfato 120 mM disuelto en tampón de ensayo 1 x SEAP) fueron administrados con una multipipeta en el interior de cada uno de los pocillos que contenían la mezcla de reacción. La A₄₀₅ de la reacción fue leída a intervalos de 5 minutos a 37°C, durante 60 minutos, utilizando un lector de microplaca EL340i (Bio-tek Instruments, Inc.), con intervalos de agitación automática de 5 segundos antes de cada lectura. El cambio en la absorbancia fue convertido en mU de expresión de SEAP, tal y como se ha descrito anteriormente (Berger *et al.*, Gene 66: 1-10, 1998), dibujándose la gráfica el función del tiempo.

40 Estos resultados indican un incremento próximo a 65 veces en inducción SEAP, después de 1 hora, en relación con los niveles control (sin DNA) o con la inducción de gen no seleccionado (HIV/SEAP) en solitario.

45 *Aislamiento guiado por ensayo de componente(s) activos de chaparral, por medio de cromatografía a contracorriente:* Tal y como se ha manifestado anteriormente, el fraccionamiento diferencial y la purificación por medio de cromatografía a contracorriente (CCC) de los constituyentes del extracto de chaparral condujeron al aislamiento de dos componentes importantes (Tabla 1). 6,8 mg del componente denominado Gr fueron aislados a partir de la fracción Verde sobre SiO₂TLC. El rendimiento porcentual total fue de aproximadamente el 0,051%, en base al polvo de planta original. 9,3 mg del componente Lo fueron aislados a partir de la fracción amarilla (Ye).

Inhibición de la actividad Tat-TRS por medio de extractos procedentes de hojas y flores de chaparral: En diversos extractos de planta comprobados con el ensayo SEAP, tan solo el extracto procedente de chaparral, *Larrea tridentata*, hojas y flores, mostraba actividad inhibidora significativa de la proteína HIV Tat. El chaparral mostraba una inhibición dosis-respuesta de la expresión de SEAP, tal y como se ilustra en la Figura 3. Brevemente, muestras por triplicado de 5 células COS fueron transfectadas con una mezcla de pBC12/HIV/SEAP y pBC12/CMV/t2 (que codifica para la función Tat) en una proporción 2:1, utilizando el procedimiento de lipospermina, tal y como se ha descrito anteriormente. Despues de la transfección, las células fueron incubadas durante un periodo de entre 12 y 15 horas. Se preparó una 10 solución de extracto de chaparral (10 mg/ml) en PBS exento de calcio/magnesio y DMSO al 10% y se esterilizó la misma mediante filtro, utilizando un filtro Millex®-GS de 22 μm (Millipore). Las concentraciones adecuadas de extracto 15 de chaparral fueron añadidas a las células transfectadas, a una concentración final en DMSO del 0,2% y las muestras fueron incubadas durante un periodo de 48 horas. Para el análisis SEAP, se extrajo de los sobrenadantes del cultivo de células COS una alícuota de 250 μl , se calentó a 65°C durante un periodo de 5 minutos para inactivar selectivamente las fosfatases endógenas (la SEAP es estable al calor) y se centrifugó en una Microfuga durante 2 minutos. A una 20 alícuota de 100 μl de las muestras se le añadieron 100 μl de tampón de ensayo 2 x SEAP (dietanolamina 1,0M, pH 9,8; MgCl₂ 0,5 mM; L-homoarginina 100 mM). La solución fue mezclada y transferida a un plato de cultivo de fondo plano de 96 pocillos (Corning). Veinte μl de la solución substrato precalentada (p-nitrofenil-fosfato 120 mM, disuelto en tampón de ensayo 1 x SEAP) fueron administrados con una multipipeta en el interior de cada uno de los pocillos que contenían la mezcla de reacción. La A₄₀₅ de la reacción fue leída a intervalos de 5 minutos, a 37°C, durante 60 minutos, utilizando el lector de microplaca EL340i (Bio-tek Instruments, Inc.), con agitaciones de 5 segundos antes 25 de cada lectura. El porcentaje de inhibición de la expresión de SEAP se calculó a los 30 minutos del siguiente modo:

$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(CT^* - C^*) / (CT^* - C^*)] \times 100$$

25 en donde:

C⁻ : muestra control (sin DNA ni fármaco)

30 CT⁻ : muestra control (+DNA, sin fármaco)

C⁺ : muestra tratada con fármaco (sin DNA, + fármaco)

CT⁺ : muestra tratada con fármaco (+DNA, + fármaco)

35 Tal y como se observa en la Figura 3, el inicio de esta inhibición tiene lugar a una concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ y alcanza un máximo de actividad inhibidora a 600 $\mu\text{g/ml}$. La EC₅₀ estimada (la concentración que muestra el 50% de la inhibición) para este material crudo era de 110 $\mu\text{g/ml}$. A medida que avanzaba la purificación de los ingredientes activos, se producía un incremento escalonado en la actividad del(de los), ingrediente(s) activo(s), el cual resultaba ser el triple (68) con la fase orgánica (OG) comparada con el 21% obtenido con el extracto crudo original.

40 *Inhibición de los efectos citopáticos de HIV:* un compuesto que inhibe la transactivación Tat debería, en principio, bloquear la replicación HIV. Por consiguiente, el extracto de chaparral fue objeto de comprobación en el National Center Institute (NCI), con vistas a determinar los efectos citopáticos de HIV-1, utilizando en ensayo de formazán soluble (Weislow *et al.*, JNCI 81: 577-586, 1989). En principio, las células CEM-SS (ATCC, Rockville, MD) son co-cultivadas con células H9 productoras de HIV. Los virus infectaron las células CEM-SS huésped, se replicaron y destruyeron la mayor parte de las células CEM-SS en una semana. Si el fármaco inhibe la producción de HIV, las células CEM-SS resultan protegidas de la muerte celular inducida por HIV. El reactivo tetrazolio (XTT) resulta por tanto metabólicamente reducido a través de las células viables, para generar un producto formazán coloreado que resulta medible por medio de colorimetría a 450 nm.

50 En la práctica, muestras por triplicado de células CEM-SS (5.000) fueron colocadas en placas de microvaloración de 96 pocillos. En un volumen final de 100 μl de PBS exento de calcio/magnesio en DMSO al 5% se añadieron concentraciones adecuadas de los compuestos de prueba. Las muestras control tan solo recibieron el medio del compuesto (PBS). Cinco minutos mas tarde, 500 células H9 productoras de HIV-1 altamente infecciosas fueron añadidas a los 55 pocillos que contenían las concentraciones apropiadas de fármaco. Las placas de microvaloración fueron incubadas a 37°C en 95% de O₂/5% de CO₂, durante un periodo de 6 días, despues del cual se añadió una mezcla de 50 μl de XTT y de metasulfato de N-metilfenazonio (PMS). Las placas fueron reincubadas durante un periodo adicional de 4 horas, para el desarrollo del color (Producción de formazán XTT). Las placas fueron selladas, sus contenidos mezclados mediante agitación automática y la OD₄₅₀ de las muestras determinada en un lector de microplaca. Cada 60 uno de los valores representa el promedio de 3 determinaciones. No se encontró ninguna diferencia significativa entre los promedios de los valores duplicados de las células no infectadas y las células afectadas por HIV, en presencia de compuestos de prueba. Por el contrario, se generaba una gran diferencia ($p < 0,05$) entre las muestras afectadas por el HIV, en presencia o ausencia de compuestos de prueba.

65 Los resultados de estos estudios se resumen en la Tabla 2. A una concentración de 0,75 $\mu\text{g/ml}$ para el componente Gr, existía un promedio de protección del 58% (viabilidad celular), frente al HIV, en oposición al 15% de viabilidad en muestras exentas de fármaco, infectadas con el HIV. A una concentración tan baja como 0,187 $\mu\text{g/ml}$, el componente Lo mostraba incluso una actividad inhibidora más potente de los efectos citopáticos del HIV. La viabilidad celular

ES 2 312 168 T3

era del 87%, muy próxima a la de las células control no tratadas (89%), en contraste con la viabilidad del 14% para las muestras exentas de fármaco infectadas con HIV. Estos compuestos estaban desprovistos de citotoxicidad a las concentraciones utilizadas.

5

TABLA 2

Inhibición de los efectos citopáticos de HIV-1 mediante compuestos de extracto de chaparral en el ensayo de formazan soluble

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Porcentaje de células vivas al
6º día, medido mediante la
producción de XXT formazán

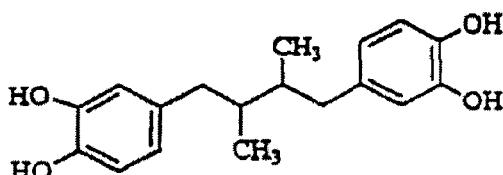
Muestra de prueba	Concentración de la muestra de prueba que generaba la máxima protección frente a HIV, sin destruir las células	No infectada	Infectada s con HIV	Infectada s con HIV
Fracción verde	0,187	59	67	16
Componente Gr- duplicados	0,75	80	67	16
Componente Gr	0,75	70	48	14
Fracción Amarilla	0,187	60	57	14
Componente Lo- duplicados	0,187	91	86	14
Componente Lo	0,187	89	87	14

5 *Elucidación de estructura de los componentes activos del extracto de chaparral:* la caracterización química de los constituyentes activos de la planta purificados fue lograda principalmente por medio de espectroscopía de masas y mediante resonancia magnética nuclear de H- y C- (NMR). Se averiguó que el componente L0 era una mezcla de cuatro compuestos relacionados (L1, L2, L3 y L4). La resolución y caracterización de cada uno de los picos de 10 la mezcla fue lograda por medio de cromatografía gaseosa (GC), utilizando una columna analítica no destructiva, capilarmente reticulada, con fenilmetilsiloxano al 5% (HP-5), unida a un espectrómetro de masas (MS). Los estudios con GC revelaron que el primer compuesto (L1) representaba el 6% de la mezcla, que el segundo (L2) representaba el 76% de la mezcla (peso molecular (MW)= 316); que el tercero (L3) era isómero con L2 y representaba el 9% de la mezcla total (MW=316); y que el cuarto compuesto (L4) representaba el 9% de la mezcla (MW= 358). El tiempo de 15 elución (en minutos) de estos compuestos se indica sobre los picos (Figura 4).

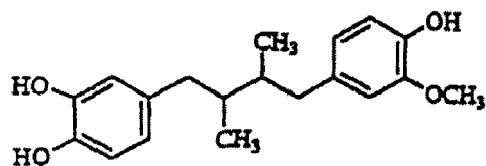
15 El componente Gr comprendía quince compuestos. La resolución y caracterización de cada uno de los picos de la mezcla fue lograda por medio de cromatografía gaseosa (GC), utilizando una columna analítica no destructiva, capilarmente reticulada, con fenilmetilsiloxano al 5% (HP-5), unida a un espectrómetro de masas (MS). Los estudios 20 revelaron que cuatro compuestos (G1, G2, G3 y G4) de los quince compuestos eran ligandos y estaban estructuralmente relacionados con los compuestos L. El tiempo de elución (en minutos) de estos compuestos se indica sobre los picos (Figura 5).

25 Las estructuras de estos ocho compuestos (L1, L2, L3, L4, G1, G2, G3 y G4) se describen del siguiente modo:

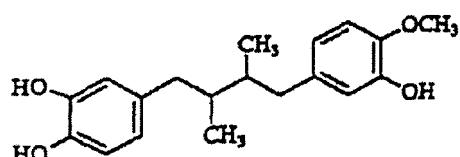
30 L1 presenta la composición $C_{18}H_{22}O_4$ y ha sido identificado como un compuesto químico conocido anteriormente, 1,4-bis-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano (ácido nordihidroguaíarético, NDGA, Merck Index, 10th Edition, #6534). La fórmula estructural de L1 es la siguiente:



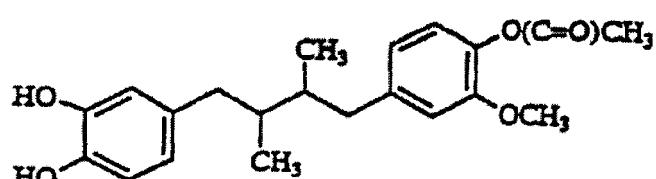
35 L2 presenta la composición $C_{19}H_{24}O_4$ y ha sido identificado como 3-O-metil-NDGA ó 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-2,3-dimetilbutano. La fórmula estructural para el 3-O-metil-NDGA es la siguiente:



45 L3 presenta también la composición $C_{19}H_{24}O_4$ y ha sido identificado como 4-O-metil-NDGA ó 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-2,3-dimetilbutano. El 4-O-metil-NDGA es también conocido como Malachi 4:5-6 ó Mal 4. La fórmula estructural para 4-O-metil-NDGA es la siguiente:



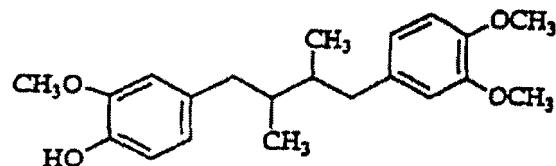
50 L4 presenta la composición $C_{21}H_{26}O_{15}$ y ha sido identificado como 3-O-metil-4-O-acetil-NDGA ó 1-(3,4-dihidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-acetoxifenil)-2,3-dimetilbutano. La fórmula estructural para el 3-O-metil-4-O-acetil-NDGA es 55 la siguiente:



ES 2 312 168 T3

G1 presenta un peso molecular de 344, una composición de $C_{21}H_{22}O_4$ y ha sido identificado como 3,3',4-tri-O-metil-NDGA ó 1-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano. El 3,3',4-tri-O-metil-NDGA tiene la siguiente fórmula estructural:

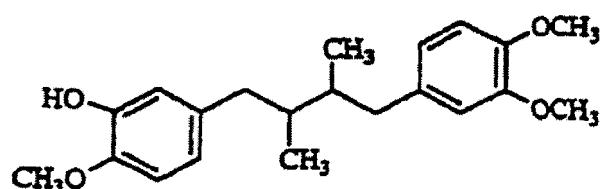
5



15

G2 presenta un peso molecular de 344, una composición de $C_{21}H_{22}O_4$ y ha sido identificado como 3,3',4-tri-O-metil-NDGA ó 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-4-(3,4-dimetoxifenil)-2,3-dimetilbutano. El 3,3',4-tri-O-metil-NDGA tiene la siguiente fórmula estructural:

20



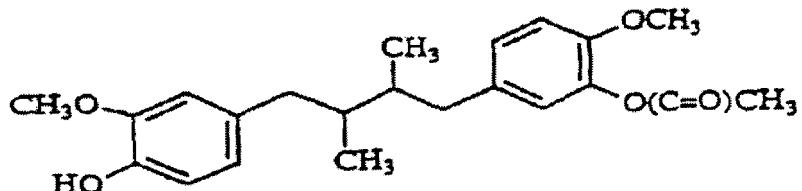
30

G3 y G4 tienen, cada uno de ellos, un peso molecular de 372 y una composición de $C_{22}H_{28}O_5$. G3 es o bien 3',4-di-O-metil-3-O-acetyl-NDGA (como en G3a) ó 3,3'-di-O-metil-4-O-acetyl-NDGA (como en G3b). 3',4-di-O-metil-acetyl-NDGA es también conocido como 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-4-(3-acetoxi-4-metoxifenil)-2,3-dimetilbutano y presenta la siguiente fórmula estructural:

35

G3a :

40



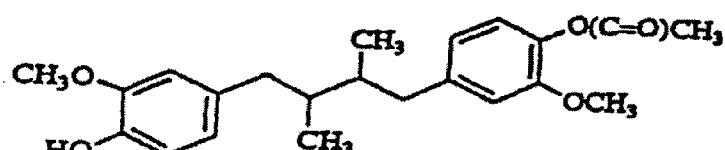
50

El 3,3'-di-O-metil-4-O-acetyl-NDGA es también conocido como 1-(3-metoxi-4-hidroxifenil)-4-(3-metoxi-4-acetoxifenil)-2,3-dimetilbutano y presenta la siguiente fórmula estructural:

55

G3b :

60



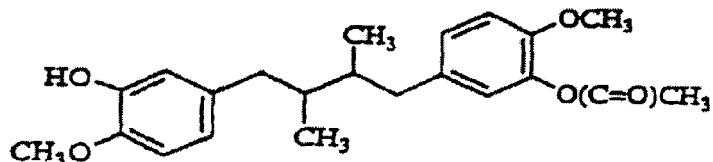
65

De forma similar, G4 es o bien 4,4'-di-O-metil-3-O-acetyl-NDGA (como en G4a) ó 3,4'-di-O-metil-4-O-acetyl-NDGA (como en G4b). El compuesto 4,4'-di-3-O-acetyl-NDGA es también conocido como 1-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(3-acetoxi-4-metoxifenil)-2,3-dimetilbutano, y presenta la siguiente fórmula estructural:

5

G4a :

10



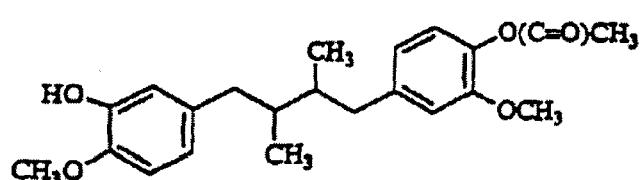
15

El compuesto 3,4'-di-O-metil-4-O-acetyl-NDGA es también conocido como 1-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-4-(3-metoxi-4-acetoxifenil)-2,3-dimetilbutano y presenta la siguiente fórmula estructural:

20

G4b :

25



30

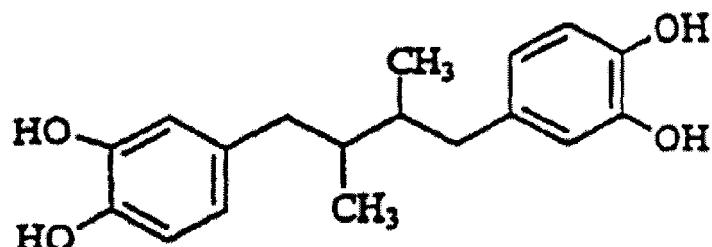
Además de los procedimientos de aislamiento y purificación descritos anteriormente, cada uno de los derivados de NDGA descritos anteriormente puede ser preparado a través de síntesis química siguiendo, o bien un proceso de metilación y/o de acetilación de NDGA, según el procedimiento de Ikeya *et al.*, Chem. Pharm. Bull. 27(7): 1583-1588, 1979.

Purificación a gran escala del componente Lo y de los dos compuestos puros (L2 y L3), procedentes del componente Lo: Con vistas a generar una cantidad mas elevada del componente Lo, se llevó a cabo un fraccionamiento a gran escala con CCC de un lote de materiales de planta. Un total de 110 gramos de polvo de planta fueron tratados con 700 ml de hexano, 5 veces. Los materiales solubles en hexano (1,17 g) fueron descartados.

El material insoluble en hexano (fracción HI) fue secado y extraído 3 veces, a través de maceraciones sucesivas con 800 ml de cloroformo: metanol. Esto proporcionó 20 g de extracto total (Tex), el cual fue combinado con 7,6 g de la fracción HI obtenida a partir de una extracción diferencial de lote previa. Un total de 27,6 g de materiales de planta crudos generados de este modo fueron divididos en dos lotes de 10 g y 17,6 g. Estos lotes fueron gestionados inicialmente por separado en la CPC de eje cruzado versátil de gran capacidad (Shinomiya *et al.*, Chromatogr. 644: 215-229, 1993), utilizando el sistema disolvente hexano:EtOAc:MeOH:NaCl al 0,5% en una proporción 6:4:5:5, con la fase superior (capa orgánica) como fase móvil. Las fracciones fueron agrupadas exclusivamente en función de sus patrones de TLC y se identificaron cuatro fracciones importantes a partir de dos operaciones CCC y una denominada fracción Verde (Gr)(1,12 g), fracción Lo (2,87 g), fracción End (1,78 g) y, finalmente, la fase estacionaria SP (20,84). La totalidad de los 2,87 g de la fracción Lo fueron fraccionados de nuevo en la CPC de modelo triplete grande con el sistema hexano:EtOAc:MeOH:H₂O en la proporción 7:3:5:5, utilizando la capa acuosa como fase móvil. Se detectaron 4 fracciones LYI (0,375); LYII (0,113 g); LYIII (0,280 g) y LYIV (2,80 g), según el orden de elución y los patrones TLC. Estas fracciones fueron ensayadas para determinar la actividad Tat-TRS a 10 µg/ml. En base a los resultados de prueba, se seleccionó LYI para una purificación adicional.

Aislamiento de compuestos puros L2 y L3 a partir de la fracción LYI del componente Lo: la fracción LYI menos hidrófoba fue seleccionada para llevar a cabo una purificación adicional, utilizando las condiciones mejoradas mencionadas anteriormente, a saber, CPC triplete y sistema disolvente Hexano:CHCl₃:MeOH:NaCl 10 mM, a una proporción 1:4:4:2. Esto proporcionó la preparación de 148 mg de L3 homogéneo y 109,3 mg de L2 puro, según examen llevado a cabo con NMR y espectroscopía de masas. Las estructuras de L3 (Malachi4:5-6) y L2 han sido descritas anteriormente.

Los compuestos L2 y L3 son derivados de un producto químico identificado previamente, 1,4-bis-(3,4-dihidroxifenil)-2,3-dimetilbutano (ácido nordihidroguaiarético, NDGA, Merck Index, 10th Edition, #6534). La fórmula estructural para el NDGA, que es idéntica a la de L1 descrito anteriormente, es la siguiente:



15 La actividad anti-HIV (la inhibición de la transactivación de HIV regulada por Tat) del NDGA y de sus derivados no era conocida anteriormente. En la Figura 6 se ilustra la comparativa de la actividad de transactivación anti-HIV para el NDGA y para el derivado Malachi4:5-6 (Mal 4). Brevemente, muestras por duplicado de células COS subconfluentes fueron co-transfectadas con pBC12/HIV/SEAP plásmido y pBC12/CMB/t2 (que codifica para la función Tat), utilizando el procedimiento lipospermina, tal y como se ha descrito anteriormente. Las células fueron posteriormente incubadas durante un período de entre 12 y 15 horas. Los compuestos de prueba fueron inicialmente solubilizados en DMSO al 10%/PBS exento de calcio-magnesio y añadidos a las células transfectadas en las concentraciones adecuadas, hasta alcanzar una concentración final de DMSO del 0,2%. Las muestras fueron incubadas durante 48 horas, transcurridas las cuales se extrajo una alícuota de 250 μ l procedente de los sobrenadantes del cultivo celular COS, y se analizó la SEAP del mismo modo que en el ensayo estándar de la Figura 3. El porcentaje de inhibición de la expresión SEAP se calculó a los 30 minutos de acuerdo con la siguiente fórmula:

20

25
$$\% \text{ inhibición} = 100 - [(CT^* - C^*) / (CT^* - C^*)] \times 100$$

en donde:

30 C^- : muestra control (sin DNA ni fármaco)

CT⁻ : muestra control (+DNA, sin fármaco)

35 C^+ : muestra tratada con fármaco (sin DNA, + fármaco)

CT⁺ : muestra tratada con fármaco (+DNA, + fármaco)

40 Cada uno de los puntos representa el promedio de dos determinaciones. Ninguna diferencia parecía resultar significativa entre los valores de EC₅₀ de Mal4 y de NDGA, los cuales eran, respectivamente de 8 μ g/ml (25 μ M) y 6 μ g/ml (20 μ M). Los valores EC₅₀ se definen como la concentración inhibidora del compuesto a la cual la transactivación de HIV regulada por Tat es reducida al 50% de la de las células control no tratadas.

45 La inhibición de la transactivación de la actividad promotora de HIV por medio de Mal4 y NDGA fue comparada en la Tabla 3.

TABLA 3

50 *Inhibición de la transactivación de la actividad promotora de HIV por medio de los compuestos naturales mal 4 y NDGA*

55	Comuesto de prueba	Inhibición de la expresión Seap inducida por Tat (% de inhibición/concentración del compuesto de prueba)							
		%	μ M	%	μ M	%	μ M	%	μ M
60	Mal 4	13,6	9,5	60,4	31,3	92	62,7	100	95
	NDGA	17,0	9,9	73,8	32,6	88,1	65,2	92,9	99

65 Los compuestos NDGA y Mal 4 fueron sometidos a ensayo, tal y como se describe en la Figura 6. Las muestras control fueron gestionadas por cuadriplicado. El porcentaje de inhibición se determinó transcurridos 30 minutos y los valores OD₄₀₅ eran:

C : muestra control (sin DNA ni fármaco): 0,091

CT : muestra control (+ DNA, sin fármaco): 0,0805.

5 La cuantificación de la producción de formazán XTT como medida de las células viables en cultivos de células CEM-SS tratados con Mal 4 se muestra en la Figura 7. Cada una de las figuras muestra células objetivo CEM-SS infectadas o no infectadas (10^4 /M pocillo) con diluciones en serie de Mal 4. La EC_{50} representa la concentración de Mal 4 (por ejemplo, 13,4 μ M) que incrementa (protege) la producción de formazán XTT en cultivo infectado hasta el 50% del correspondiente al de células en cultivo no tratado, no infectado. La IC_{50} representa la concentración 10 inhibidora o tóxica de Mal 4 (por ejemplo, 325 μ M, estimada) que reduce la producción de formazán XTT en cultivos no infectados hasta el 50% de la misma en células control no infectadas, no tratadas. El ensayo de formazán soluble para determinar los efectos citopáticos de HIV-1 fue llevado a cabo según el procedimiento descrito por parte de Weislow *et al.*, JNCI 81: 577-586, 1989.

15 Debe darse por entendido que pueden efectuarse modificaciones en los derivados de NDGA y en el procedimiento de supresión de la transactivación por Tat, sin apartarse de los aspectos novedosos de esta invención, tal y como se define en las reivindicaciones.

20 **Referencias citadas en la descripción**

Esta lista de referencias citada por el solicitante se proporciona tan solo para la conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha puesto gran esmero en la compilación de las referencias, no puede descartarse la existencia de errores u omisiones y la EPO no admite responsabilidad alguna en 25 este sentido.

Literatura no patente citada en la descripción

- HSU *et al.*, *Science*, 1991, vol. 254, 1799-1802 [0004]
- SIM Ann. N.Y. Acad. Sci., 1990, vol. 616, 64-70 [0005]
- BERGER *et al.*, *Gene* 1988, vol. 66, 1-10 [0005][0025][0029]
- WEISLOW *et al.*, *JNCI*, 1989, vol 81, 577-586 [0006][0034][0058]
- ITO, CONWAY. CRC Critical Reviews of Analytical Chemistry, 1986, vol. 17,65 [0020][0021]
- CULLEN. *Cell*, 1986, vol. 46, 973-982 [0022]
- LOEFFLER; BEHR. *Methods in Enzymology*, 1993, vol. 217, 599-618 [0022][0027][0028][0029]
- BARTHEL *et al.*, *DNA and Cell Biology*, 1993, vol. 12 (6), 553-560 [0028]
- LOEFFLER; BEHR. *Methods in Enzymology*, 1993, vol. 217, 1799-1802 [0028]
- IKEYA *et al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1979, vol. 27 (7), 1583-1588 [0050]
- SHINOMIYA *et al* *J. Chromatogr.* 1993, vol. 644, 215-229 [0051]

50

55

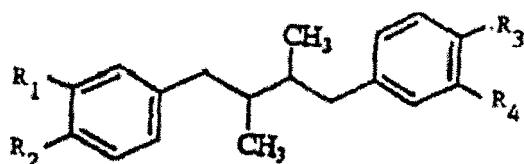
60

65

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento *in vitro* para la supresión de la transactivación por Tat de un lentivirus en una célula, que comprende los pasos de:

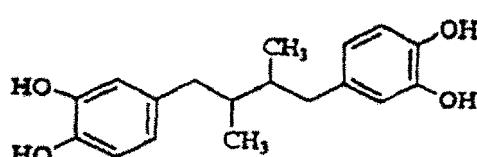
5 a) administración a la célula un compuesto de la siguiente fórmula estructural:



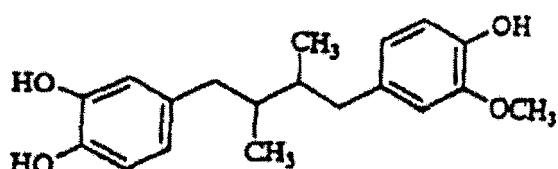
en la que R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno de ellos, seleccionados de entre el grupo que comprende HO-, CH₃O- y CH₃(C=O)O-;

20 b) permitir que el compuesto suprima la transactivación por Tat del lentivirus en la célula.

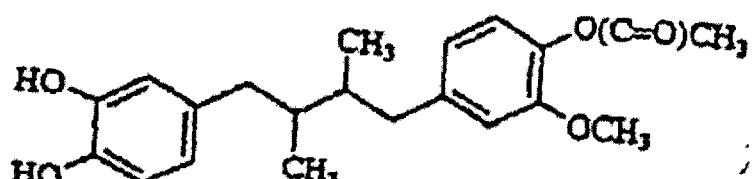
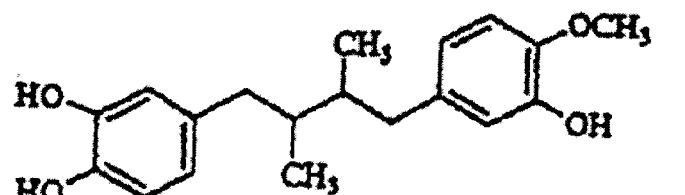
25 2. Procedimiento de la reivindicación 1, en donde cada uno de R₁, R₂, R₃ y R₄ es HO- y el compuesto tiene la siguiente fórmula estructural

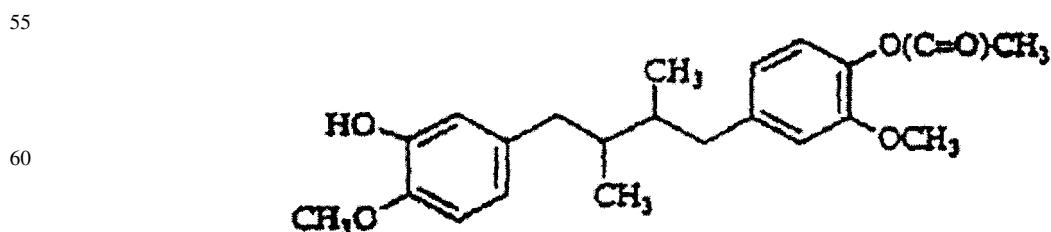
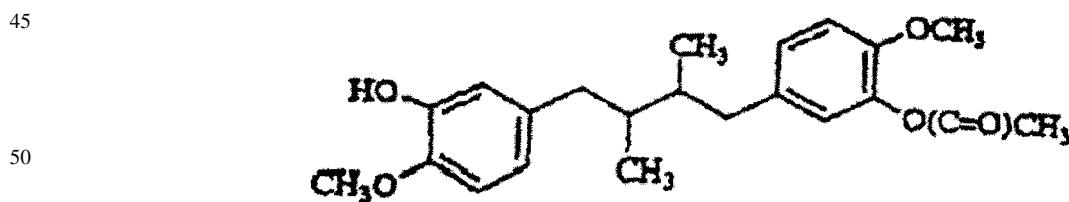
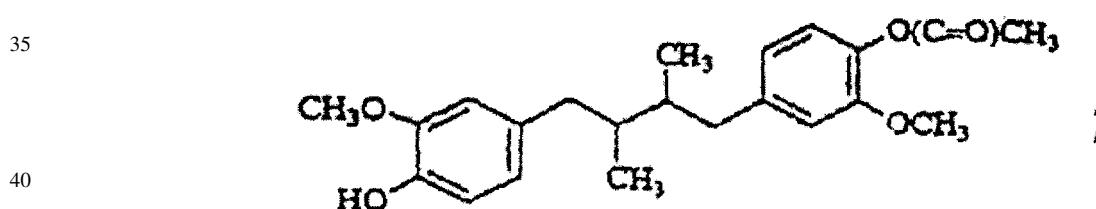
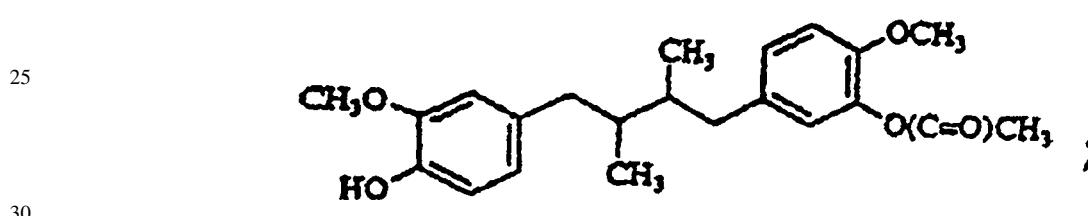
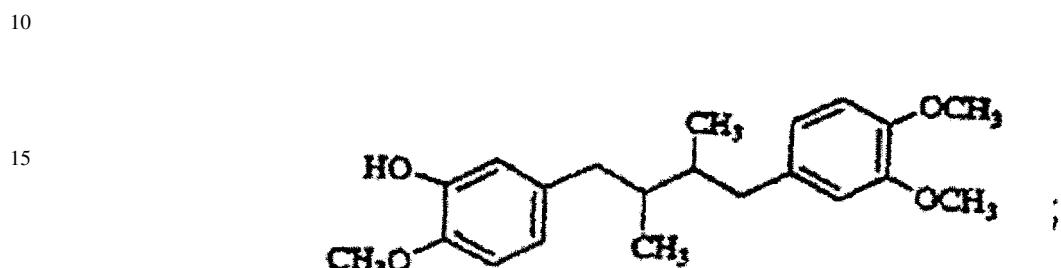
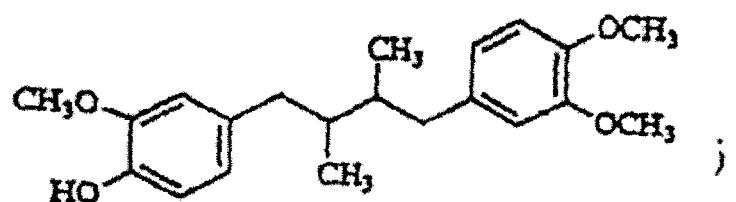


35 3. Procedimiento de la reivindicación 1, en donde cada uno de R₁, R₂ y R₃ es HO- y R₄ es CH₃O- y el compuesto tiene la siguiente fórmula estructural:

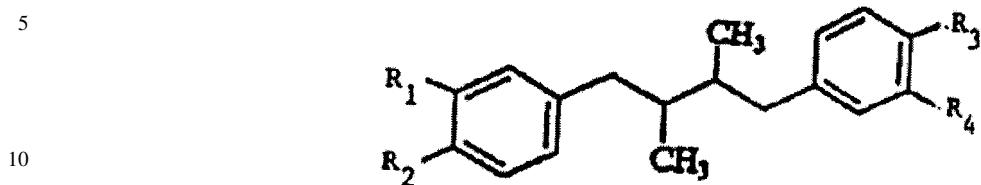


45 4. Procedimiento de la reivindicación 1, en donde el compuesto es seleccionado de entre:



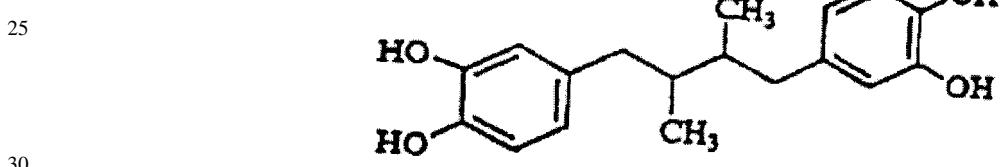


5. Uso de un compuesto de la siguiente fórmula estructural:

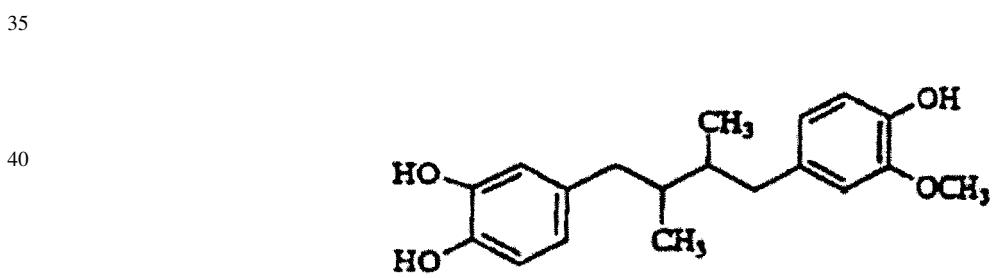


15 en donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno de ellos, seleccionados de entre el grupo que comprende HO-, CH₃O- y CH₃(C=O)O-, en la preparación de un medicamento para la supresión de la transactivación por Tat en una célula.

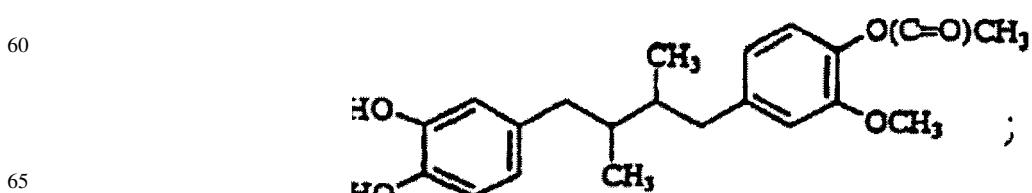
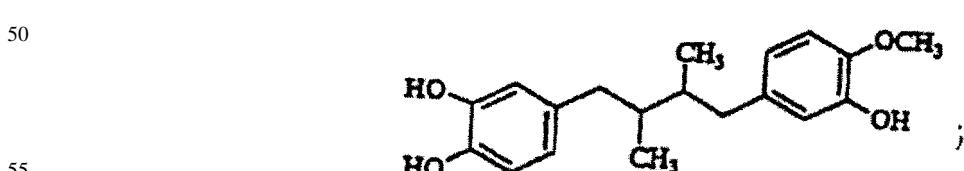
6. Uso de la reivindicación 5, en donde cada uno de R₁, R₂, R₃ y R₄ es HO- y el compuesto tiene la siguiente fórmula estructural:

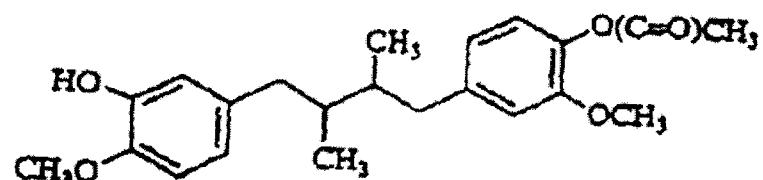
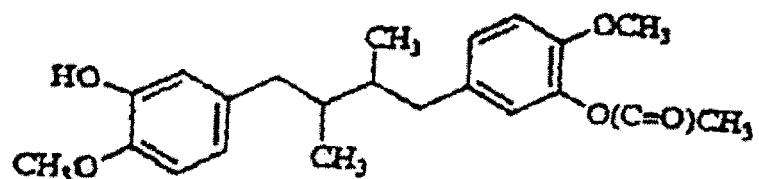
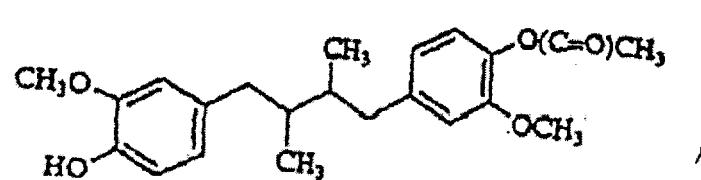
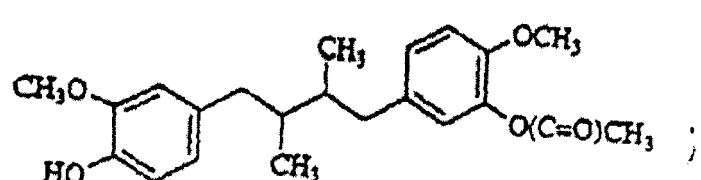
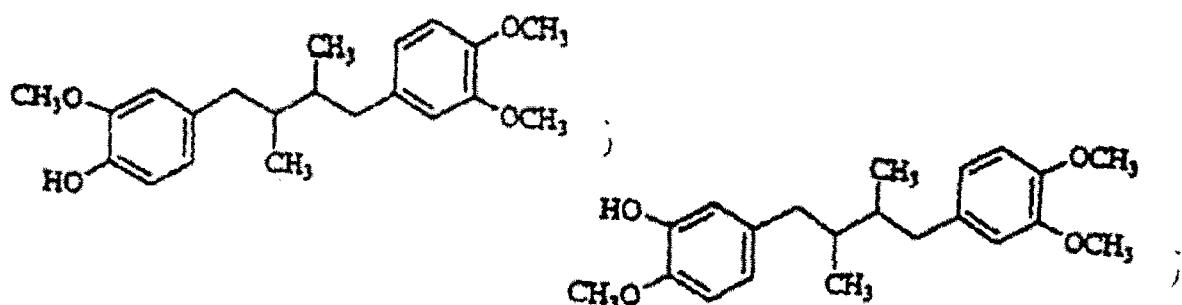


7. Uso de la reivindicación 5, en donde cada uno de R₁, R₂, y R₃ es HO- y R₄ es CH₃O- y el compuesto tiene la siguiente fórmula estructural:

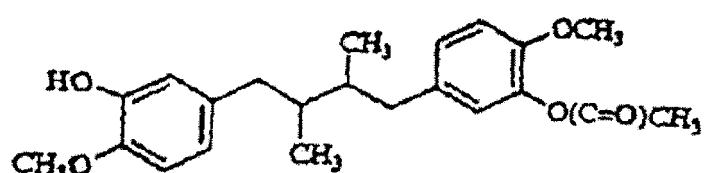


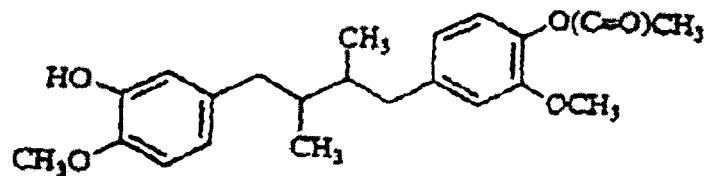
8. Uso de la reivindicación 5, en donde el compuesto es seleccionado de entre:





9. Procedimiento para la producción de una preparación que comprende un compuesto de la siguiente fórmula estructural:





10 en donde R₁, R₂, R₃ y R₄ son, cada uno de ellos, seleccionados de entre el grupo que comprende HO-, CH₃O- y CH₃(C=O)O-, que comprende los pasos de:

15 a) proporcionar hojas de chaparral que han sido secadas y reducidas a polvo;
 b) extraer el polvo con una mezcla de cloroformo y metanol para formar un extracto; y
 c) tratar el extracto con hexano para producir materiales insolubles en hexano;

20 en donde los materiales insolubles en hexano contienen un compuesto de la fórmula indicada anteriormente.

25 10. Procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además los pasos de someter los materiales insolubles en hexano a través de cromatografía a contracorriente y recuperar una fracción amarilla que contiene un compuesto tal y como se define en la reivindicación 9.

11. Procedimiento de la reivindicación 9, que comprende además el paso de fraccionar los materiales insolubles en hexano con una partición cloroformo orgánico:agua acuosa, para producir una fase cloroformo orgánica que contiene un compuesto tal y como se define en la reivindicación 9.

30 12. Procedimiento de la reivindicación 11, que comprende además el paso de fraccionar la fase orgánica que contiene un compuesto como se ha definido en la reivindicación 9, por medio de cromatografía de partición líquido-líquido a contracorriente y recuperación de una fracción amarilla que contiene un compuesto como se ha definido en la reivindicación 9.

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

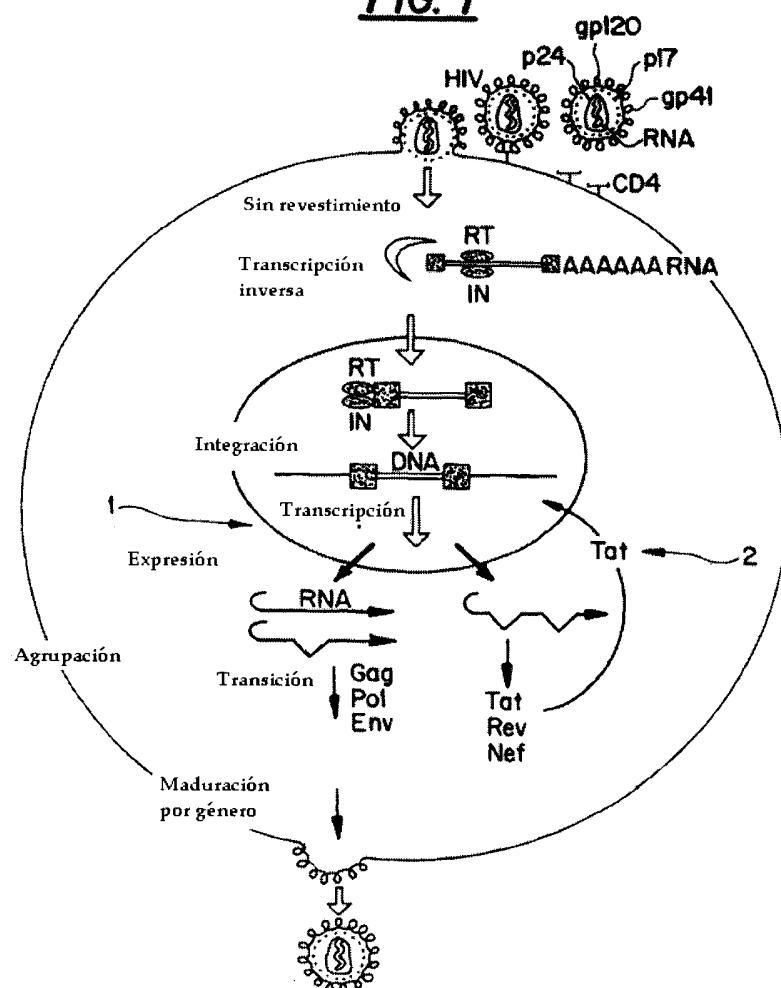


FIG. 2

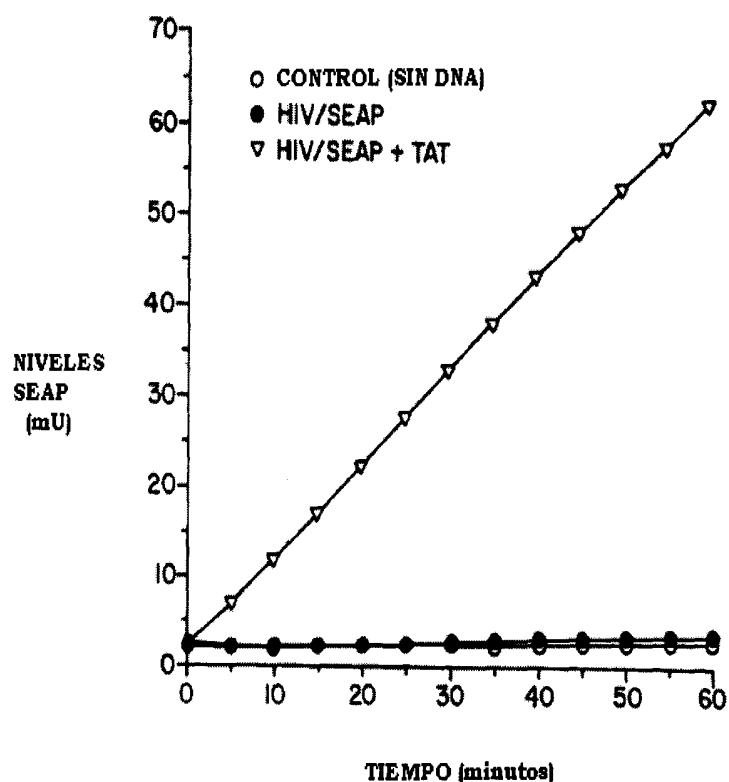


FIG. 3

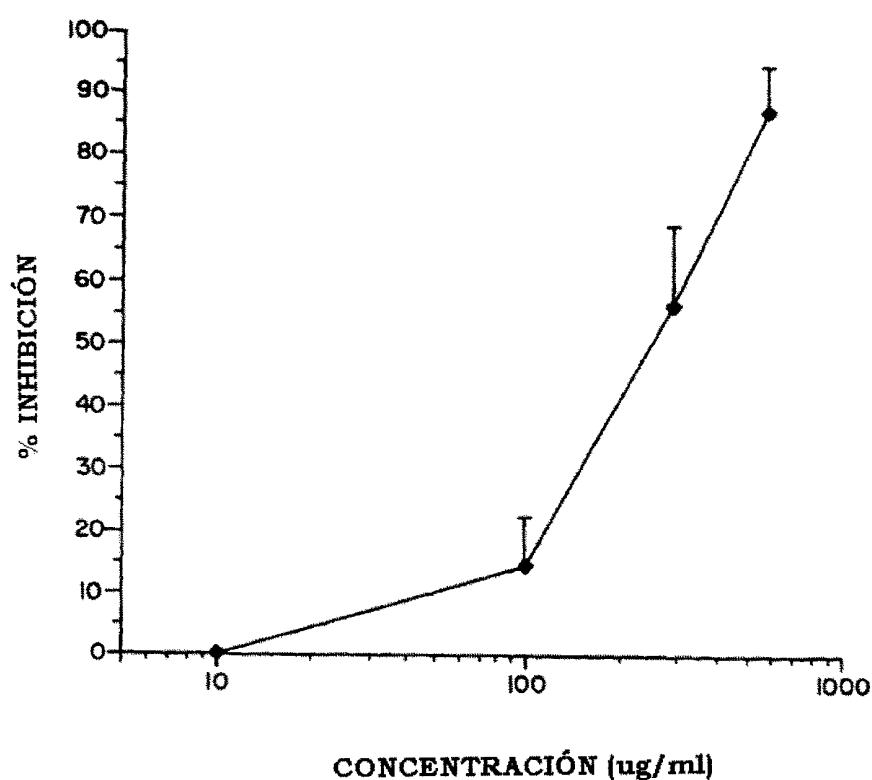


FIG. 4

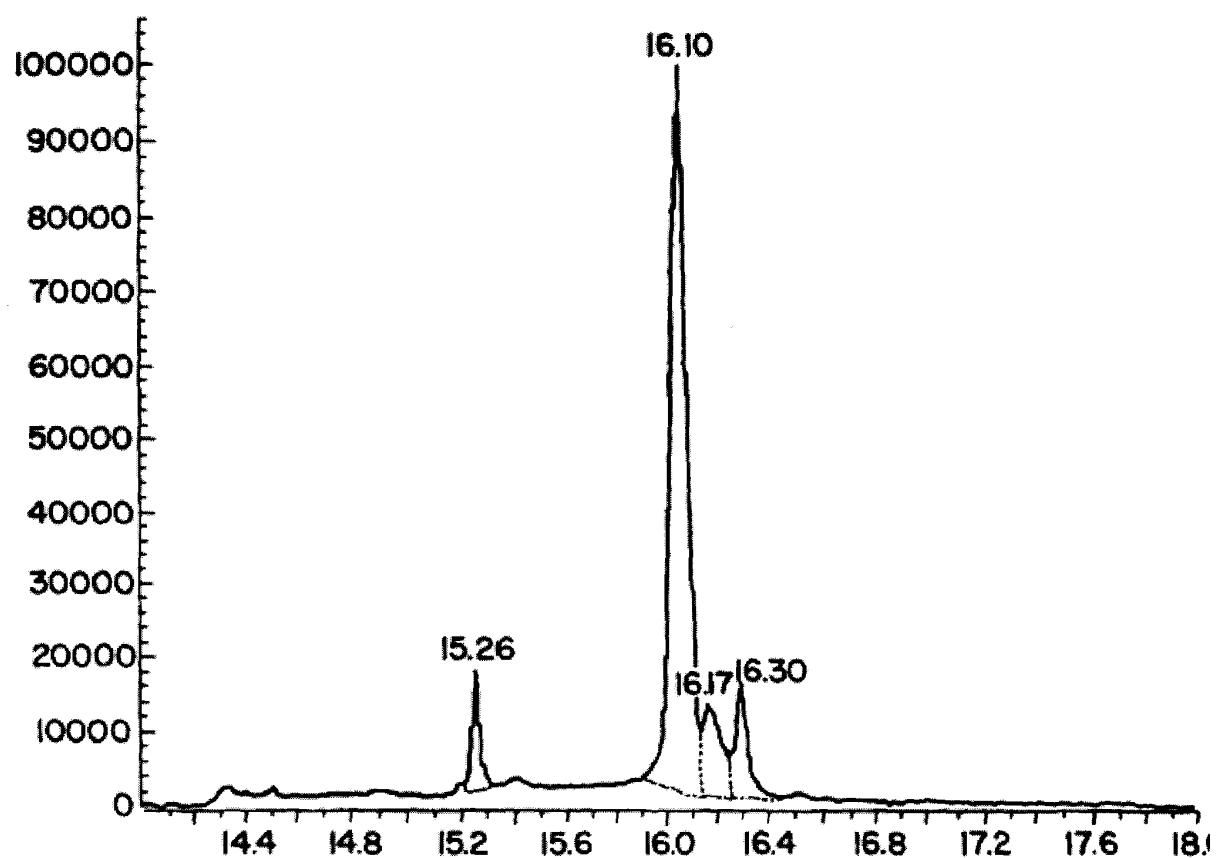


FIG. 5

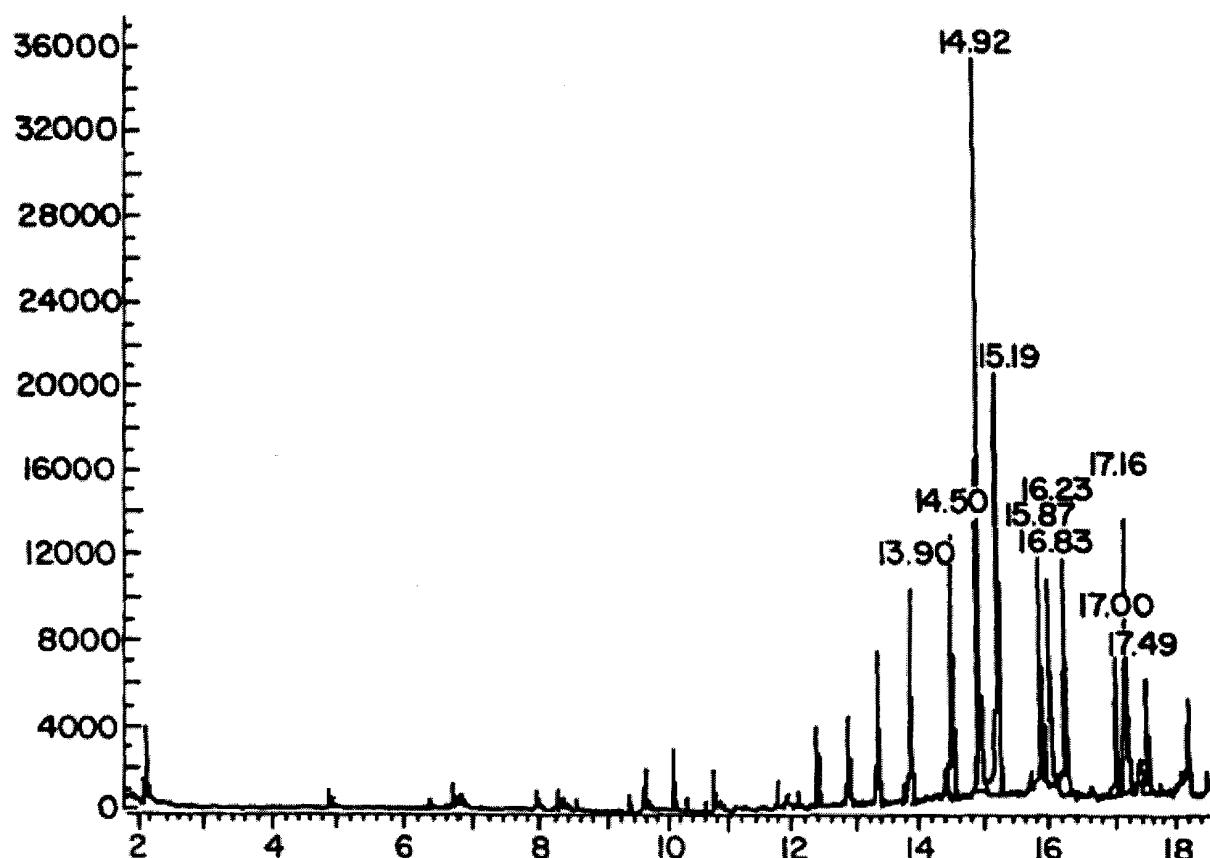


FIG. 6

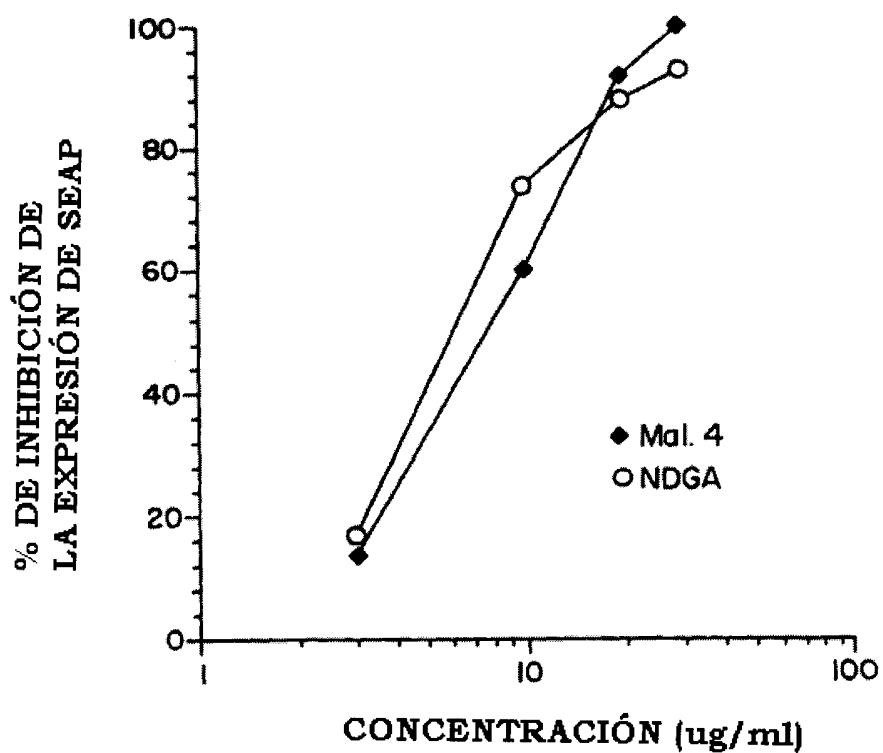


FIG. 7

