

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 019**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 39/42** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.07.2006 E 06788240 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2013 EP 1910573**

54 Título: **Procedimientos para reducir la carga viral en pacientes infectados por el VIH-1**

30 Prioridad:

**23.07.2005 US 701889 P**

**22.07.2005 US 702064 P**

**26.08.2005 US 711528 P**

**09.09.2005 US 715619 P**

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

**15.01.2014**

73 Titular/es:

**CYTODYN, INC. (100.0%)  
5 Centerpointe Drive, Suite 400  
Lake Oswego, OR 97035, US**

72 Inventor/es:

**OLSON, WILLIAM C.;  
MADDON, PAUL J.;  
PEVEAR, DANIEL C.;  
ISRAEL, ROBERT J. y  
MURGA, JOSE D.**

74 Agente/Representante:

**RUO, Alessandro**

**ES 2 438 019 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

Procedimientos para reducir la carga viral en pacientes infectados por el VIH-1

5 **[0001]** La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/702.064 presentada el 22 de julio de 2005; la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/701.889 presentada el 23 de julio de 2005; la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/711.528 presentada el 26 de agosto de 2005; y la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/715.619 presentada el 9 de septiembre de 2005.

10 **[0002]** La presente invención se hizo con la financiación de la subvención del gobierno de los Estados Unidos nº A1046871 y A1066329 del Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas. Por consiguiente, el gobierno de los Estados Unidos tiene ciertos derechos en la invención objeto.

15 **[0003]** En toda la presente solicitud, diversas publicaciones se denominan entre paréntesis por nombre de autor y fecha, o por una patente o número de publicación de patente. Las citaciones completas para estas publicaciones pueden encontrarse al final de la memoria descriptiva inmediatamente precediendo a las reivindicaciones. Estas publicaciones se citan en la presente solicitud con el fin de describir más completamente el estado de la materia como se conoce para aquellos expertos a este respecto a partir de la fecha de la presente solicitud.

20 **Antecedentes de la invención**

**[0004]** La infección de células por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) está mediada por las glucoproteínas de la envuelta (Env) viral gp120 y gp41, que se expresan como complejo oligomérico no covalente sobre la superficie del virus y células viralmente infectadas. La entrada del virus en células diana avanza mediante una cascada de eventos en la superficie celular que incluyen (1) unión de la glucoproteína de la superficie viral gp120 a un receptor de la superficie celular, (2) unión de Env a co-receptores de fusión, y (3) múltiples cambios conformacionales en gp41.

30 **[0005]** La primera interacción de alta afinidad entre el virión y la superficie celular es la unión de gp120 a CD4 de la superficie celular, que es el receptor primario para el VIH-1 (Dalglish y col., 1984; Klatzmann y col., 1984; Maddon y col., 1986; McDougal y col., 1986). La unión induce cambios conformacionales en gp120, que permiten que interactúe con uno de varios receptores de quimiocinas (Berger, 1997; Bieniasz y col., 1998; Dragic y col., 1997; Littman, 1998). El receptor de quimiocinas CC 5 (CCR5) es el principal co-receptor para cepas trópicas para macrófagos (R5), y desempeña una función crucial en la transmisión del VIH-1 (Berger, 1997; Bieniasz y col., 1998; Dragic y col., 1997; Littman, 1998). Los virus trópicos para la línea de linfocitos T (X4) usan CXCR4 para entrar en células diana, y normalmente, pero no siempre, emergen tarde en la progresión de la enfermedad o como consecuencia de la propagación del virus en cultivo de tejido. Algunas cepas aisladas del VIH-1 primarias son trópicas duales (R5X4) ya que pueden usar ambos co-receptores, aunque no siempre con la misma eficiencia (Connor y col., 1997; Simmons y col., 1996). La unión de gp120 a un receptor de quimiocinas desencadena a su vez cambios conformacionales en la glucoproteína transmembrana viral gp41, que media en la fusión de las membranas virales y celulares.

45 **[0006]** Cada etapa de este procedimiento de múltiples etapas puede bloquearse con inhibidores de la proteína viral o celular apropiada, y los inhibidores de gp120, gp41, CD4 y co-receptor se conocen conjuntamente como inhibidores de la entrada. Los inhibidores de la entrada representan al menos 4 clases distintas de agentes basándose en sus dianas moleculares y determinantes de resistencia viral (Olson y Maddon, 2003). La Tabla 1 enumera inhibidores de la entrada del VIH-1 conocidos por estar en desarrollo clínico o autorizados para uso clínico.

50 **[0007]** PRO 542 es una proteína de fusión CD4-IgG2 de tercera generación tetravalente que comprende los dominios D1D2 de CD4 genéticamente fusionados con las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de IgG2 humana (Allaway y col., 1995; Zhu y col., 2001). Este agente se une a la glucoproteína de la envuelta del VIH-1 gp120 con afinidad nanomolar y puede inhibir la unión al virus tanto por bloqueo de receptores como por el desprendimiento de gp120 de la superficie del virión, inactivando así irreversiblemente el virus.

55 **Tabla 1. Inhibidores de la entrada del VIH-1**

Compuesto	Clase molecular	Diana	Fase de entrada	Desarrollador
PRO542	Proteína de fusión CD4-Ig	gp120	Unión	Progenics
BMS-488043	Molécula pequeña	gp120	Unión	Bristol-Myers Squibb
TNX-355	Anticuerpo humanizado	CD4	Post-Unión	Tanox
PRO 140	Anticuerpo humanizado	CCR5	Co-receptor	Progenics
CCR5mAb004	Anticuerpo humano	CCR5	Co-receptor	Human Genome Sciences
SCH-D (vicriviroc)	Molécula pequeña	CCR5	Co-receptor	Schering-Plough

Compuesto	Clase molecular	Diana	Fase de entrada	Desarrollador
UK-427.857 (maraviroc)	Molécula pequeña	CCR5	Co-receptor	Pfizer
GW873140	Molécula pequeña	CCR5	Co-receptor	GlaxoSmithKline
TAK-652	Molécula pequeña	CCR5	Co-receptor	Takeda
AMD070	Molécula pequeña	CXCR4	Co-receptor	AnorMed
T-20 (enfuvirtida)	Péptido	gp41	Fusión de gp41	Trimeris/Roche

**[0008]** BMS-488043 es un análogo optimizado de BMS-378806 (véanse las publicaciones internacionales PCT nº WO 01/62255 A1 y WO 03/082289 A1), que se ha informado de diversas maneras que bloquea la unión de gp120 a CD4 (Lin y col., 2002; 2003) y eventos post-unión (Si y col., 2004).

**[0009]** TNX-355 es una versión de IgG4 humanizada del anticuerpo monoclonal anti-CD4 (mAb) 5A8 que bloquea los eventos de fusión que producen la post-unión de gp120 a CD4 (Burkly y col., 1992; Moore y col., 1992).

**[0010]** PRO 140, un mAb anti-CCR5 humanizado, y los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, SCH-D (también se designa ahora SCH 417670 o vicriviroc), UK-427.857 (también designado maraviroc) y GW873140, se tratan más adelante. El documento WO03/072766 desvela que tanto dosis únicas como múltiples dosis de PRO 140 reducen las cargas virales a niveles indetectables en ratones CD-17 SCID reconstituidos con CMSP humanas normales e infectados por el VIH-1 y que las reducciones oscilaron hasta  $1,8\log_{10}$ . Este documento también desvela el uso de PRO 140 para tratar seres humanos aquejados con el VIH-1.

**[0011]** CCR5mAb004 es un mAb completamente humano, generado usando la tecnología Abgenix XenoMouse®, que reconoce y se une específicamente a CCR5 (Roschke y col., 2004). Se ha informado que CCR5mAb004 inhibe la entrada dependiente de CCR5 del virus del VIH-1 en células humanas, y recientemente ha entrado en ensayos clínicos de fase 1 (HGS Press Release, 2005).

**[0012]** El primer antagonista anti-CCR5 de molécula pequeña identificado como que puede inhibir la infección por el VIH-1 fue TAK-779 (Baba y col., 1999). Sin embargo, TAK-779 presentó escasa biodisponibilidad oral (Baba y col., 2005) e irritación en el sitio de inyección local (Iizawa y col., 2003), y se ha sustituido en el desarrollo clínico por un derivado de TAK-779, TAK-652 (Baba y col., 2005). TAK-652 es un antagonista de CCR5 biodisponible por vía oral con potente actividad anti-VIH-1 en el intervalo nanomolar *in vitro* y prometedores perfiles farmacológicos *in vivo* (Baba y col., 2005).

**[0013]** AMD070 es un inhibidor de CXCR4 de segunda generación; el inhibidor de CXCR4 de primera generación AMD3100 no demostró una ventana de seguridad favorable para terapia contra el VIH-1 (Schols y col., 2002).

**[0014]** Finalmente, T-20 se autorizó para terapia de rescate de infección por el VIH-1 siguiendo perfiles antivirales y seguridades favorables en cada uno de los dos estudios de fase 3 fundamentales (Lalezari y col., 2003; Lazzarin y col., 2003).

#### CCR5 como diana para terapia anti-VIH-1

**[0015]** Como primero se demostró en 1986, el VIH-1 se une a células diana mediante el receptor de CD4, pero requiere factores de células huésped adicionales para mediar en la entrada (Maddon y col., 1986). Durante la siguiente década se propusieron varios co-receptores candidatos, pero ninguno medió reproduciblemente en la entrada viral cuando se coexpresó con CD4 en células de otro modo no permisivas. Sin embargo, en 1996, se mostró que ciertos receptores de quimiocina, principalmente CCR5 y CXCR4, servían de co-receptores de fusión necesarios para el VIH-1.

**[0016]** Cocchi y col. (1995) proporcionaron el primer enlace entre el VIH-1 y quimiocinas, que son pequeñas proteínas solubles homólogas (-8 kDa). Las quimiocinas median en el reclutamiento y la activación de células inmunitarias. Se clasifican como quimiocinas CC, CXC, CX<sub>3</sub>C y XC basándose en el número y relación secuencial de los dos primeros de los cuatro residuos de cisteína conservados; la mayoría son tanto quimiocinas CC como CXC. Se mostró que las quimiocinas CC RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  bloqueaban la replicación de cepas trópicas para macrófagos primarias del VIH-1 (Cocchi y col., 1995). Usando técnicas de clonación de la expresión, Feng y col. (1996) descubrieron que el receptor de quimiocinas fusina (después renombrado CXCR4) era una co-receptor de fusión para cepas del VIH-1 adaptado para crecer sobre líneas de linfocitos T. Poco después, varios grupos informaron de la clonación de CCR5, un receptor de quimiocinas CC con especificidad por RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  (Combadiere y col., 1996; Raport y col., 1996; Samson y col., 1997), y otros demostraron entonces que CCR5 era el cofactor de entrada principal usado por cepas aisladas del VIH-1 trópicas para macrófagos primarias (Alkhatib y col., 1996; Choe y col., 1996; Deng y col., 1996; Doranz y col., 1996; Dragic y col., 1996). Los patrones de expresión de CCR5 y CXCR4 ayudaron a resolver los misterios desde hace tiempos inmemorables referentes al tropismo de

diferentes cepas del VIH-1. Los virus trópicos para macrófagos, trópicos para la línea de linfocitos T y trópicos duales podrían clasificarse más descriptivamente como que son virus R5, X4 y R5X4 basándose en sus capacidades para utilizar CCR5, CXCR4 o ambos receptores, respectivamente, para la entrada.

5 **[0017]** Una variedad de otros receptores de quimiocinas puede servir de co-receptores del VIH-1 cuando se expresan en exceso *in vitro*. La lista incluye CCR8, Apj, V28, US28, CCR2b, CCR3, gpr1, Bonzo (STRL33, TYMSTR) y BOB (gpr15). Claramente, las proteínas que pertenecen a la familia de receptores de quimiocinas tienen propiedades bioquímicas que promueven la fusión de membranas del VIH-1. Sin embargo, la mayoría de los co-receptores anteriormente mencionados no son muy eficaces, normalmente no se co-expresan con CD4 y solo  
10 funcionan con ciertas cepas del VIH-1, VIH-2 o VIS. No se ha establecido la relevancia *in vivo* de estos co-receptores alternativos.

**[0018]** Varios factores hacen de CCR5 una atractiva diana para nuevas terapias antirretrovirales. CCR5 desempeña una función central en la transmisión y patogénesis del VIH-1, y mutaciones que se producen naturalmente en CCR5 confieren protección de la infección por el VIH-1 y progresión de la enfermedad. El polimorfismo de CCR5 más notable implica una delección de 32 pb en la región codificante de CCR5 (A32) (Liu y col., 1996). El alelo de A32 codifica un receptor no funcional que fracasa en alcanzar la superficie celular. Individuos que poseen un gen CCR5 normal y uno mutante expresan menores niveles de CCR5, y sus linfocitos T son menos susceptibles a infección por el virus R5 *in vitro* (Liu y col., 1996; Wu y col., 1997). Los heterocigotos A32 experimentan una evolución más leve de la enfermedad caracterizada por cargas virales reducidas y progresión retrasada al SIDA (Huang y col., 1996; Michael y col., 1997). Estos resultados respaldan el concepto de que reducir la disponibilidad de CCR5 puede reducir la replicación viral y ralentizar la progresión de la enfermedad.

**[0019]** Individuos con dos genes CCR5 mutantes comprenden una fracción significativa de personas de descendencia de Europa del norte; la demografía es sugerente de una pandemia anterior de un patógeno que usa CCR5. Tales individuos representan "inactivaciones" de CCR5 humano porque no expresan una proteína CCR5 funcional. Excepto en casos raros (Balotta y col., 1997; Biti y col., 1997; O'Brien y col., 1997), estos individuos son resistentes a infección por el VIH-1 (Huang y col., 1996; Liu y col., 1996; Michael y col., 1997; Samson y col., 1997), y sus linfocitos T no pueden infectarse con el virus R5 *in vitro* (Liu y col., 1996). Estos hallazgos enfatizan la función central de CCR5 en la transmisión del VIH-1. En realidad, ahora se sabe que los virus R5 median en la transmisión en casi todos los casos y median en la progresión a SIDA en la mayoría de los casos.

**[0020]** Y, lo que es más importante, individuos que carecen de CCR5 disfrutan de salud normal y no muestran defectos inmunológicos obvios u otros defectos. Esto puede reflejar la redundancia de rutas de señalización de quimiocinas y el patrón de expresión bastante limitado de CCR5. La expresión de CCR5 está ampliamente confinada a linfocitos T y macrófagos activados, que representan las dianas primarias para la infección por el VIH-1 *in vivo*, aunque se ha informado de la expresión de CCR5 de bajo nivel en otros tejidos, tales como músculo liso (Schechter y col., 2000).

**[0021]** Se han generado ratones inactivados en CCR5 y proporcionan conocimiento adicional en los efectos de abolir la función de CCR5. Los ratones inactivados en CCR5 se desarrollan normalmente y son ostensiblemente sanos, aunque pueden observarse alteraciones menores en respuestas inmunitarias tras la exposición a patógenos particulares (Huffnagle y col., 1999; Schuh y col., 2002; Tran y col., 2000; Zhou y col., 1998). A diferencia, la inactivación de CXCR4 es un fenotipo mortal en ratones (Lapidot y col., 2001), y no se ha observado en seres humanos.

**[0022]** Tomados conjuntamente, estos análisis genéticos respaldan fuertemente un nuevo enfoque terapéutico basado en CCR5 como diana para fármaco. La naturaleza propensa a error de la transcriptasa inversa genera una inmensa diversidad genética que promueve el desarrollo de cepas aisladas resistentes a fármaco, y la capacidad del VIH-1 para utilizar co-receptores de múltiple fusión proporciona una ruta hacia la resistencia. Se han aislado virus resistentes a fármaco para todos los antirretrovirales comercializados, que sin embargo proporcionan importante beneficio terapéutico cuando se usan en combinaciones apropiadas. Así, a pesar de la posible aparición de virus resistente a fármaco, los agentes que eligen como diana CCR5 pueden servir de nuevo paradigma de tratamiento para infección por el VIH-1.

**[0023]** Aunque la evidente naturaleza no esencial de CCR5 sugiere que los antagonistas de CCR5 pueden ser bien tolerados *in vivo*, se requieren estudios adicionales para determinar aquellos efectos a largo plazo de abolir la función de CCR5 en individuos cuyos sistemas inmunitarios se desarrollaron en su presencia. Tales efectos potencialmente perjudiciales pueden mitigarse por el uso de agentes que se unen a CCR5 e inhiben la unión del VIH-1 a los mismos, pero no alteran la función normal de CCR5. Un agente que demostró tener tales propiedades es el mAb anti-CCR5 humanizado, PRO 140, que bloquea eficazmente la replicación del VIH-1 a concentraciones que no inhiben la actividad fisiológica de CCR5 (Olson y col., 1999). PRO 140 se identificó usando una selección por ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (RET) para actividad anti-VIH. Es potentemente antiviral, teniendo una  $CI_{90}$  de aproximadamente 4  $\mu\text{g/ml}$  (Olson y col., 1999; Trkola y col., 2001) y protege diversos tipos de células diana primarias (Ketas y col., 2003; Olson y Maddon, 2003). La repetida administración de PRO 140

condujo al control prolongado de la replicación del VIH-1 sin escape viral en el modelo de ratón hu-PBL SCID, y PRO 140 está actualmente en ensayos clínicos humanos de fase 1.

**[0024]** Posterior a la identificación de antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, TAK-779 (Baba y col., 1999), se han identificado varios otros antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Cuatro de estos (SCH-C, SCH-D, UK-427.857, GW873140) han completado similarmente estudios de fase 1 diseñados en individuos infectados por el VIH (Reynes y col., 2002; Schurmann y col., 2004; Dorr y col., 2003; Lalezari y col., 2004). Cada uno de estos agentes medió en reducciones medias de  $\sim 1 \log_{10}$  en la dependencia de la dosis en niveles de ARN del VIH-1 durante el periodo de tratamiento de 10-14 días. Como era de esperar, las cargas virales se recuperaron a niveles iniciales tras el cese de la terapia. Los efectos secundarios relacionados con fármacos más comunes fueron neurológicos (cefalea, mareo) y gastrointestinales (náuseas, diarrea, flatulencia), y estos no fueron limitantes de la dosis. Con la excepción de SCH-C (Reyes y col., 2001), ninguno de los agentes anteriormente identificados indujo cambios clínicamente significativos en intervalos de QTc.

**[0025]** También se ha realizado un estudio de una única dosis oral controlado por placebo de doble ciego para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de TAK-652, el compuesto sucesor a TAK-779, en voluntarios masculinos sanos (Baba y col., 2005). La administración única de disolución de TAK-652 fue supuestamente segura y bien tolerada (Baba y col., 2005).

**[0026]** En general, estos estudios proporcionan validación preliminar de CCR5 como diana para terapia contra el VIH-1. Mientras que los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña representan series químicas patentablemente distintas con propiedades farmacocinéticas y metabólicas diferentes, los compuestos comparten muchas propiedades en su inhibición de la función de CCR5, sitio de unión sobre CCR5, perfiles de resistencia y pauta de dosificación. Estas similitudes pueden limitar posiblemente el número de opciones de tratamiento genuinas proporcionadas por antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Además, queda por determinar si hay o no consecuencias inapropiadas del bloqueo crónico de la función de CCR5, y queda por establecer la utilidad de antagonistas de CCR5 de molécula pequeña para terapia para el VIH-1 por demostración de seguridad y eficacia apropiada en estudios clínicos de fase 3.

### Terapéuticos de anticuerpos monoclonales

**[0027]** En los últimos años, los productos de mAb han proporcionado nuevos patrones de cuidado en diversos ámbitos de enfermedad. Actualmente se han autorizado 18 mAb por la Agencia Estadounidense del Medicamento (FDA) para indicaciones que incluyen cáncer, enfermedad autoinmunitaria, rechazo de trasplante e infección viral. En particular, se han autorizado 14 mAb desde 2000. En muchos casos, los mAb proporcionan perfiles de seguridad, eficacia y facilidad de uso que no son igualables por compuestos de molécula pequeña. Ejemplos incluyen Synagis (MedImmune, Inc., Gaithersburg, MD), un mAb humanizado para el virus respiratorio sincitial (RSV), y Rituxan (Genentech, San Francisco, CA), un mAb anti-CD20 que proporciona el tratamiento de referencia para linfoma no Hodgkin.

**[0028]** El mAb anti-CCR5 humanizado, PRO 140, es estructuralmente, funcionalmente y mecanísticamente distinto de los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña y, por tanto, representa una clase única de inhibidores de CCR5. PRO 140 es una versión humanizada del mAb murino, PA14, que se generó contra células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> (Olson y col., 1999). PRO 140 se une a CCR5 expresado sobre la superficie de una célula, e inhibe potentemente la entrada y replicación del VIH-1 a concentraciones que no afectan la actividad del receptor de quimiocinas CCR5 *in vitro* y en el modelo de ratón de hu-PBL-SCID de infección por el VIH-1 (Olson y col., 1999; Trkola y col., 2001). El último hallazgo proporciona un estudio preliminar de eficacia *in vivo* para la terapia anti-VIH-1 PRO 140, y PRO 140 está actualmente sometándose a estudios clínicos de fase 1a.

**[0029]** Importantes diferencias entre PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña se resumen en la Tabla 2. Es evidente de la Tabla 2 que, mientras que los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña en desarrollo comparten muchas propiedades, PRO 140 es claramente distinto de estos inhibidores de molécula pequeña. Las diferencias entre las dos clases de inhibidores de CCR5 revelan que PRO 140 puede ofrecer un perfil de producto fundamentalmente distinto, y de muchas formas complementario, al de los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. De hecho, PRO 140 representa un novedoso enfoque terapéutico para tratar infección por el VIH-1 y podría desempeñar una función importante en la terapia contra el VIH-1 independientemente de si los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña están o no por último lugar clínicamente autorizados.

### Inhibición sinérgica de la infección por el VIH-1 por diferentes clases de inhibidores

**[0030]** La inhibición sinérgica de la entrada del VIH-1 se ha demostrado previamente usando ciertos anticuerpos anti-Env en combinación con otros anticuerpos anti-Env (Thali y col., 1992; Tilley y col., 1992; Laal y col., 1994; Vihj-Warrier y col., 1996; Li y col., 1997; Li y col., 1998), anticuerpos anti-CD4 (Burkly y col., 1995) o proteínas basadas en CD4 (Allaway y col., 1993). Similarmente, se han observado sinergias usando anticuerpos anti-CCR5 en combinación con otros anticuerpos anti-CCR5, quimiocinas CC, o proteínas basadas en CD4 (Olson y col., 1999). Estudios previos descritos en la publicación internacional PCT n° WO 00/35409 publicada el 22 de junio de 2000

examinaron combinaciones de inhibidores de unión del VIH-1 e inhibidores de co-receptores de CCR5. Estudios previos descritos en la publicación internacional PCT WO 01/55439 publicada el 2 de agosto de 2001 examinaron combinaciones de inhibidores de productos intermedios de fusión de gp41 y unión a VIH-1. Estudios previos descritos en la publicación internacional WO 02/22077 publicada del 2 de marzo 2002 examinaron combinaciones de inhibidores de fusión e inhibidores de co-receptores de CCR5, además de la triple combinación de inhibidores de fusión, inhibidores de co-receptores de CCR5 e inhibidores de la unión de Hit-1. Sin embargo, ningún ensayo previo ha examinado la combinación de diferentes clases de inhibidores de co-receptores de CCR5, tales como mAb anti-CCR5 y antagonistas de CCR5 de no anticuerpo.

Tabla 2. Comparación de PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña en desarrollo

	Moléculas pequeñas	PRO 140
Selección de identificación	Unión a quimiocinas	Entrada del VIH-1
Bloquear la actividad natural de CCR5	Sí	No
Posibilidades de supresión/desregulación inmune	Sí	No
Tolerabilidad	Toxicidades cardíacas, neurológicas para algunos	Sin Toxicidad
Sitio de unión sobre CCR5	Bolsillo hidrófobo común definido por regiones transmembrana de CCR5	Epítoto extracelular que atraviesa múltiples dominios hidrófilos
Resistencia cruzada viral	Significativa	Limitada
Desarrollo de resistencia <i>in vitro</i>	6 a 19 semanas	Ninguna a las 40 semanas
Interacciones fármaco-fármaco	Significativas	Improbable
Interacciones con alimentos	Significativas	Improbable
Dosificación	Una vez o dos veces al día	Cada dos semanas a mensualmente

### Resumen de la invención

[0031] La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> de un sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto para su uso en un tratamiento para reducir la carga viral del VIH-1 del sujeto, además de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la carga viral del VIH-1 del sujeto se reduce al menos el 90% tras la administración del anticuerpo, y en el que la reducción se mantiene durante al menos dos semanas, anticuerpo que va a administrarse a 0,5 mg por kg a 5 mg por kg de peso corporal del sujeto, en el que el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5, y en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña. PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA4097, y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4098 como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4099.

[0032] La presente descripción desvela un procedimiento de reducción de la carga viral del VIH-1 en un sujeto humano infectado por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis reductoras de la carga viral del VIH-1 eficaces de (a) un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de (b) un anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> con una potencia igual o superior a la de PRO 140, (iii) recubre células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de  $\beta$ -quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que la dosis reductora de carga viral del VIH-1 eficaz comprende de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se reduce la carga viral del VIH-1 del sujeto.

**[0033]** La presente descripción también desvela un procedimiento de inhibición en un sujeto humano de la aparición o progresión de un trastorno asociado al VIH-1, cuya inhibición se efectúa inhibiendo la fusión del VIH-1 a células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el sujeto, que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis inhibitoras de la fusión eficaces de un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de un anticuerpo anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto con una potencia caracterizada por una CI90 de 10 µg/ml o menos, (iii) recubre las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que cada administración del anticuerpo se administra al sujeto de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se inhibe la aparición o progresión del trastorno asociado al VIH-1 en el sujeto.

**[0034]** La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento de reducción de la probabilidad de que un sujeto humano contraiga una infección por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis inhibitoras de la fusión eficaces de un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de un anticuerpo anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto con una potencia caracterizada por una CI90 de 10 µg/ml o menos, (iii) recubre las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que cada administración del anticuerpo se administra al sujeto de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se reduce la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección por el VIH-1.

**[0035]** La presente invención proporciona un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de una célula CD4<sup>+</sup> y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a una célula CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, para su uso en el tratamiento de un sujeto infectado por el VIH-1, además de un antagonista de no anticuerpo de un receptor CCR5, en el que el anticuerpo es PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5 y el antagonista de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña.

**[0036]** La presente descripción también desvela un procedimiento de inhibición en un sujeto de la aparición o progresión de un trastorno asociado al VIH-1, cuya inhibición se efectúa inhibiendo la fusión del VIH-1 a células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el sujeto, que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de una célula CD4<sup>+</sup> y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a una célula CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y (b) un antagonista de no anticuerpo de un receptor CCR5, en cantidades eficaces para inhibir la fusión del VIH-1 a las células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, de manera que así se inhiben la aparición o progresión del trastorno asociado al VIH-1 en el sujeto.

**[0037]** La invención proporciona además un procedimiento de reducción de la probabilidad de que un sujeto contraiga una infección por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de una célula CD4<sup>+</sup> y (ii) inhibir la fusión del VIH-1 a una célula CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y (b) un antagonista de no anticuerpo de un receptor CCR5, en cantidades eficaces para reducir la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección por el VIH-1.

**[0038]** La presente descripción desvela también un procedimiento de potenciamiento de la actividad inhibitora del VIH-1 de (i) un anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 o (ii) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo en el tratamiento de infección por el VIH-1 en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una cantidad potenciadora de la actividad inhibitora del VIH-1 del anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 en combinación con una cantidad potenciadora de la actividad inhibitora del VIH-1 de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la combinación produce un efecto sinérgico sobre la inhibición de la infección por el VIH-1, potenciando así la actividad inhibitora de (i) el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 o (ii) el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo. En una realización, debido al efecto sinérgico, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo produce una reducción de dosis de aproximadamente 4 a 10 veces del anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 y el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 produce una reducción de dosis de aproximadamente 3 a 16 veces del antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo.

**Breve descripción de las figuras**Figura 1

5 **[0039]** PRO 140 humanizado es potentemente antiviral. La actividad de neutralización *in vitro* de PRO 140 murino y humanizado se probó contra cuatro cepas aisladas del VIH-1 R5 primarias usando un ensayo de replicación de virus completo. Los datos reflejan los valores medios de 8 o más ensayos independientes. Los subtipos genéticos de los virus se indican entre paréntesis.

10 Figura 2

**[0040]** La actividad antiviral es independiente de célula diana. Se probó la inhibición de la infección de cuatro células diana diferentes por tres cepas aisladas del VIH-1 R5 primarias.

15 Figura 3

**[0041]** Susceptibilidad del VIH-1 *in vitro* a PRO 140 cuantificada usando el ensayo de entrada PhenoSense™. PRO 140 se probó para actividad contra 20 cepas aisladas del VIH-1 primarias en el ensayo PhenoSense HIV Entry™ en ViroLogic, Inc. La susceptibilidad al fármaco se informa como valores de  $CI_{50}$ , que representan la concentración requerida para el 50% de inhibición de la infectividad viral.

20 Figura 4

**[0042]** PRO 140 bloquea el VIH-1, pero no la señalización de quimiocinas. Se determinaron los efectos de PRO 140 sobre la inhibición de la movilización de calcio inducida por RANTES en células L1.2-CCR5 y sobre la inhibición de la replicación de VIH-1<sub>JR-FL</sub> en cultivos de CMSP. Se obtuvieron resultados similares para M1P-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$ .

25 Figura 5

**[0043]** PRO 140 proporciona control prolongado de la replicación viral en ratones infectados por el VIH-1. Los ratones SCID se reconstituyeron con células mononucleares de sangre periférica humanas normales y se infectaron 2 semanas después con VIH-1<sub>JR-CSF</sub>. Se administraron múltiples dosis de PRO 140 tras la obtención de niveles virales en estado estacionario. Se indican cargas virales en plasma pre- y post-inyección.

30 Figura 6

**[0044]** PRO 140 recubre, pero no destruye linfocitos CCR5. Voluntarios masculinos sanos (n=4) se trataron con una única infusión intravenosa de PRO 140 a un nivel de dosis de 2 mg/kg. En los momentos indicados post-tratamiento, la sangre se recogió y se analizó para niveles de linfocitos CCR5. Se indican los valores medios del grupo y las desviaciones estándar.

35 Figura 7

**[0045]** Concentraciones en suero de PRO 140. Voluntarios masculinos sanos se trataron con una única infusión intravenosa de PRO 140 a niveles de dosis de 0,1, 0,5 y 2,0 mg/kg, como se indica. En los tiempos indicados post-tratamiento, se recogió el suero, se criopreservó y se analizó para niveles de PRO 140. Se indican los datos para pacientes individuales.

40 Figura 8

**[0046]** PRO 140 no afecta los niveles de quimiocinas en plasma. Voluntarios masculinos sanos se trataron con una única infusión intravenosa de 0,1 mg/kg de PRO 140 (Cohorte 1), 0,5 mg/kg de PRO 140 (Cohorte 2) o placebo de correspondencia. En los tiempos indicados post-tratamiento, se recogió el plasma, se criopreservó y se analizó para niveles de RANTES. El límite inferior de cuantificación del ensayo fue 415 pg de RANTES/ml de plasma. Los datos representan los valores medios del grupo.

45 Figura 9

**[0047]** Esquema para síntesis química de SCH-D.

50 Figura 10

**[0048]** Esquema para síntesis química de TAK-779. El procedimiento es como se describe en Shiraishi y col., 2000.

55



Figura 11

**[0049]** Esquema para síntesis química de UK-427.857. El procedimiento es como se describe en la publicación internacional PCT nº WO 01/90106 A2 publicada el 29 de noviembre de 2001.

Figura 12

**[0050]** Inhibición sinérgica de la fusión de IRV-1 presentada por PRO 140 con diferentes compuestos. Las interacciones entre PRO 140 y molécula pequeña, péptido, mAb e inhibidores de CD4-inmunoglobulina quiméricos de dianas CCR5, CD4, gp120 y gp41 para inhibir la fusión del VIH-1 se evaluaron usando el ensayo de RET. Los valores del índice combinación (IC) con intervalos de confianza del 95% se representan para datos obtenidos usando los compuestos combinados en una relación molar 1:1. Un valor de IC de <1 indica interacciones sinérgicas; un valor de IC de 1 indica interacciones aditivas; y un valor de IC de >1 indica interacciones antagonistas.

Figura 13

**[0051]** PRO 140 recubre, pero no destruye linfocitos. Voluntarios masculinos sanos (n=4) se trataron con una única infusión intravenosa de PRO 140 a un nivel de dosis de 5 mg/kg. En los tiempos indicados post-tratamiento, la sangre se recogió y se analizó para niveles de linfocitos CCR5. Se indican los valores medios del grupo y desviaciones estándar.

Figura 14

**[0052]** PRO 140 es activo contra cepas del VIH-1 que son resistentes a antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Las variantes de VIH-1 resistentes a AD101 (un inhibidor de CCR5 de molécula pequeña estructuralmente relacionado con SCH-C) y SCH-D (Kuhmann y col., 2004; Maroznan y col. 2005) se probaron para sensibilidad para el mAb anti-CCR5, PA14. El grado de replicación viral en linfocitos T CD4<sup>+</sup> primarios se representa con respecto a la producción de antígeno p24 en ausencia de cualquier inhibidor, que se define como 100%. Los puntos de datos individuales fueron el promedio de valores derivados de 4 experimentos separados, cada uno realizado usando pocillos por duplicado. Los datos muestran que mientras que las variantes del VIH-1 resistentes a AD101- y SCH-D fueron resistentes a SCH-C y SCH-D, respectivamente, la replicación de estas variantes fue potentemente inhibida por PA14 (Maroznan y col. 2005).

Figura 15

**[0053]** Curvas de respuesta a dosis para inhibición de la fusión de membranas mediada por la envuelta del VIH-1<sub>JR-FL</sub> por combinaciones de inhibidores de CCR5. Las diluciones se analizaron en pocillos por triplicado, y los puntos de datos representan la media y desviaciones estándar de duplicados. (A) Se probaron individualmente PRO 140 y UK-427.857 y en una relación molar fija 1:1 durante el intervalo indicado de concentraciones. En el experimento representado, los valores de CI50 y CI90 fueron 2,9 nM y 11 nM para PRO 140, 5,0 nM y 21 nM para UK-427.857 y 2,1 nM y 4,6 nM para la combinación. Los valores de IC50 e IC90 fueron 0,58 y 0,32, respectivamente. (B) Se probaron individualmente SCH-D y UK-427.857 y en una relación molar fija 1:1 durante el intervalo indicado de concentraciones. En el experimento representado, los valores de CI50 y CI90 fueron 5,5 nM y 34 nM para SCH-D, 9,7 nM y 59 nM para UK-427.857 y 6,1 nM y 31 nM para la combinación. Los valores de IC50 e IC90 fueron 0,87 y 0,73, respectivamente.

Figura 16

**[0054]** Inhibición de la unión de PRO 140-PE a células CEM.NKR-CCR5 por PRO 140 sin marcar, UK-427.857 y SCH-D. Células CEM.NKR-CCR5 se incubaron con concentraciones variables de PRO 140 sin marcar, UK-427.857 o SCH-D durante 30 min a temperatura ambiente en tampón PBSA antes de la adición de PRO 140-PE 5 nM durante 30 min adicionales. Las células se lavaron y luego se analizaron por citometría de flujo para tanto la intensidad media de fluorescencia (IMF) de la unión como el porcentaje de células seleccionadas para la unión positiva de PRO 140-PE. La inhibición se evaluó basándose en tanto IMF (A) como el porcentaje de células seleccionadas (B).

Figura 17

**[0055]** Inhibición de la unión de <sup>3</sup>H-UK-427.857 por UK-427.857 sin marcar, SCH-D y PRO 140. (A) Se pre-incubaron células CEM.NKR-CCR5 con concentraciones variables de UK-427.857 sin marcar, SCH-D o PRO 140 durante 30 min en tampón PBSA a temperatura ambiente antes de la adición de <sup>3</sup>H-UK-427.857 2 nM durante 30 min adicionales. Las células se lavaron y luego se analizaron para radiactividad por recuento por centelleo. (B) La estabilidad de la unión de UK-427.857 bajo las condiciones de ensayo se examinó pre-incubando células CEM.NKR-CCR5 con <sup>3</sup>H-UK-427.857 2 nM antes de lavar, adición de compuestos sin marcar durante 30 min y procesamiento como se ha descrito anteriormente.

**Descripción detallada de la invención**Términos

5 **[0056]** Como se usa en la presente solicitud, excepto que se proporcione expresamente de otro modo en el presente documento, cada uno de los siguientes términos debe tener el significado expuesto a continuación.

10 **[0057]** “Administrar” se refiere a administrar de un modo que sea efectuado o realizado usando cualquiera de los diversos procedimientos y sistemas de administración conocidos para aquellos expertos en la materia. La administración puede realizarse, por ejemplo, tópicamente, intravenosamente, pericárdicamente, por vía oral, parenteralmente, mediante implante, transmucosamente, transdérmicamente, intradérmicamente, intramuscularmente, subcutáneamente, intraperitonealmente, intratecalmente, intralinfáticamente, intralesionalmente, epiduralmente, o por electroporación *in vivo*. Un agente o composición también puede administrarse en un aerosol, tal como para administración pulmonar y/o intranasal. La administración también puede realizarse, por ejemplo, una vez, una pluralidad de veces y/o durante uno o más periodos prolongados.

20 **[0058]** Un “anticuerpo” debe incluir, sin limitación, una molécula de inmunoglobulina que comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras y que reconoce un antígeno. La molécula de inmunoglobulina puede derivarse de cualquiera de las clases comúnmente conocidas, que incluyen, pero no se limitan a, IgA, IgA secretora, IgG e IgM. Las subclases de IgG también son muy conocidas para aquellos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas. “Anticuerpo” incluye, a modo de ejemplo, tanto anticuerpos que se producen naturalmente como que no se producen naturalmente; anticuerpos monoclonales y policlonales; anticuerpos quiméricos y humanizados; anticuerpos humanos o no humanos; anticuerpos sintéticos completos; y anticuerpos monocatenarios. Un anticuerpo no humano puede humanizarse mediante procedimientos recombinantes para reducir su inmunogenicidad en el hombre. Los procedimientos para humanizar anticuerpos son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. “Anticuerpo” también incluye, sin limitación, un fragmento o porción de cualquiera de las moléculas anteriormente mencionadas de inmunoglobulina e incluye un fragmento o porción monovalente y una divalente. Los fragmentos de anticuerpos incluyen, por ejemplo, fragmentos Fc y fragmentos de unión a antígeno (Fab).

30 **[0059]** Un “anticuerpo anti-receptor de quimiocinas” se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo sobre un receptor de quimiocinas. Como se usa en el presente documento, “anticuerpo anti-CCR5” se refiere a un anticuerpo que reconoce y se une a un epítipo sobre el receptor de quimiocinas CCR5.

35 **[0060]** “Unión” significa el procedimiento que está mediado por la unión de la glucoproteína de la envuelta del VIH-1 al receptor de CD4 humano, que no es un co-receptor de fusión.

40 **[0061]** Como se usa en el presente documento, “CCR5” es un receptor de quimiocinas que se une a miembros del grupo C-C de quimiocinas y cuya secuencia de aminoácidos comprende la proporcionada en el número de acceso de GenBank 1705896 y variantes polimórficas relacionadas. Como se usa en el presente documento, CCR5 incluye, sin limitación, porciones extracelulares de CCR5 que pueden unir la proteína de la envuelta del VIH-1. “CCR5” y “receptor CCR5” se usan sinónimamente.

45 **[0062]** “CD4” significa la proteína CD4 unida a membrana nativa madura que comprende un dominio citoplásmico, un dominio transmembrana hidrófobo y un dominio extracelular que se une a la glucoproteína de la envuelta del VIH-1 gp120.

50 **[0063]** “CDR”, o región determinante de la complementariedad, significa una secuencia de aminoácidos altamente variable en el dominio variable de un anticuerpo.

55 **[0064]** Una “célula” incluye una célula biológica, por ejemplo, una célula HeLa, y una célula no biológica, por ejemplo, una vesícula de fosfolípido o virión. Una “célula susceptible a infección por el VIH” también puede denominarse una “célula diana” e incluye una célula que puede infectarse por o fusionarse con VIH o una célula infectada por el VIH.

60 **[0065]** “CXCR4” es un receptor de quimiocinas que se une a miembros del grupo C-X-C de quimiocinas y cuya secuencia de aminoácidos comprende la proporcionada en el n° de acceso de Genbank 400654 y variantes polimórficas relacionadas. Como se usa en el presente documento, CXCR4 incluye porciones extracelulares de CXCR4 que pueden unirse a la proteína de la envuelta del VIH-1.

**[0066]** “Expuesto” a VIH-1 se refiere a contacto con VIH-1 de forma que pudiera resultar infección.

65 **[0067]** Un anticuerpo “completamente humano” se refiere a un anticuerpo en el que todos los aminoácidos se corresponden con aminoácidos en moléculas de inmunoglobulina humana. “Completamente humano” y “humano” se usan sinónimamente.

- 5 **[0068]** “VIH” se refiere al virus de la inmunodeficiencia humana. VIH debe incluir, sin limitación, VIH-1. VIH-1 incluye, pero no se limita a, partículas de virus extracelulares y las formas del VIH-1 asociadas a células infectadas por el VIH-1. El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) puede ser de cualquiera de los dos tipos conocidos del VIH (VIH-1 o VIH-2). El virus VIH-1 puede representar cualquiera de los subtipos principales conocidos (clases A, B, C, D, E, F, G y H) o subtipo periférico (grupo O). VIH-1<sub>JR-FL</sub> es una cepa que se aisló originariamente en la autopsia del tejido de cerebro de un paciente con SIDA. El virus se ha clonado y se conocen las secuencias de ADN de sus glucoproteínas de la envuelta (nº de acceso de GenBank U63632). En términos de sensibilidad para inhibidores de la entrada viral, se sabe que VIH-1<sub>JR-FL</sub> es altamente representativo de cepas aisladas del VIH-1 primarias.
- 10 **[0069]** Un anticuerpo “humanizado” se refiere a un anticuerpo en el que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR regiones están sustituidos por aminoácidos correspondientes derivados de moléculas de inmunoglobulina humana. En una realización de las formas humanizadas de los anticuerpos, algunos, la mayoría o todos los aminoácidos fuera de las regiones CDR se han sustituido con aminoácidos de moléculas de inmunoglobulina humana, mientras que algunos, la mayoría o todos los aminoácidos dentro de una o más regiones CDR están sin cambiar. Pequeñas adiciones, deleciones, inserciones, sustituciones o modificaciones de aminoácidos son permisibles en tanto que no abolan la capacidad del anticuerpo para unirse a un antígeno dado. Moléculas de inmunoglobulina humana adecuadas incluyen moléculas IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE e IgM. Un anticuerpo “humanizado” retiene una especificidad antigénica similar a la del anticuerpo original.
- 15 **[0070]** “Anticuerpos monoclonales”, también designados mAb, son moléculas de anticuerpo cuyas secuencias primarias son esencialmente idénticas y que presentan la misma especificidad antigénica. Los anticuerpos monoclonales pueden producirse por técnicas de hibridoma, recombinantes, transgénicas u otras técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia.
- 20 **[0071]** Un “antagonista de no anticuerpo de un receptor CCR5” se refiere a un agente que no comprende un anticuerpo, y que se une a un receptor CCR5 e inhibe la actividad de este receptor. Tal inhibición puede incluir inhibir la unión del VIH-1 al receptor CCR5. Antagonistas de no anticuerpo a modo de ejemplo incluyen ácidos nucleicos, hidratos de carbono, lípidos, oligopéptidos y moléculas orgánicas pequeñas.
- 25 **[0072]** “Reducir la probabilidad de que un sujeto contraiga una infección viral” significa reducir la probabilidad de que el sujeto se infecte por el virus al menos dos veces. Por ejemplo, si un sujeto tiene una probabilidad del 1% de infectarse por el virus, una reducción de dos veces en la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección viral haría que el sujeto tuviera una probabilidad del 0,5% de infectarse por el virus. En la realización preferida de la presente invención, reducir la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección viral significa reducir la probabilidad de que el sujeto se infecte por el virus al menos diez veces.
- 30 **[0073]** Un antagonista del receptor CCR5 de “molécula pequeña” incluye, por ejemplo, una molécula orgánica pequeña que se une a un receptor CCR5 e inhibe la actividad del receptor. Tal inhibición incluye, por ejemplo, inhibir la unión del VIH-1 al receptor. En una realización, la molécula orgánica pequeña tiene un peso molecular inferior a 1.500 dalton. En otra realización, la molécula tiene un peso molecular inferior a 600 dalton.
- 35 **[0074]** “Sujeto” incluye cualquier animal o animal artificialmente modificado que pueda infectarse por el VIH. Animales incluyen, pero no se limitan a, seres humanos, primates no humanos, perros, gatos, conejos, hurones y roedores tales como ratones, ratas y cobayas. Animales artificialmente modificados incluyen, pero no se limitan a, ratones SCID con sistemas inmunitarios humanos. En la realización preferida, el sujeto es un ser humano.
- 40 **[0075]** “Sinergia” entre dos o más agentes se refiere al efecto combinado de los agentes que es mayor que sus efectos aditivos. Los efectos sinérgicos, aditivos o antagonistas entre agentes pueden cuantificarse por análisis de las curvas de respuesta a dosis usando el procedimiento del índice de combinación (IC). Un valor de IC superior a 1 indica antagonismo; un valor de IC igual a 1 indica un efecto aditivo; y un valor de IC inferior a 1 indica un efecto sinérgico. En una realización, el valor de IC de una interacción sinérgica es inferior a 0,9. En otra realización, el valor de IC es inferior a 0,8. En una realización preferida, el valor de IC es inferior a 0,7.
- 45 **[0076]** “Tratar una infección por el VIH-1 en un sujeto” se refiere a ralentizar, detener o invertir la progresión de un trastorno del VIH-1 en el sujeto. En la realización preferida, “tratar” se refiere a invertir la progresión hasta el punto de eliminar el trastorno. Como se usa en el presente documento, “tratar” también significa reducir el número de infecciones virales, reducir el número de partículas virales infecciosas, reducir el número de células viralmente infectadas o mejorar síntomas asociados al VIH-1. Reducir la carga viral en un sujeto es una realización para tratar el sujeto.
- 50 **[0077]** “Tratar una infección por el VIH-1 en un sujeto” se refiere a ralentizar, detener o invertir la progresión de un trastorno del VIH-1 en el sujeto. En la realización preferida, “tratar” se refiere a invertir la progresión hasta el punto de eliminar el trastorno. Como se usa en el presente documento, “tratar” también significa reducir el número de infecciones virales, reducir el número de partículas virales infecciosas, reducir el número de células viralmente infectadas o mejorar síntomas asociados al VIH-1. Reducir la carga viral en un sujeto es una realización para tratar el sujeto.
- 55 **[0077]** La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> de un sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto para su uso en un tratamiento para reducir la carga viral del VIH-1 del sujeto, además de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la carga viral del VIH-1 del sujeto se reduce al menos el 90% tras la administración del
- 60 Realizaciones de la invención

65 **[0077]** La presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> de un sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto para su uso en un tratamiento para reducir la carga viral del VIH-1 del sujeto, además de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la carga viral del VIH-1 del sujeto se reduce al menos el 90% tras la administración del

anticuerpo, y en el que la reducción se mantiene durante al menos dos semanas, anticuerpo que va a administrarse a 0,5 mg por kg a 5 mg por kg de peso corporal del sujeto, en el que el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5, y en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña. PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA4097, y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4098 como el plásmido designado pVg4:HuPR0140 (mut B+D+I)-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4099.

**[0078]** La presente descripción desvela un procedimiento de reducción de la carga viral del VIH-1 en un sujeto humano infectado por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis reductoras de la carga viral del VIH-1 eficaces de (a) un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de (b) un anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> con una potencia igual o superior a la de PRO 140, (iii) recubre células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que la dosis reductora de carga viral del VIH-1 eficaz comprende de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se reduce la carga viral del VIH-1 del sujeto.

**[0079]** En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 se une al mismo epítoto de CCR5 al que se une PRO 140. El anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo humanizado, humano o quimérico. En la realización preferida, el anticuerpo administrado al sujeto es el anticuerpo designado PRO 140.

**[0080]** En un aspecto, la dosis es de 0,5 mg por kg a 5 mg por kg de peso corporal del sujeto. En otro aspecto, la dosis es de 1 mg por kg a 3 mg por kg de peso corporal del sujeto. En otro aspecto, la dosis es 2 mg por kg de peso corporal del sujeto.

**[0081]** En otra realización, la dosis reductora de la carga viral eficaz es suficiente para lograr en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 400 ng/ml. En otra realización, las dosis administradas a intervalos regulares son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 1 µg/ml. En otra realización, las dosis son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 µg/ml. En otra realización, las dosis son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 5 µg/ml. En otra realización, las dosis son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 10 µg/ml. En otra realización, las dosis son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 25 µg/ml. En otra realización, las dosis son suficientes para lograr y mantener en el sujeto una concentración en suero del anticuerpo de al menos 50 µg/ml.

**[0082]** En una realización de la invención, el intervalo predefinido es al menos una vez semanalmente. En otra realización, el intervalo predefinido es cada dos a cuatro semanas. En otra realización, el intervalo predefinido es cada dos semanas, o cada cuatro semanas. En otra realización, el intervalo predefinido es al menos una vez al mes, cada seis semanas o cada ocho semanas.

**[0083]** Según la invención, la carga viral del VIH-1 del sujeto se mantiene durante al menos dos semanas. En otra realización, la reducción de la carga viral del VIH-1 del sujeto se mantiene durante al menos cuatro semanas. En otra realización, la reducción de la carga viral del VIH-1 del sujeto se mantiene durante al menos tres meses.

**[0084]** En una realización, el anticuerpo se administra mediante infusión intravenosa. En otra realización, el anticuerpo se administra mediante inyección subcutánea. Según la invención, la carga viral del VIH-1 del sujeto se reduce al menos el 90% tras la administración del anticuerpo.

**[0085]** En una realización de la presente invención, al sujeto va a administrársele adicionalmente al menos un agente antirretroviral anti-VIH-1. El agente antirretroviral anti-VIH-1 puede ser, por ejemplo, un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI), un inhibidor de proteasa (PI), un inhibidor de la fusión, o cualquier combinación de los mismos. En una realización, el sujeto no ha recibido tratamiento. En la realización preferida, el sujeto ha recibido tratamiento.

**[0086]** En otra realización, (a) antes de administrar el anticuerpo monoclonal al sujeto, el sujeto ha recibido tratamiento con al menos un agente antirretroviral anti-VIH-1, y (b) concurrente con la administración del anticuerpo

monoclonal, el sujeto continúa recibiendo tratamiento con el agente o agentes, de manera que se potencie la reducción de la carga viral del VIH-1 en el sujeto. El agente antirretroviral anti-VIH-1 puede ser, por ejemplo, un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI), un inhibidor de proteasa (PI), un inhibidor de la fusión, o cualquier combinación de los mismos.

5 **[0087]** La presente descripción también desvela un procedimiento de inhibición en un sujeto humano de la aparición o progresión de un trastorno asociado al VIH-1, cuya inhibición se efectúa inhibiendo la fusión del VIH-1 a células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el sujeto, que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis inhibidoras de la fusión eficaces de un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de un anticuerpo anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto con una potencia caracterizada por una CI90 de 10 µg/ml o menos, (iii) recubre las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que cada administración del anticuerpo se administra al sujeto de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se inhibe la aparición o progresión del trastorno asociado al VIH-1 en el sujeto.

10 **[0088]** La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento de reducción de la probabilidad de que un sujeto humano contraiga una infección por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis inhibidoras de la fusión eficaces de un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de un anticuerpo anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto con una potencia caracterizada por una CI90 de 10 µg/ml o menos, (iii) recubre las células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que cada administración del anticuerpo se administra al sujeto de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se reduce la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección por el VIH-1. En una realización, el sujeto se ha expuesto al VIH-1. En otro aspecto, el sujeto está en riesgo de exponerse al VIH-1.

15 **[0089]** La presente descripción también desvela un procedimiento de reducción de la carga viral del VIH-1 en un sujeto humano infectado por el VIH-1 que ha desarrollado resistencia a una forma de terapia anti-VIH-1, procedimiento que comprende administrar al sujeto en un intervalo predefinido dosis reductoras de la carga viral del VIH-1 eficaces de (a) un anticuerpo humanizado designado PRO 140, o de (b) un anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 que (i) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto e inhibe la fusión del VIH-1 con tales células, (ii) inhibe la fusión del VIH-1 con células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> con una potencia igual o superior a la de PRO 140, (iii) recubre células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> en el sujeto sin reducir el número de tales células en el sujeto, y/o (iv) se une a células CD4<sup>+</sup>CCR5<sup>+</sup> del sujeto sin inducir un aumento en la concentración en plasma del sujeto de β-quimiocinas en circulación, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099), en el que la dosis reductora de carga viral del VIH-1 eficaz comprende de 0,1 mg por kg a 10 mg por kg de peso corporal del sujeto, de manera que así se reduce la carga viral del VIH-1 del sujeto.

20 **[0090]** En un aspecto, la forma de terapia anti-VIH-1 es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI), un inhibidor de proteasa (PI), un inhibidor de la fusión, o cualquier combinación de los mismos. En otro aspecto, el inhibidor de la fusión es un antagonista de CCR5 de no anticuerpo. En otro aspecto, el antagonista de CCR5 de no anticuerpo es un antagonista de CCR5 de molécula pequeña. En otro aspecto más, el antagonista de CCR5 de molécula pequeña se administra por vía oral.

25 **[0091]** Según la presente invención, el anticuerpo puede administrarse al mismo tiempo, simultáneamente, antes de la administración del antagonista de CCR5 de molécula pequeña o posterior a la administración del antagonista de CCR5 de molécula pequeña. Con respecto a la administración de dos o más agentes a un sujeto con el fin de tratar el sujeto, cada agente puede administrarse al sujeto dentro del mismo periodo de tiempo de tratamiento en el que se administra el otro agente. Los agentes pueden administrarse juntos, al mismo tiempo y en las mismas composiciones o diferentes o mediante las mismas vías de administración o diferentes. Alternativamente, cada agente se administra mediante una pauta de dosificación (por ejemplo, frecuencia, vía y cantidad) diferente a la que

se administra cada agente. Por ejemplo, el primero de los dos agentes administrados (por ejemplo, un anticuerpo) puede administrarse mediante inyección subcutánea a intervalos de dos semanas durante un periodo de tiempo de tratamiento de un año, mientras que durante ese mismo periodo de un año, el segundo agente administrado (por ejemplo, una molécula pequeña) se administra por vía oral dos veces al día. Por consiguiente, "administración concurrente" se refiere a la administración de al menos dos agentes dentro de un periodo de tratamiento.

**[0092]** La presente invención también proporciona un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> del sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, para su uso en el tratamiento de un sujeto infectado por el VIH-1, además de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que el anticuerpo es PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5 y en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña.

**[0093]** La presente descripción también desvela un procedimiento de inhibición en un sujeto la aparición o progresión de un trastorno asociado al VIH-1, cuya inhibición se efectúa inhibiendo la fusión del VIH-1 a células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el sujeto, que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie del células CD4<sup>+</sup> del sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en cantidades eficaces para inhibir la aparición o progresión del trastorno asociado al VIH-1 en el sujeto.

**[0094]** La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento de reducción de la probabilidad de que un sujeto contraiga una infección por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie del células CD4<sup>+</sup> del sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en cantidades eficaces para reducir la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección por el VIH-1. En un aspecto, el sujeto se ha expuesto al VIH-1. En otro aspecto, el sujeto está en riesgo de exponerse al VIH-1.

**[0095]** La presente invención también se refiere al efecto de la combinación de distintas clases de compuestos que se unen a CCR5, concretamente mAb anti-CCR5 y antagonistas de CCR5 de no anticuerpo, sobre la fusión del VIH-1 a, y entrada en, células diana susceptibles. La inhibición sinérgica de la infección por el VIH-1 de células diana se ha demostrado previamente usando combinaciones de diferentes inhibidores de la entrada del VIH-1. Sin embargo, ningún estudio previo ha examinado la combinación de diferentes clases de inhibidores que eligen como diana el mismo co-receptor CCR5.

**[0096]** Específicamente, la presente invención también proporciona un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> de un sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, para su uso en el tratamiento de un sujeto infectado por el VIH-1, junto con un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, tratamiento en el que el anticuerpo es PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5 y en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña.

**[0097]** La presente descripción desvela adicionalmente un procedimiento de inhibición en un sujeto de la aparición o progresión de un trastorno asociado al VIH-1, cuya inhibición se efectúa inhibiendo la fusión del VIH-1 a células diana CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> en el sujeto, que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie del células CD4<sup>+</sup> del sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en cantidades eficaces para inhibir la aparición o progresión del trastorno asociado al VIH-1 en el sujeto.

**[0098]** La presente descripción también desvela un procedimiento de reducción de la probabilidad de que un sujeto contraiga una infección por el VIH-1 que comprende administrar al sujeto (a) un anticuerpo que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> del sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en cantidades eficaces para reducir la probabilidad de que el sujeto contraiga una infección por el VIH-1. En un aspecto, el sujeto se ha expuesto al VIH-1. En otro aspecto, el sujeto está en riesgo de exponerse al VIH-1.

**[0099]** La presente descripción también desvela un procedimiento de potenciamiento de la actividad inhibidora del VIH-1 de (i) un anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 o (ii) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo en el tratamiento de infección por el VIH-1 en un sujeto, que comprende: administrar al sujeto una cantidad potenciadora de la actividad inhibidora del VIH-1 del anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 en combinación con una cantidad potenciadora de la actividad inhibidora del VIH-1 de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la combinación produce un efecto sinérgico sobre la inhibición de la infección por el VIH-1, potenciando así la actividad inhibidora de (i) el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 o (ii) el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo. En una realización, debido al efecto sinérgico, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo produce una reducción de dosis de aproximadamente 4 a 10 veces del anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 y el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 produce una reducción de dosis de aproximadamente 3 a 16 veces del antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo.

**[0100]** En otro aspecto, el procedimiento comprende una cantidad potenciadora de la actividad inhibidora del VIH-1 de uno o más antagonistas del receptor CCR5 de no anticuerpo. En otro aspecto, el procedimiento comprende una cantidad potenciadora de la actividad inhibidora del VIH-1 de uno o más anticuerpos monoclonales anti-receptor CCR5. En otro aspecto más, el anticuerpo monoclonal anti-receptor CCR5 y el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo se administran simultáneamente al sujeto.

**[0101]** En un aspecto de la divulgación, el anticuerpo monoclonal es PA14 producido por la línea celular de hibridoma designada PA14 (nº de acceso de ATCC HB-12610), o un anticuerpo que compite con el anticuerpo monoclonal PA-14 en la unión al receptor CCR5. Según la invención, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140, o un anticuerpo que compite con PRO 140 en la unión al receptor CCR5, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099). En otra realización, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140.

**[0102]** En una realización, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es SCH-D, TAK-779, TAK-652, UK-427.857, GW873140, o una combinación de los mismos. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña que compite con SCH-D en la unión al receptor CCR5. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña que compite con UK-427.857 en la unión al receptor CCR5. En otra realización más, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña que compite con TAK-779 en la unión al receptor CCR5. En una realización, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña que compite con TAK-652 en la unión al receptor CCR5. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña que compite con GW873140 en la unión al receptor CCR5.

**[0103]** Los anticuerpos monoclonales secretores de hibridomas murinos PA8, PA9, PA10, PA11, PA12 y PA14 se depositaron conforme a, y en satisfacción de, los requisitos del Tratado de Budapest sobre el reconocimiento internacional del depósito de microorganismos para los fines del procedimiento de patente (el "Tratado de Budapest") en la Colección americana de cultivos tipo (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 2 de diciembre de 1998 bajo los siguientes nº de acceso: nº de acceso de ATCC HB-12605 (PA8), nº de acceso de ATCC HB-12606 (PA9), nº de acceso de ATCC 12607 (PA10), nº de acceso de ATCC HB-12608 (P11), nº de acceso de ATCC HB-12609 (PA12) y nº de acceso de ATCC HB-12610 (PA14).

**[0104]** En otro aspecto de la presente invención, el anticuerpo monoclonal es PA14 producido por la línea celular de hibridoma designada PA14 (nº de acceso de ATCC HB-12610), o un anticuerpo que compite con la unión del anticuerpo monoclonal PA14 al receptor CCR5. En todavía otro aspecto, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo que se une al mismo epítoto al que se une el anticuerpo monoclonal PA14. Si se produce la unión al mismo epítoto, resulta inhibición competitiva.

**[0105]** Un experto en la materia sabría cómo preparar los anticuerpos humanizados de la invención objeto. Diversas publicaciones también describen cómo preparar anticuerpos humanizados. Por ejemplo, los procedimientos descritos en la patente de EE.UU. nº 4.816.567 comprenden la producción de anticuerpos quiméricos que tienen una región variable de un anticuerpo y una región constante de otro anticuerpo.

**[0106]** La patente de EE.UU. nº 5.225.539 describe otro enfoque para la producción de un anticuerpo humanizado. Esta patente describe el uso de tecnología de ADN recombinante para producir un anticuerpo humanizado en el que las CDR de una región variable de una inmunoglobulina se sustituyen con las CDR de una inmunoglobulina con una especificidad diferente de forma que el anticuerpo humanizado reconocería la diana deseada, pero no sería reconocida de una forma significativa por el sistema inmunitario del sujeto humano. Específicamente se usa mutagénesis dirigida al sitio para injertar las CDR sobre la región estructural.

**[0107]** Otros enfoques para humanizar un anticuerpo se describen en las patentes de EE.UU. nº 5.585.089 y 5.693.761, y la publicación internacional PCT nº WO 90/07861, que describen procedimientos para producir inmunoglobulinas humanizadas. Éstas tienen una o más CDR y posibles aminoácidos adicionales de una inmunoglobulina donante y una región estructural de una inmunoglobulina humana aceptora. Estas patentes describen un procedimiento para aumentar la afinidad de un anticuerpo por el antígeno deseado. Algunos aminoácidos en la región estructural se eligen para ser los mismos que los aminoácidos en aquellas posiciones en el donante en vez de en el aceptor. Específicamente, estas patentes describen la preparación de un anticuerpo humanizado que se une a un receptor combinando las CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón con regiones estructurales y constantes de inmunoglobulina humana. Las regiones estructurales humanas pueden elegirse para maximizar la homología con la secuencia de ratón. Puede usarse un modelo informático para identificar aminoácidos en la región estructural que es probable que interaccionen con las CDR o el antígeno específico y entonces pueden usarse aminoácidos de ratón en estas posiciones para crear el anticuerpo humanizado. Los procedimientos anteriores son meramente ilustrativos de algunos de los procedimientos que un experto en la materia podría emplear

para preparar anticuerpos humanizados.

5 [0108] Los procedimientos para preparar anticuerpos completamente humanos también son muy conocidos para un experto en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales completamente humanos pueden prepararse inmunizando animales transgénicos para grandes porciones de sitios de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.591.669, 5.545.806, 5.545.807, 6.150.584, y referencias citadas en su interior. Estos animales transgénicos se han modificado genéticamente de forma que haya una delección funcional en la producción de anticuerpos endógenos (por ejemplo, murinos). Los animales se modifican adicionalmente para contener toda o una parte del sitio del gen de inmunoglobulina de la línea germinal humana de forma que la inmunización de estos animales producirá la producción de anticuerpos completamente humanos para el antígeno de interés. Tras la inmunización de estos animales (por ejemplo, XenoMouse® (Abgenix), HuMAb-Mouse® (Medarex/GenPharm)), los anticuerpos monoclonales pueden prepararse según tecnología de hibridomas convencional. Estos anticuerpos monoclonales tendrán secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina humana y, por tanto, no provocarán respuestas de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) cuando se administren a seres humanos.

20 [0109] También existen procedimientos *in vitro* para producir anticuerpos humanos. Éstos incluyen tecnología de expresión en fago (patentes de EE.UU. n° 5.565.332 y 5.573.905) y estimulación *in vitro* de linfocitos B humanos (patentes de EE.UU. n° 5.229.275 y 5.567.610).

25 [0110] Los ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo PRO 140 humanizado se han depositado en la ATCC. Específicamente, los plásmidos designados pVK-HuPRO140 pVg4-HuPRO140 (mut B+D+I) y pVg4-HuPRO140 HG2, respectivamente, se depositaron conforme a, y en satisfacción de, los requisitos del Tratado de Budapest en la ATCC, Manassas, VA, U.S.A. 20108, el 22 de febrero de 2002, bajo los n° de acceso de ATCC PTA 4097, PTA 4099 y PTA 4098, respectivamente.

30 [0111] Según la invención, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5, en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK (designación de depósito de la ATCC PTA-4097), y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4098) como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B+D+I)-VH (designación de depósito de la ATCC PTA-4099). En otra realización, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado o humano que se une al mismo epítoto al que se une el anticuerpo PRO 140. En otra realización, el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140.

35 [0112] En un aspecto de los presentes procedimientos, el anticuerpo se administra al sujeto una pluralidad de veces y cada administración del anticuerpo administra de 0,01 mg por kg de peso corporal a 50 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. En otro aspecto, cada administración del anticuerpo administra de 0,05 mg por kg de peso corporal a 25 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. En otro aspecto, cada administración del anticuerpo administra de 0,1 mg por kg de peso corporal a 10 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. En todavía otro aspecto, cada administración del anticuerpo administra de 0,5 mg por kg de peso corporal a 5 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. En otro aspecto, cada administración del anticuerpo administra de 1 mg por kg de peso corporal a 3 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. En un aspecto preferido, cada administración del anticuerpo administra aproximadamente 2 mg por kg de peso corporal del anticuerpo al sujeto. Según la invención, el anticuerpo se administra a 0,5 mg por kg de peso corporal a 5 mg por kg de peso corporal, además del antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo.

40 [0113] En una realización, el anticuerpo se administra una pluralidad de veces, y una primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de menos de una semana. En otra realización, la primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de al menos una semana. En otra realización, la primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de una semana. En otra realización, la primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de dos a cuatro semanas. En una realización preferida, la primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de dos semanas. En otra realización, la primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de cuatro semanas. En otra realización más, el anticuerpo se administra una pluralidad de tiempos, y una primera administración del anticuerpo se separa de la posterior administración del anticuerpo un intervalo de al menos un mes.

45 [0114] En otra realización, el anticuerpo se administra al sujeto mediante infusión intravenosa. En una realización preferida, el anticuerpo se administra al sujeto mediante inyección subcutánea. En otra realización, el anticuerpo se administra al sujeto mediante inyección intramuscular.

50 [0115] Según la invención, el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña. En una realización, el antagonista del receptor CCR5 está seleccionado del grupo que consiste en SCH-D, UK-



427.857, TAK-779, TAK-652 y GW873140. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 es una molécula orgánica pequeña que compite con la unión de SCH-D al receptor CCR5. En todavía otra realización, el antagonista del receptor CCR5 es una molécula orgánica pequeña que compite con la unión de UK-427.857 al receptor CCR5. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 es una molécula orgánica pequeña que compite con la unión de TAK-779 al receptor CCR5. En otra realización más, el antagonista del receptor CCR5 es una molécula orgánica pequeña que compite con la unión de TAK-652 al receptor CCR5. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 es una molécula orgánica pequeña que compite con la unión de GW873140 al receptor CCR5.

**[0116]** En una realización adicional de los procedimientos descritos en el presente documento, el antagonista del receptor CCR5 se administra una pluralidad de veces y cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 0,5 mg a 2.500 mg del antagonista al sujeto. En otra realización, cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 5 mg a 1.250 mg del antagonista al sujeto. En otra realización más, cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 5 mg a 15 mg del antagonista al sujeto. En otra realización, cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 50 mg a 1.250 mg del antagonista al sujeto. En todavía otra realización, cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 200 mg a 800 mg del antagonista al sujeto. En otra realización, cada administración del antagonista del receptor CCR5 administra de 300 mg a 600 mg del antagonista.

**[0117]** Debido a su rápida eliminación, los antagonistas del receptor CCR5 de molécula pequeña requieren dosificación de al menos diaria o dos veces al día con el fin de mantener la presión selectiva sobre el virus. La Tabla 3 resume las pautas de dosificación empleadas con diversos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña actualmente sometidos a ensayos clínicos. En una realización de los presentes procedimientos, el antagonista del receptor CCR5 se administra por vía oral al sujeto al menos una vez al día. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 se administra por vía oral al sujeto una vez o dos veces al día. En otra realización, el antagonista del receptor CCR5 se administra por vía oral tres o menos veces al día.

Tabla 3. Pautas de dosificación de antagonistas del receptor CCR5 de molécula pequeña sometidos a ensayos clínicos

Compuesto	Dosificación <sup>a</sup>	Ensayo clínico
SCH-D	5-15 mg al día	Fase II
UK-427.857	300 mg al día o dos veces al día	Fase II y III
GW873140	50 - 1200 mg una vez al día, o 200 - 800 mg al día o dos veces al día	Fase II

**[0118]** Las dosificaciones se indican para los antagonistas de CCR5 en el sitio web [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov) patrocinado por el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID). La información de dosificación para GW873140 se obtuvo de Demarest y col. (2004).

**[0119]** Adicionalmente, en una realización de la presente invención, al sujeto va a administrársele al menos un agente antirretroviral anti-VIH-1. Desde la autorización del inhibidor de la transcriptasa inversa análogo de nucleósidos (NRTI) AZT (zidovudina) en 1987, el armamento contra el VIH-1 ha crecido a al menos 21 fármacos y profármacos que representan 4 clases de tratamiento: ocho NRTI, tres inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), nueve inhibidores de proteasa (PI) y un inhibidor de la fusión (FI) (véase la Tabla 4). En otra realización, el agente antirretroviral es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI), un inhibidor de proteasa (PI), un inhibidor de la fusión, o cualquier combinación de los mismos. En otras realizaciones, el al menos un agente antirretroviral es uno de los agentes enumerados en la Tabla 4 o cualquier combinación de estos agentes. Diversos agentes antirretrovirales se comercializan en combinaciones (véase la Tabla 5 para tales combinaciones y pautas de dosificación) para terapia más eficaz. En realizaciones de la presente invención, los agentes antirretrovirales van a administrarse al sujeto en cantidades mostradas en la Tabla 5. En una realización preferida, el agente antirretroviral es un NNRTI o un PI.

**[0120]** En otra realización de la presente invención, el sujeto no ha recibido tratamiento, es decir, el sujeto no ha recibido previamente tratamiento con ningún agente antirretroviral anti-VIH-1. En una realización preferida, el sujeto ha recibido tratamiento, es decir, el sujeto ya ha sido tratado y/o está recibiendo tratamiento con uno o más agentes antirretrovirales anti-VIH-1 tales como uno o más agentes enumerados en la Tabla 4.

Tabla 4. Inhibidores del VIH-1 autorizados

Inhibidor	Fabricante
Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI)	
Retrovir® (AZT)	GlaxoSmithKline
Epivir® (3TC)	GlaxoSmithKline
Emtriva® (emtricitabina)	Gilead Sciences

Inhibidor	Fabricante
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI)</b>	
Hived® (ddC)	Hoffmann-La Roche
Videx® (ddl)	Bristol-Myers Squibb
Viread® (tenofovir DF)	Gilead Sciences
Zerit® (d4T)	Bristol-Myers Squibb
Ziagen® (abacavir)	GlaxoSmithKline
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI)</b>	
Rescriptor® (delavirdina)	Pfizer
Sustiva® (efavirenz)	Bristol-Myers Squibb
Viramune® (nevirapina)	Boehringer Ingelheim
<b>Inhibidores de proteasa (PI)</b>	
Agenerase® (amprenavir)	GlaxoSmithKline/Vertex
Aptivus® (tipranivir) <sup>a</sup>	Boehringer Ingelheim
Crixivan® (indinavir)	Merck & Co.
Invirase® (saquinavir)	Hoffmann-La Roche
Lexiva® (fosamprenavir)	GlaxoSmithKline/Vertex
Lopinavir <sup>b</sup>	Abbott Laboratories
Norvir® (ritonavir)	Abbott Laboratories
Reyataz® (atazanavir)	Bristol-Myers Squibb
Viracept® (nelfinavir)	Pfizer
<b>Inhibidores de la fusión (FI)</b>	
Fuzeon® (T-20)	Trimeris/Hoffmann-La Roche

<sup>a</sup> Para ser co-administrado con ritonavir para reforzar los niveles terapéuticos de Aptivus®.

<sup>b</sup> Comercializado solo en combinación con ritonavir bajo el nombre comercial Kaletra®.

Tabla 5. Pautas de dosificación de agentes antivirales contra el VIH-1 comercializados

Nombre genérico	Marca/otro nombre	Dosificación*	Formulación	Fabricante	Fecha de autorización
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI)</b>					
Delavirdina	Rescriptor, DLV	400 (4x100 o 2x200) mg tid	Comprimido	Pfizer	04/04/97
Efavirenz	Sustiva, EFV	600 mg qd	Comprimido	Bristol-Myers Squibb	17/09/98
Nevirapina	Viramune, NVP	200 mg bid (qd las 2 primeras semanas de Rx)	Comprimido	Boehringer Ingelheim	21/06/96
<b>Inhibidores de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI)</b>					
Abacavir	Ziagen, ABC	600 (2x300) mg qd o 300 mg bid	Comprimido	GlaxoSmithKline	17/12/98
Abacavir, lamivudina	Epzicom	**600/300 mg qd	Comprimido	GlaxoSmithKline	02/08/04
Abacavir, lamivudina, zidovudina	Trizivir	**300/150/300 mg qd	Comprimido	GlaxoSmithKline	14/11/00

ES 2 438 019 T3

Nombre genérico	Marca/otro nombre	Dosificación*	Formulación	Fabricante	Fecha de autorización
Didanosina	Videx, ddl, Videx EC	400 mg qd ( $\geq$ 60 kg) o 250 mg qd (< 60 kg)	Cápsula de liberación retardada	Bristol-Myers Squibb	09/10/91; 31/10/00 (EC)
Emtricitabina	Emtriva, FTC, Coviracil	200 mg qd	Cápsula	Gilead Sciences	02/07/03
Emtricitabina Tenofovir DF	Truvada	**200/300 mg qd	Comprimido	Gilead Sciences	02/08/04
Lamivudina	Epivir, 3TC	300 mg qd o 150 mg bid	Comprimido	GlaxoSmithKline	17/11/95
Lamivudina, zidovudina	Combivir	**150/300 mg bid	Comprimido	GlaxoSmithKline	27/09/97
Estavudina	Zerit, d4T	40 mg bid ( $\geq$ 60kg) o 30 mg bid (< 60kg)	Cápsula	Bristol-Myers Squibb	24/06/94
Tenofovir DF	Viread, TDF	300 mg qd	Comprimido	Gilead Sciences	26/10/01
Zalcitabina	Hivid, ddC	0,750 mg tid	Comprimido	Hoffmann-La Roche	19/06/92
Zidovudina	Retrovir, AZT, ZDV	300 mg bid o 200 (2x100) mg tid	Comprimido o cápsula	GlaxoSmithKline	19/03/87
<b>Inhibidores de proteasa (PI)</b>					
Amprenavir	Agenerase, APV	1200 (8x150) mg bid	Cápsula	GSK, Vertex	15/04/99
Atazanavir	Reyataz, ATV	Pacientes sin tratamiento previo: 400 (2x200) mg qd Rescate: 300 (2x150) mg qd con ritonavir 100 mg qd	Cápsula	Bristol-Myers Squibb	20/06/03
Fosamprenavir	Lexiva, FPV	1400 (2x700) mg bid	Comprimido	GSK, Vertex	20/10/03
Indinavir	Crixivan, IDV	800 (2x400) mg tid	Cápsula	Merck	13/03/96
Lopinavir, ritonavir	Kaletra, LPV/r	**400/100 (3x133,3/33,3) mg bid	Cápsula	Abbott Laboratories	15/09/00
Nelfinavir	Viracept, NFV	1250 mg (5x250 o 2x 625) bid o 750 mg (3x250) tid	Comprimido	Agouron	14/03/97
Ritonavir	Norvir, RTV	600 (6x100) mg bid	Cápsula	Abbott Laboratories	01/03/96
Saquinavir	Fortovase, SQV	1200 (6x200) mg tid	Cápsula	Hoffmann-La Roche	07/11/97
	Invirase	1000 (5x200) mg bid con ritonavir 100 mg bid	Cápsula	Hoffmann-La Roche	06/12/95
Tipranavir	Aptivus	1000 (2x250) mg bid con ritonavir (2x100) mg bid	Cápsula	Boehringer Ingelheim	23/06/05
<b>Inhibidores de la fusión (FI)</b>					
Enfuvirtida	Fuzeon, T-20	sc: 90 mg (1 ml) bid	Disolución reconstituida	Hoffmann-La Roche, Trimeris	13/03/03

Nombre genérico	Marca/otro nombre	Dosificación*	Formulación	Fabricante	Fecha de autorización
<p>*Dosis para adulto sin ajustar para terapias de combinación; vía de bid= administración de dos veces al día: po a menos que se indique lo contrario</p> <p>** Terapias de combinación administradas en una única formulación</p> <p><u>Leyenda:</u>            qd=una vez al día            bid=dos veces al día            tid=tres veces al día            po=administración por vía oral            sc= administración subcutánea</p>					

5 **[0121]** La presente descripción desvela adicionalmente una composición de materia que comprende (a) un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, PRO 140) que (i) se une a un receptor CCR5 y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo (por ejemplo, cualquiera de SCH-D, UK-427.857, TAK-779, TAK-652, GW873140 y RANTES). La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. La presente descripción también desvela un procedimiento para determinar si un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, PRO 140) que (i) se une a un receptor CCR5 y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> se comporta o no sinérgicamente con un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo con respecto a inhibir la fusión del VIH-1 a células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, que comprende determinar la presencia o ausencia de tal sinergia según los procedimientos experimentales detallados más adelante. Finalmente, la presente descripción desvela un kit para realizar los presentes procedimientos que comprende, en compartimentos separados y preferentemente en formas fácilmente administrables, (a) un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, PRO 140) que (i) se une a un receptor CCR5 y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, y (b) un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo (por ejemplo, cualquiera de SCH-D, UK-427.857, TAK-779, TAK-652, GW873140 y RANTES). El anticuerpo y antagonista se mezclan cada uno preferentemente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

10 **[0122]** Los siguientes detalles experimentales se exponen para ayudar en un entendimiento de la materia de esta divulgación, pero no pretenden, y no deben interpretarse, que limitan de ningún modo las reivindicaciones que siguen después.

## 20 Detalles experimentales

### PARTE I (para fines ilustrativos)

#### 25 Materiales y procedimientos

#### **Compuestos y mAb**

30 **[0123]** Se preparó PRO 140 por expresión en células Sp2/0 usando un medio sin suero de hibridomas complementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se clarificó mAb en masa usando un filtro de 5,0 µm de profundidad (Sartorius, Goettingen, Alemania), seguido de pase sobre un filtro de calidad esterilizante de 0,2 µm (Sartorius). El mAb se purificó pasando primero sobre una columna de afinidad (columna de proteína A MabSelect, Amersham, Piscataway, NJ) y luego por cromatografía de intercambio iónico (resina de intercambio catiónico SP Sepharose, Amersham). PRO 140 se nanofiltró usando una cápsula Viresolve™ 10 Opticap NFP (Millipore, Billerica, MA) seguido de un filtro de 0,2 µm y se concentró/diafiltró sobre cartuchos de TFF desechables (Millipore). El mAb se pulió entonces sobre una columna de hidroxapatita (Bio-Rad, Hercules, CA), se concentró a 10 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato y se guardó a -70 °C o más frío antes de uso.

35 **[0124]** RANTES se compró de R&D Systems (Mineápolis, MN). El mAb anti-CCR5 2D7 se compró de BD Biosciences (nº de cat. 555993) y el mAb anti-CCR5 CTC5 se compró de R&D Systems (nº de cat. FAB 1802P).

#### Ensayo de RET

45 **[0125]** El ensayo de RET del VIH-1 se ha descrito en detalle previamente (Litwin y col., 1996). Brevemente, octadeciléster de fluoresceína (F18; Molecular Probes, Eugene, OR; 5 mg/ml en etanol) se diluyó 1:800 en medio de marcado DMEM (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% de suero bovino fetal (FBS; HyClone, Logan, UT) y se ajustó a una A<sub>506</sub> de 0,34 ± 10%. Se diluyó cloruro de octadecilrodamina B (R18; Molecular Probes; 10 mg/ml en etanol) 1:2050 en medio de marcado y se ajustó a una A<sub>565</sub> de 0,52 ± 10%. Ambos colorantes se diluyeron adicionalmente 2 veces mediante la adición a células en matraces T75-cm<sup>2</sup>. Se incubaron células HeLa-Env<sub>JRFL</sub> y CEM NKR-CCR5 durante la noche en medio de cultivo que contenía F18 y R18, respectivamente. Al día siguiente se eliminó el medio de células HeLa-Env<sub>JRFL</sub> y se añadieron 10 ml de EDTA 0,5 mM y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Se eliminó EDTA y el matraz se devolvió a la estufa de incubación durante otros 5 min seguido de golpecitos del matraz para mover las células. Se añadieron diez ml de PBS con 15% de SBF al matraz y el contenido se

transfirió a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml. La suspensión de células CEM NKR-CCR5 se añadió directamente a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml separado. Ambas líneas celulares se centrifugaron a 300 xg durante 5 min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 10 ml de PBS/15% de SBF. La etapa de centrifugación/lavado se repitió dos veces, después de la cual las células se contaron y las concentraciones se ajustaron a  $1,5 \times 10^6$  células/ml. Se sembraron diez  $\mu$ l de cada tipo de células (15.000 células) en los pocillos de una placa de 384 pocillos. Los compuestos inhibidores se añadieron inmediatamente después de llevar el volumen final del pocillo a 40  $\mu$ l, y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C. Los compuestos se probaron individualmente y en combinación a una relación molar o relación másica fija durante un intervalo de diluciones en serie. Las placas se leyeron entonces sobre un lector de placas de fluorescencia (Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Boston, MA) usando las combinaciones de filtros de excitación/emisión mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Combinaciones de filtros de excitación/emisión para ensayo de RET

Barrido nº	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
1	450 nm/50 nm	530 nm/25 nm
2	530 nm/25 nm	590 nm/35 nm
3	450 nm/50 nm	590 nm/35 nm

[0126] El “% de RET” se calculó según la siguiente fórmula después de restar las lecturas del fondo (blanco):

$$\% \text{ de RET} = 100 \times [(A_3 - (A_1 \times F_{\text{vertidas}}) - (A_2 \times R_{\text{vertidas}})) / A_2]$$

en la que:

$F_{\text{vertidas}}$  = células HeLa solas, barrido 3/barrido 1;  
 $R_{\text{vertidas}}$  = células CEM solas, barrido 3/barrido 2;  
 $A_1$  = Valor del barrido 1 para células HeLa y CEM en combinación;  
 $A_2$  = Valor del barrido 2 para células HeLa y CEM en combinación; y  
 $A_3$  = Valor del barrido 3 para células HeLa y CEM en combinación.

[0127] El “% de inhibición” se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times [(\% \text{ de RET máx} - \% \text{ de RET para pocillo de muestra}) / (\% \text{ de RET máx} - \% \text{ de RET mín})]$$

en la que:

% de RET máx = promedio de valores de % de RET para la combinación de células HeLa y CEM sin inhibidor añadido; y  
 % de RET mín = promedio de valores de % de RET para la combinación de células HeLa y CEM en presencia de 500 ng/ml del mAb Leu-3a (un anticuerpo que elige CD4 como diana y bloquea completamente la fusión en el ensayo de RET a esta concentración).

[0128] Los valores de inhibición al cincuenta por ciento ( $CI_{50}$ ) se determinaron ajustando los datos de inhibición con una ecuación de pendiente variable de cuatro parámetros no lineal (GraphPad Prism, 4.02; software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de inhibición superior e inferior se limitaron al 100% y 0%, respectivamente, para el ajuste a curva.

### Preparación de CMSP

[0129] La replicación del VIH-1 auténtico se mide en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas usando el clon del VIH-1 trópico para monocitos/macrófagos, JRFL (VIH-1<sub>JRFL</sub>), para estos estudios.

[0130] Se aíslan CMSP de 4 donantes separados (leucopaqüetes) por centrifugación en un gradiente de Ficoll. Las células CD8 se destruyen usando la mezcla de destrucción de CD8 RosetteSep (nº 15663, StemCell Research, Vancouver, BC). Las células se diluyen a  $4 \times 10^6$ /ml y se añaden en partes iguales a tres matraces T175-cm<sup>2</sup> y luego se estimulan mediante la adición de uno de los siguientes medios: medio IL-2 [RPMI 1640 (nº 10-040-CV, Cellgro, Herndon, VA), 10% de SBF (nº 35-010-CV), L-glutamina 2 mM (nº 25-005-CI), 100 U/ml de IL-2 (Sigma, St. Louis, MO)]; medio PHA 5: [medio IL-2 con 5  $\mu$ g/ml de fitohemaglutinina PHA-P (PHA) (nº L8754, Sigma, St. Louis, MO), filtrado]; o medio PHA 0,5: [medio IL-2 con 0,5  $\mu$ g/ml de PHA, filtrado]. Cada matraz recibe un total de 50-150 ml de medio. Los matraces se incuban durante 3 días a 37 °C, seguido de reunión del contenido antes de uso en el ensayo de infección.

### Valoración de virus

[0131] Se prueban diluciones en serie de virus por cuadruplicado sobre CMSP activadas ( $1,4 \times 10^5$  CMSP/pocillo).

El medio de valoración [medio IL-2 con 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (nº 30-002-CI, Cellgro)] se utiliza para valoraciones de virus. Se añaden cincuenta µl de virus diluidos a 100 µl de CMSP en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido de fondo plano (VWR nº 29442-054, Corning, Corning, NY) y las placas se incuban a 37 °C en una estufa de incubación con 5% de CO<sub>2</sub> humidificada. Después de 7 días se extraen 50 µl de cada pocillo y se prueban para niveles de virus por ELISA para antígeno p24 (Perkin Elmer, Boston, MA). El título de virus se determina mediante el procedimiento de Reed y Muench (Tabla 11, véase más adelante).

### Ensayo de neutralización

[0132] Se siembran CMSP estimuladas en pocillos de placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de  $1,4 \times 10^5$  células/pocillo. El virus se diluye a 2.000 DICT<sub>50</sub>/ml y se mezcla con 0,5 log<sub>10</sub> diluciones en serie de compuesto durante 1 h a 37 °C antes de la adición a las placas de células. La cantidad final de virus añadida por pocillo es 100 DICT<sub>50</sub>. La concentración de DMSO final en el ensayo es siempre del 0,5%, siempre que se estén probando inhibidores de molécula pequeña. Las placas se incuban a 37 °C durante 5 días, momento en el que se toma una alícuota de sobrenadante para ELISA para antígeno p24. Si los pocillos de control (virus sin inhibidor) presentan bajos niveles de antígeno p24, entonces las placas se llevan de nuevo a volumen completo con medio de valoración y se incuban durante 24 h adicionales.

### Análisis de datos

[0133] La actividad de neutralización se muestra representando el porcentaje de inhibición de la producción de antígeno p24 (después de restar valores de fondo de todos los puntos de datos) frente al log<sub>10</sub> concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición se deriva del siguiente modo  $[1 - (\text{niveles de p24 en presencia de fármaco/niveles de p24 en ausencia de fármaco})] \times 100$ . Los valores de CI<sub>50</sub> se determinan ajustando los datos de inhibición con una ecuación de pendiente variable de cuatro parámetros no lineal (GraphPad Prism, ver. 4.02; software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de inhibición superior e inferior se limitan al 100% y 0%, respectivamente, para el ajuste a curva.

### Estudio clínico de fase 1

[0134] Se trataron individuos en cohortes de dosis crecientes secuenciales de 5 sujetos (4 activos y 1 placebo) cada una y se evaluaron durante 120 días post-tratamiento. A una población de voluntarios masculinos sanos, es decir, sin infectar por el VIH-1, con hallazgos no anómalos en el examen físico, historia médica y ECG, de 19-50 de edad, se administró una única infusión intravenosa de PRO 140 (0,1, 0,5, 2,0 y 5,0 mg por kg de peso corporal). Las evaluaciones de seguridad consistieron en monitorizar lo siguiente: constantes vitales (tensión arterial, pulso, temperatura, etc.); hematología (hemoglobina, hematocrito, leucocitos, plaquetas, etc.); químicas del suero (AST/ALT, fosfatasa alcalina, BUN, creatinina, etc.); análisis de orina (pH, gravedad específica, proteína, glucosa, leucocitos, etc.); y ECG (12 derivaciones).

### Medición del recubrimiento de células CCR5 por PRO 140

[0135] Se combinaron especímenes de sangre completa por separado con los anticuerpos anti-CCR5 marcados con ficoeritrina indicados o con anticuerpos de control de isotipo apropiados. Se lisaron eritrocitos y los leucocitos se estabilizaron usando el sistema de reactivos ImmunoPrep (Beckman Coulter), y las células se analizaron en una estación de trabajo de citometría de flujo TQ Prep™ (Beckman Coulter). Los datos se expresaron como el porcentaje de células CCR5 con respecto a todas las células seleccionadas en el análisis. CTC5 es un anticuerpo anti-CCR5 que no compite con PRO 140. 2D7 es un anticuerpo anti-CCR5 que compite con PRO 140.

### Medición de concentraciones en suero de PRO 140

[0136] Los sueros se diluyeron según conviniera y se combinaron con células L1.2-CCR5, que son células prelinfoma B de ratón manipuladas para expresar establemente CCR5 humano. Con el fin de generar una curva patrón, se probó patrón de PRO 140 en paralelo a concentraciones que oscilaban de 0,062 a 4,0 µg/ml en 10% de suero humano normal (SHN). El 10% de SHN que no contiene PRO 140 se analizó como control negativo. Tras la incubación con muestras de prueba, las células se lavaron y se combinaron con un anticuerpo de oveja marcado con FITC contra IgG4 humana (The Binding Site Limited, nº de cat. AF009). Las células se lavaron de nuevo y se analizaron por citometría de flujo. La concentración de PRO 140 se determinó comparando la mediana de la intensidad de fluorescencia (IMF) de la muestra de prueba con valores de IMF de la curva patrón.

### Determinación de concentración de RANTES en plasma

[0137] El ensayo empleó el kit de inmunoensayo de RANTES humano Quantikine™ (R&D Systems, Mineápolis, MN). Brevemente, se recogió plasma pobre en plaquetas en tubos de CTAD/EDTA y se guardó a - 20 °C. Las muestras de prueba y el patrón de RANTES se añadieron a placas de microtitulación que se recubrieron previamente con un anticuerpo monoclonal de ratón para RANTES. Tras la incubación, las placas se lavaron y se pusieron en contacto con un anticuerpo policlonal anti-RANTES conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP).

Las placas se lavaron de nuevo antes de la adición de sustrato de tetrametilbencidina para detección colorimétrica. El límite inferior de cuantificación del ensayo fue 415 pg de RANTES/ml de plasma.

#### Resultados y discusión

**[0138]** PRO 140 es un mAb anti-CCR5 IgG4, $\kappa$  humanizado que se ha desarrollado para terapia contra el VIH-1. Se ha mostrado que este anticuerpo inhibe ampliamente y potentemente la fusión mediada por CCR5 del VIH-1 a células diana *in vitro*. PRO 140 también es altamente activo en un modelo de ratón hu-PBL-SCID terapéutico, y ahora están disponibles datos preliminares de un estudio clínico de fase 1a en sujetos humanos sanos.

#### Actividad antiviral *in vitro* de PRO 140

**[0139]** Se probaron PRO 140 murino y humanizado contra cuatro cepas aisladas del VIH-1 R5 primarias como se describe en los procedimientos. La Figura 1 muestra que PRO 140 tiene potente actividad antiviral *in vitro*, neutralizando una variedad de cepas R5 primarias con una  $CI_{90}$  de 3-4  $\mu$ g/ml. PRO 140 presentó actividad antiviral similar para el mAb murino, PA14, del que se deriva PRO 140.

#### Datos preliminares del estudio clínico de fase 1a

**[0140]** El objetivo primario del estudio de fase 1a fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de PRO 140 administrado como una dosis única en una pauta para cohorte de dosis crecientes en sujetos masculinos sanos. Los objetivos secundarios fueron (1) obtener información sobre la farmacocinética de PRO 140 intravenosamente administrado, y (2) obtener información de los efectos de PRO 140 sobre niveles en sangre de células CCR5<sup>+</sup> y quimiocinas.

#### Farmacocinética de PRO 140

**[0141]** Se trataron voluntarios masculinos sanos con una única infusión intravenosa de PRO 140 a niveles de dosis de 0,1, 0,5, 2,0 y 5,0 mg/kg. PRO 140 y placebo fueron generalmente bien tolerados sin cambios significativos en ECG y sin toxicidad limitante de la dosis.

**[0142]** Se recogió el suero post-tratamiento, se criopreservó y se analizó para niveles de PRO 140. Las concentraciones en suero pico oscilaron de 3 mg/ml a 0,1 mg/kg y 12 mg/ml a 0,5 mg/kg. Las concentraciones en suero permanecieron detectables (>400 ng/ml durante 5 días a 0,1 mg/kg, 21 días a 0,5 mg/kg y durante más de 60 días tras una única inyección de 2 mg/kg (Figura 7). Las concentraciones en suero de PRO 140 aumentaron proporcionalmente al nivel de dosis, y la tasa de eliminación fue similar a la de otros mAb humanizados. Los parámetros farmacocinéticos (PK) se determinaron usando WinNonLin (PharSight Corporation, Mountain View, CA) usando un modelo no compartimental, y se determinó que la semivida en suero terminal de PRO 140 era 10-12 días. Como era de esperar, ningún sujeto desarrolló anticuerpos para PRO 140 humanizado.

#### Recubrimiento y no destrucción de linfocitos CCR5 por PRO 140

**[0143]** Se trataron voluntarios masculinos sanos (n=4) con una única infusión intravenosa de PRO 140 a un nivel de dosis de 2 mg/kg. Durante los 60 días post-tratamiento, en los momentos indicados en la Figura 6, se recogió sangre y se analizó para niveles de linfocitos CCR5.

**[0144]** Tras el tratamiento con PRO 140, no hubo disminución en el número global de linfocitos CCR5 como se mide por la unión de CTC5; sin embargo, la unión del anticuerpo 2D7 disminuyó significativamente (Figura 6). La unión del fondo de los anticuerpos de control de isotipo permaneció invariable. Como la unión de CTC5 no disminuye por la presencia de PRO 140, los valores de CTC5-PE son una medida del número total de linfocitos CCR5 en circulación. Como 2D7 compite con PRO 140, los valores de 2D7-PE reflejan el número de linfocitos CCR5 que no están recubiertos con PRO 140.

**[0145]** Los datos indican que una única dosis de 2 mg/kg de PRO 140 recubre eficazmente linfocitos CCR5 sin destrucción celular durante dos semanas, y las células siguen parcialmente recubiertas durante >4 semanas. Además, el recubrimiento de CCR5 fue más prolongado en pacientes tratados con 5 mg/kg de PRO 140. Los datos indican que una única dosis de 5 mg/kg de PRO 140 recubre eficazmente linfocitos CCR5 sin destrucción celular y las células siguen parcialmente recubiertas durante >60 días (Figura 13). Como el recubrimiento de CCR5 es el mecanismo por el cual PRO 140 inhibe el VIH, podría esperarse que las cargas virales en individuos infectados por el VIH se redujeran de un modo temporal similar.

#### Efecto de PRO 140 sobre niveles de quimiocinas en plasma

**[0146]** Se trataron voluntarios masculinos sanos con una única infusión intravenosa de 0,1 mg/kg de PRO 140 (Cohorte 1), 0,5 mg/kg de PRO 140 (Cohorte 2) o placebo de correspondencia. El plasma se recogió post-tratamiento en los momentos indicados, se criopreservó y se analizó para niveles de RANTES, una quimiocina CC que sirve de ligando natural para CCR5. Los niveles de RANTES se midieron por ELISA en plasma agotado en

plaquetas pre-dosis y hasta 28 días post-dosis. Como se muestra en la Figura 8, no hubo cambio significativo en niveles de RANTES tras el tratamiento con PRO 140 ( $P > 0,14$  todas las veces). Estos datos están de acuerdo con hallazgos *in vitro* de que PRO 140 no antagoniza la función de CCR5. Los hallazgos sugieren que PRO 140 no tiene efectos inadecuados sobre la función inmune mediada por CCR5 en pacientes tratados.

[0147] Los resultados descritos en el presente documento indican que además de inhibir ampliamente y potentemente PRO 140 la entrada del VIH-1 mediada por CCR5 sin antagonismo de CCR5 u otros efectos secundarios inmunológicos en pruebas preclínicas, esto ha demostrado perfiles de tolerabilidad, PK e inmunológicos favorables en resultados preliminares de un estudio de fase 1a en curso en voluntarios sanos. Así, en muchos respectos, PRO 140 ofrece un perfil de producto novedoso y atractivo para terapia anti-VIH-1.

[0148] Además, las actividades del mAb anti-CCR5 son fundamentalmente distintas de, pero complementarias a, las de antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (véase la Tabla 2) que también están actualmente sometidos a ensayos clínicos humanos. Se ha mostrado recientemente que PRO 140 funciona sinérgicamente con antagonistas de CCR5 de no anticuerpo en inhibir la fusión del VIH-1 mediada por CCR5 a células diana. Por consiguiente, la terapia de combinación que comprende la administración de mAb anti-CCR5 y antagonistas de CCR5 de no anticuerpo puede ofrecer nuevos enfoques fuertemente eficaces para prevenir y tratar infección por el VIH-1.

## PARTE II

### Ejemplo 1: prueba de combinación de pro 140 e inhibidores de la entrada del VIH-1 en el ensayo de RET de fluorescencia

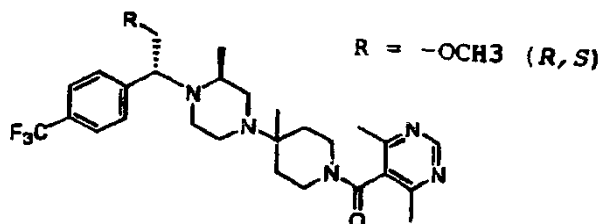
#### Materiales y procedimientos

#### Compuestos y mAb

[0149] Se preparó PRO 140 por expresión en células Sp2/0 usando medio sin suero de hibridomas complementado con L-glutamina 2 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se clarificó mAb en masa usando un filtro de 5,0  $\mu\text{m}$  de profundidad (Sartorius, Goettingen, Alemania), seguido de pase sobre un filtro de calidad esterilizante de 0,2  $\mu\text{m}$  (Sartorius). El mAb se purificó pasando primero sobre una columna de afinidad (columna de proteína A MabSelect, Amersham, Piscataway, NJ) y luego por cromatografía de intercambio iónico (resina de intercambio catiónico SP Sepharose, Amersham). PRO 140 se nanofiltró usando una cápsula Viresolve™ 10 Opticap NFP (Millipore, Billerica, MA) seguido de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$  y se concentró/diafiltró sobre cartuchos de TFF desechables (Millipore). El mAb se pulió entonces sobre una columna de hidroxipatita (Bio-Rad, Hercules, CA), se concentró a 10 mg/ml en solución salina tamponada con fosfato y se guardó a  $-70^\circ\text{C}$  o más frío antes de uso.

[0150] SCH-D (Schering Plough; Tagat y col., 2004), TAK-779 (Takeda Pharmaceuticals; Shiraishi y col., 2000), UK-427.857 (Pfizer; Wood y Armour, 2005) y BMS378806 (Bristol-Myers Squibb; Lin y col., 2003) se prepararon por fuentes comerciales.

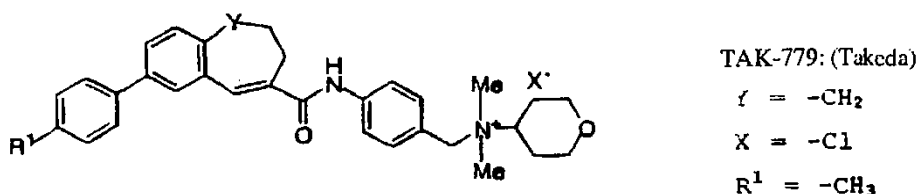
[0151] SCH-D tiene la siguiente estructura:



SCH-D (también se designa SCH-417690): 1-[(4,6-dimetil-5-pirimidinil)carbonil]-4-[4-[2-metoxi-1(R)-4-(trifluorometil)fenil]etil]-3(S)-metil-1-piperazinil]-4-metilpiperidina (Schering-Plough)

[0152] SCH-D se sintetizó según el procedimiento descrito en Tagat y col. (2004) y expuesto en la Figura 1.

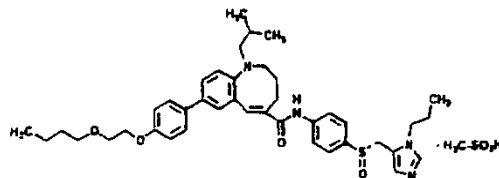
[0153] TAK-779 tiene la siguiente estructura:



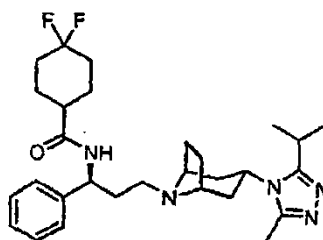


[0154] TAK-779 se sintetizó según el procedimiento descrito en Shiraishi y col. (2000) y expuesto en la Figura 2.

[0155] TAK-652 tiene la siguiente estructura:



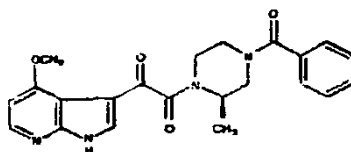
[0156] UK-427.857 tiene la siguiente estructura:



UK-427.857: (Pfizer)

[0157] UK-427.857 se sintetizó según el procedimiento descrito en la publicación internacional PCT nº WO 01/90106 y expuesto en la Figura 3.

[0158] BMS378806 tiene la siguiente estructura:



BMS378806: (R)-N-(benzoil)-3-metil-N'-[(4-metoxi-7-azaindol-3-il)-oxoacetil]-piperazina (Bristol-Myers Squibb)

[0159] Se sintetizó según el procedimiento descrito en la patente de EE.UU. nº 6.476.034 (compuesto 17a).

[0160] Nevirapina (Boehringer Ingelheim; Merluzzi y col., 1990) y atazanavir (Bristol-Myers Squibb; Robinson y col., 2000) se compraron de fuentes comerciales. PRO 542 se expresó en células de ovario de hámster chino y se purificó como se ha descrito previamente (Allaway y col., 1995). T-20 (Fuzeon®) se sintetizó por química de fluorenilmetoxicarbonilo en fase sólida, se purificó por cromatografía de fase inversa y se analizó para pureza y tamaño por HPLC y espectroscopía de masas como se ha descrito previamente (Nagashima y col., 2001). AZT se compró de Sigma Chemicals (St. Louis, Mo). RANTES se compró de R&D Systems (Mineápolis, MN). El mAb anti-CCR5 2D7 se compró de Pharmingen (San Diego, CA) y el mAb anti-CD4 Leu-3A se compró de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ).

[0161] Para las pruebas, compuestos de molécula pequeña se solubilizaron en sulfóxido de dimetilo (DMSO) a 10 mM y luego se diluyeron en DMSO a 200X la concentración final que iba a utilizarse en el ensayo antiviral. Se realizaron diluciones en serie de moléculas pequeñas en DMSO. Las posteriores diluciones se realizaron en medio para lograr una concentración de DMSO final en el ensayo del 0,5%. Los péptidos y mAb se diluyeron en PBS en ausencia de DMSO. Normalmente, las concentraciones de inhibidor en el ensayo de RET incluyeron once diluciones de 3 veces que oscilaban de 200 nM a 3,0 pM.

#### Preparación de células

[0162] Se manipularon células HeLa para expresar gp120/gp41 del VIH-1 de la cepa aislada primaria trópica para macrófagos JRFL como se ha descrito (HeLa-Env<sub>JRFL</sub>; Litwin y col., 1996). Brevemente, el gen de la Env del VIH-1<sub>LAI</sub> se escindió del plásmido pMA243 (Dragic y col., 1992) y se insertó el gen de la Env del VIH-1<sub>JRFL</sub>. El gen de la envuelta de VIH-1<sub>JRFL</sub> se amplificó a partir del plásmido pUCFL112-1 (Koyanagi y col., 1987). El plásmido resultante, designado JR-FL-pMA243, se secuenció mediante procedimientos convencionales y se transfectó en células HeLa usando Lipofectin (Gibco BRL/Invitrogen, Carlsbad, CA). Los transfectantes de HeLa-Env<sub>JRFL</sub> se seleccionaron en metrotrexato (Sigma, St. Louis, MO) y se clonaron dos veces por dilución limitante. Se obtuvieron células CEM NKR-

CCR5 de la línea de leucemia de linfocitos T humana transducida del Programa de Investigación y Referencia del SIDA de NIH (nº de cat. 458).

### Ensayo de RET

5  
10  
15  
20  
25

**[0163]** El ensayo de RET del VIH-1 se ha descrito en detalle previamente (Litwin y col., 1996). Brevemente, octadeciléster de fluoresceína (F18; Molecular Probes, Eugene, OR; 5 mg/ml en etanol) se diluyó 1:800 en medio de marcado DMEM (DMEM; Invitrogen, Carlsbad, CA) con 10% de suero bovino fetal (FBS; HyClone, Logan, UT) y se ajustó a una  $A_{506}$  de  $0,34 \pm 10\%$ . Se diluyó cloruro de octadecilrodamina B (R18; Molecular Probes; 10 mg/ml en etanol) 1:2050 en medio de marcado y se ajustó a una  $A_{565}$  de  $0,52 \pm 10\%$ . Ambos colorantes se diluyeron adicionalmente 2 veces mediante la adición a células en matraces T75-cm<sup>2</sup>. Se incubaron células HeLa-Env<sub>JRFL</sub> y CEM NKR-CCR5 durante la noche en medio de cultivo que contenía F18 y R18, respectivamente. Al día siguiente se eliminó el medio de células HeLa-Env<sub>JRFL</sub> y se añadieron 10 ml de EDTA 0,5 mM y se incubaron a 37 °C durante 5 min. Se eliminó EDTA y el matraz se devolvió a la estufa de incubación durante otros 5 min seguido de golpecitos del matraz para mover las células. Se añadieron diez ml de PBS con 15% de SBF al matraz y el contenido se transfirió a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml. La suspensión de células CEM NKR-CCR5 se añadió directamente a un tubo de centrífuga cónico de 50 ml separado. Ambas líneas celulares se centrifugaron a 300 xg durante 5 min. El sobrenadante se desechó y las células se resuspendieron en 10 ml de PBS/15% de SBF. La etapa de centrifugación/lavado se repitió dos veces, después de la cual las células se contaron y las concentraciones se ajustaron a  $1,5 \times 10^6$  células/ml. Se sembraron diez µl de cada tipo de células (15.000 células) en los pocillos de una placa de 384 pocillos. Los compuestos inhibidores se añadieron inmediatamente después de llevar el volumen final del pocillo a 40 µl, y las placas se incubaron durante 4 h a 37 °C. Los compuestos se probaron individualmente y en combinación a una relación molar o relación másica fija durante un intervalo de diluciones en serie. Las placas se leyeron entonces sobre un lector de placas de fluorescencia (Victor<sup>2</sup>, Perkin Elmer, Boston, MA) usando las combinaciones de filtros de excitación/emisión mostradas en la Tabla 6.

Tabla 6. Combinaciones de filtros de excitación/emisión para ensayo de RET

Barrido nº	Longitud de onda de excitación	Longitud de onda de emisión
1	450 nm/50 nm	530 nm/25 nm
2	530 nm/25 nm	590 nm/35 nm
3	450 nm/50 nm	590 nm/35 nm

30 **[0164]** El “% de RET” se calculó según la siguiente fórmula después de restar las lecturas del fondo (blanco):

$$\% \text{ de RET} = 100 \times [(A_3 - (A_1 \times F_{\text{vertidas}}) - (A_2 \times R_{\text{vertidas}})) / A_2]$$

en la que:

35  $F_{\text{vertidas}}$  = células HeLa solas, barrido 3/barrido 1;  
 $R_{\text{vertidas}}$  = células CEM solas, barrido 3/barrido 2;  
 $A_1$  = Valor del barrido 1 para células HeLa y CEM en combinación;  
 $A_2$  = Valor del barrido 2 para células HeLa y CEM en combinación; y  
 $A_3$  = Valor del barrido 3 para células HeLa y CEM en combinación.

40 **[0165]** El “% de inhibición” se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times [(\% \text{ de RET máx} - \% \text{ de RET para pocillo de muestra}) / (\% \text{ de RET máx} - \% \text{ de RET mín})]$$

45 en la que:

% de RET máx = promedio de valores de % de RET para la combinación de células HeLa y CEM sin inhibidor añadido; y  
 % de RET mín = promedio de valores de % de RET para la combinación de células HeLa y CEM en presencia de 500 ng/ml del mAb Leu-3a (un anticuerpo que elige CD4 como diana y bloquea completamente la fusión en el ensayo de RET a esta concentración).

55 **[0166]** Los valores de inhibición al cincuenta por ciento ( $CI_{50}$ ) se determinaron ajustando los datos de inhibición con una ecuación de pendiente variable de cuatro parámetros no lineal (GraphPad Prism, 4.02; software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de inhibición superior e inferior se limitaron al 100% y 0%, respectivamente, para el ajuste a curva.

### Determinaciones de sinergia

60 **[0167]** Los efectos de la inhibición cooperativa de combinaciones de fármacos se determinaron mediante el

procedimiento de Chou y Talalay (1984). Se generaron valores de  $CI_{50}$  para todas las combinaciones como se ha descrito anteriormente. Los valores del índice de combinación (IC) y de la reducción de dosis (RD) se calcularon según las siguientes fórmulas:

$$IC = \left( \frac{CI_{50} D_{comb1}}{CI_{50} D_{solo1}} \right) + \left( \frac{CI_{50} D_{comb2}}{CI_{50} D_{solo2}} \right) + \alpha \left( \frac{(CI_{50} D_{comb1})(CI_{50} D_{comb2})}{(CI_{50} D_{solo1})(CI_{50} D_{solo2})} \right)$$

5

$$RD \text{ (para el compuesto 1)} = (CI_{50} D_{solo1} / CI_{50} D_{comb1})$$

$$RD \text{ (para el compuesto 2)} = (CI_{50} D_{solo2} / CI_{50} D_{comb2})$$

en la que:

10

" $CI_{50} D_{comb1}$ " =  $CI_{50}$  del fármaco 1 en combinación con el fármaco 2;

" $CI_{50} D_{solo1}$ " =  $CI_{50}$  del fármaco 1 cuando se prueba solo;

" $CI_{50} D_{comb2}$ " =  $CI_{50}$  del fármaco 2 en combinación con el fármaco 1;

" $CI_{50} D_{solo2}$ " =  $CI_{50}$  del fármaco 2 cuando se prueba solo;

15

$\alpha = 0$  si los efectos de los dos fármacos son mutuamente exclusivos; y

$\alpha = 1$  si los efectos de los dos fármacos son mutuamente no exclusivos.

**[0168]** Se determina que combinaciones con  $IC < 1$  son sinérgicas, mientras que se determina que combinaciones con  $IC > 1$  son antagonistas. La aditividad se refleja en combinaciones para las que  $IC = 1$ .

20

**[0169]** Se calcularon los intervalos de confianza al noventa y cinco por ciento en Microsoft Excel usando la fórmula:

= Confianza(alfa,stdev,n)

En la que:

25

alfa = 0,05 (confianza del 95%);

stdev = desviación estándar de la media del conjunto de datos; y

n = número de duplicados.

## 30 Resultados

### **Preparación de inhibidores de la fusión de moléculas pequeñas**

**[0170]** Se prepararon SCH-D, TAK-779, UK-427.857 y BMS378806 por fuentes comerciales. Se realizaron las cantidades deseadas y la pureza por HPLC de los compuestos. La pureza de los compuestos se respaldó por los resultados obtenidos del análisis elemental, y las identidades de los productos se confirmaron por RMN de protones (protón y carbono-13) y/o datos de espectros de masas.

### **Interacciones sinérgicas reveladas por el ensayo de RET**

40

**[0171]** Se realizaron experimentos de sinergia usando el ensayo de fusión de RET de célula-célula para evaluar inicialmente las posibilidades de interacciones cooperativas entre PRO 140 e inhibidores de molécula pequeña y basados en péptidos de CCR5, CD4, gp120 del VIH-1 y gp41 del VIH-1. Los experimentos se extendieron entonces al anticuerpo monoclonal murino específico para CCR5, 2D7 (Wu y col., 1997).

45

**[0172]** Primero se realizaron los experimentos que miden la inhibición de la fusión mediada por la Env del VIH-1 usando combinaciones de PRO 140 con, respectivamente, el propio PRO 140, 3 antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (SCH-D, TAK-779, UK427857), el ligando de péptido natural de CCR5 (RANTES) y un mAb anti-CCR5 (2D7), un inhibidor basado en péptidos de gp41 (T-20), un inhibidor basado en proteínas de gp120 (PRO 542), un inhibidor de molécula pequeña de gp120 (BMS378806) y un mAb anti-CD4 (Leu3A). Las relaciones másicas de PRO 140 con otros inhibidores de la entrada oscilaron de 0,75 a 364. Los resultados se muestran en la Tabla 7.

50

Tabla 7. Valores del índice de combinación y de la reducción de dosis para la inhibición de la fusión mediada por la Env del VIH-1 con combinaciones de PRO 140 e inhibidores de la entrada

55

PRO 140 en combinación con: <sup>a</sup>	Nº de pruebas	Relaciones másicas de compuestos <sup>b</sup>	Inhibidor diana	IC medio <sup>c</sup>	Reducción de dosis media (PRO 140)	Reducción de dosis media (compuesto en combinación)
				Ensayo de fusión célula-célula		
PRO 140	9	1	CCR5	0,97 ± 0,08	2,07 ± 0,18	2,07 ± 0,18
TAK-779	8	282	CCR5	0,36 ± 0,10	4,10 ± 2,03	15,86 ± 7,10
SCH-D	9	279	CCR5	0,51 ± 0,05	4,21 ± 0,96	3,90 ± 0,71
UK-427.857	3	292	CCR5	0,59 ± 0,04	4,16 ± 0,41	2,98 ± 0,65

PRO 140 en combinación con: <sup>a</sup>	Nº de pruebas	Relaciones másicas de compuestos <sup>b</sup>	Inhibidor diana	IC medio <sup>c</sup>	Reducción de dosis media (PRO 140)	Reducción de dosis media (compuesto en combinación)
RANTES	4	19	CCR5	0,59 ± 0,08	4,13 ± 0,99	3,24 ± 1,06
2D7	2	1	CCR5	0,93 ± 0,04	1,87 ± 0,07	2,54 ± 0,13
T-20	7	33	gp41	0,84 ± 0,16	1,77 ± 0,40	7,47 ± 3,34
PRO 542	6	0,75	gp120	0,96 ± 0,17	1,59 ± 0,21	5,54 ± 1,49
BMS-378806	7	364	gp120	1,21 ± 0,21	1,64 ± 0,30	2,85 ± 0,76

<sup>a</sup> Se probaron compuestos a una relación molar 1:1.

<sup>b</sup> Masa de PRO 140/masa de otro inhibidor de la entrada del VIH-1 probados en combinación. Los pesos moleculares de los inhibidores son: PRO 140 ≈ 150.000 g/mol; SCH-D = 538 g/mol; TAK-779 = 531 g/mol (sal de clorhidrato); UK-427.857 = 514 g/mol; RANTES ≈ 7.800 g/mol; 2D7 ≈ 150.000 g/mol; T-20 = 4.492 g/mol; PRO 542 ≈ 200.000 g/mol; BMS-378806 = 412 g/mol.

<sup>c</sup> Índice de combinación al valor de CI<sub>50</sub>. La fórmula de IC mutuamente exclusiva ( $\alpha = 0$ ) se utilizó para PRO 140 en combinación con moléculas que se unen a CCR5, y la fórmula de IC mutuamente no exclusiva ( $\alpha = 1$ ) se utilizó para PRO 140 en combinación con moléculas que se unen a otras dianas (Chou y Rideout, 1991).

**[0173]** Dos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, SCH-D y TAK-779, se ensayaron en combinación. También se probó PRO 542, una proteína de fusión similar a anticuerpo recombinante en la que se han sustituido los dominios variables de la cadena pesada y ligera de IgG2 humana con los dominios D1D2 de CD4 humano, en combinación con el mAb anti-CD4, Leu-3A. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Otras combinaciones de fármacos probadas en el ensayo de RET para cooperatividad

Fármaco 1	Fármaco 2	Relaciones molares (Fármaco 1 a 2)	N	IC medio ± stdev <sup>a</sup>	RD media (Fármaco 1)	RD media (Fármaco 2)
SCH-D	TAK-779	1:1	4 <sup>b</sup>	1,12 ± 0,32	1,48 ± 0,96	4,31 ± 1,82
PRO 542	Leu-3A	22,9:1	2	16,9 ± 0,3	0,7 ± 0	0,16 ± 0

<sup>a</sup> Los valores de IC se calcularon usando la fórmula mutuamente exclusiva para SCH-D frente a TAK-779 (es decir, en la que  $\alpha = 0$ ) y la fórmula mutuamente no exclusiva para PRO 542 frente a Leu-3A (es decir, en la que  $\alpha = 1$ ; véanse los procedimientos).

<sup>b</sup> Se sacrificó un punto de dato anómalo del cálculo del IC medio y RD medias.

**[0174]** También se midió el efecto de variar las cantidades relativas de compuestos en las combinaciones sobre el nivel de cooperatividad. Se usaron relaciones molares de 5:1 y 1:5 de PRO 140. Los resultados se tabulan en la Tabla 9, y los valores de IC medios con intervalos de confianza del 95% se representan en la Figura 4 para los datos de relación molar 1:1. Además de PRO 140, la actividad inhibidora del mAb 2D7, un anticuerpo murino específico para CCR5 (Wu y col., 1997), también se probó en combinación con los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña y con RANTES usando el ensayo de RET fluorescente. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 9. Valores del índice de combinación y de la reducción de dosis para la inhibición de la fusión mediada por la Env del VIH-1 con combinaciones de PRO 140 e inhibidores de la entrada

PRO 140 en combinación con:	Relación <sup>a</sup>	Relaciones másicas de compuestos <sup>b</sup>	Índice de combinación medio <sup>c</sup>	Reducción de dosis media (PRO 140)	Reducción de dosis media (compuesto en combinación)
Ensayo de fusión célula-célula					
PRO 140	5:1	5	1,15 ± 0,09	1,05 ± 0,08	5,26 ± 0,41
PRO 140	1:5	0,2	1,09 ± 0,08	5,54 ± 0,38	1,10 ± 0,08
TAK-779	5:1	1410	0,57 ± 0,07	1,89 ± 0,14	33,59 ± 18,85
TAK-779	1:5	56,4	0,52 ± 0,20	5,58 ± 0,52	3,78 ± 1,95
SCH-D	5:1	1395	0,66 ± 0,10	1,92 ± 0,40	8,44 ± 1,27
SCH-D	1:5	55,8	0,69 ± 0,05	9,95 ± 2,03	1,73 ± 0,19
UK-427.857	5:1	1460	0,66 ± 0,11	2,00 ± 0,35	7,25 ± 2,19
UK-427.857	1:5	58,4	0,73 ± 0,05	11,31 ± 2,14	1,58 ± 0,17
RANTES	5:1	95	0,84 ± 0,14	1,63 ± 0,43	5,39 ± 1,13
RANTES	1:5	3,8	0,66 ± 0,06	13,64 ± 4,75	1,75 ± 0,28
T-20	5:1	165	1,10 ± 0,12	0,98 ± 0,11	31,85 ± 10,19
T-20	1:5	6,6	0,76 ± 0,27	2,93 ± 0,68	3,85 ± 1,50
PRO 542	5:1	3,75	1,13 ± 0,10	1,01 ± 0,07	15,73 ± 4,15
PRO 542	1:5	0,15	1,18 ± 0,17	2,83 ± 0,50	1,71 ± 0,29
BMS-378806	5:1	1820	1,12 ± 0,10	1,14 ± 0,06	8,88 ± 4,16
BMS-378806	1:5	72,8	1,55 ± 0,24	3,64 ± 0,73	1,07 ± 0,31

<sup>a</sup> Relación molar de PRO 140 con respecto a otro inhibidor de la entrada probados en combinación (n=3 para todos

PRO 140 en combinación con:	Relación <sup>a</sup>	Relaciones másicas de compuestos <sup>b</sup>	Índice de combinación medio <sup>c</sup>	de Reducción de dosis media (PRO 140)	de Reducción de dosis media (compuesto en combinación)
Ensayo de fusión célula-célula					
los resultados experimentales)					
<sup>b</sup> Masa de PRO 140/masa de otro inhibidor de la entrada del VIH-1 probados en combinación. Los pesos moleculares de los inhibidores son: PRO 140 ≈ 150.000 g/mol; SCH-D = 538 g/mol; TAK-779 = 531 g/mol (sal de clorhidrato); UK-427.857 = 514 g/mol; RANTES ≈ 7.800 g/mol; T-20 = 4.492 g/mol; PRO 542 ≈ 200.000 g/mol; BMS-378806 = 412 g/mol.					
<sup>c</sup> Índice de combinación al valor de CI <sub>50</sub> . La fórmula de IC mutuamente exclusiva ( $\alpha = 0$ ) se utilizó para PRO 140 en combinación con moléculas que se unen a CCR5, y la fórmula de IC mutuamente no exclusiva ( $\alpha = 1$ ) se utilizó para PRO 140 en combinación con moléculas que se unen a otras dianas (Chou y Rideout, 1991).					

Tabla 10. Valores del índice de combinación y de la reducción de dosis para la inhibición de la fusión mediada por la Env del VIH-1 con combinaciones de 2D7 e inhibidores de la entrada

2D7 en combinación con: <sup>a</sup>	Relaciones másicas de compuestos <sup>c</sup>	de Inhibidor diana	Índice de combinación medio <sup>b</sup>	de Reducción de dosis media (2D7)	de Reducción de dosis media (compuesto en combinación)
Ensayo de fusión célula-célula					
TAK-779	282	CCR5	0,15 ± 0,03	17,20 ± 3,23	11,95 ± 4,94
SCH-D	279	CCR5	0,57 ± 0,10	3,25 ± 0,56	4,04 ± 0,78
UK427857	292	CCR5	0,58 ± 0,03	2,45 ± 0,12	5,73 ± 0,54
RANTES	19	CCR5	0,62 ± 0,04	1,94 ± 0,08	10,18 ± 1,86
PRO 140	1	CCR5	0,93 ± 0,04	2,54 ± 0,13	1,87 ± 0,07

<sup>a</sup> Se probaron compuestos a una relación molar 1:1. (todos los datos son n=3 excepto para 2D7 y PRO 140, en los que n=2)

<sup>b</sup> Índice de combinación al valor de CI<sub>50</sub>. La fórmula de IC mutuamente exclusiva ( $\alpha = 0$ ) se utilizó para 2D7 en combinación con moléculas que se unen a CCR5 (Chou y Rideout, 1991).

<sup>c</sup> Masa de 2D7/masa de otro inhibidor de la entrada del VIH-1 probados en combinación. Los pesos moleculares de los inhibidores son: 2D7 ≈ 150.000 g/mol; SCH-D = 538 g/mol; TAK-779 = 531 g/mol (sal de clorhidrato); UK-427.857 = 514 g/mol; RANTES ≈ 7.800 g/mol.

5

## Ejemplo 2: prueba de combinación de pro 140 con inhibidores de molécula pequeña, de péptidos y de proteínas, y VIH-1 en el ensayo de partículas de pseudovirus del VIH-1 (VIH-1PP)

### Materiales y procedimientos

10

#### Preparación de pseudopartículas del VIH-1

15

[0175] Se generan pseudopartículas del VIH-1 (VIH-1pp) en células 293T por coexpresión transitoria de un plásmido NL4/3luc<sup>+</sup>env<sup>-</sup> basado en el VIH-1 y una construcción que codifica Env del VIH-1<sub>JRFL</sub>. El plásmido NL4/3luc<sup>+</sup>env<sup>-</sup> se obtuvo del Programa de Reactivos de Investigación y Referencia del SIDA de NIH (nº de cat. 3418), y la Env del VIH-1<sub>JRFL</sub> se insertó en el vector pcDNA3.1 (Invitrogen). Brevemente, células 293T se transfectan con fosfato de calcio con una relación 1:1 de vector indicador de NL4/3luc<sup>+</sup>env<sup>-</sup> y vector de expresión de Env en tampón HEPES (ProFection Mammalian Transfection Kit, Promega). Después de 16 h, el medio de transfección se aspira y se añade medio de cultivo celular fresco (DMEM con 10% de SBF, glutamina y antibióticos) y la incubación continúa a 37 °C durante 24-32 h adicionales. Los sobrenadantes de cultivo celular se recogen 48 h después de la transfección y se centrifugan a 1.400 rpm durante 10 min para sedimentar residuos de células. El sobrenadante viral se lleva a una concentración final del 5% sacarosa y se guarda en alícuotas a -80 °C.

20

#### Células

25

[0176] Se obtuvieron células U87-CD4-CCR5 del Programa de Investigación y Referencia del SIDA de NIH (nº de cat. 4035). Estas células se mantienen en medio de cultivo (DMEM con 10% de SBF, antibióticos y glutamina) que contiene 0,3 mg/ml de G418 y 0,5 mg/ml de puomicina. Las células se cultivan en matraces T175-cm<sup>2</sup> a 37 °C y se diluyen 1:5 cada 3-4 días. Para la preparación de placas de ensayo, las células se tripsinan y se siembran en pocillos de placas de poliestireno opacas de fondo plano tratadas con cultivo de tejido de 96 pocillos (Perkin Elmer, Boston, MA) a una densidad de 3 x 10<sup>3</sup> células/pocillo. Las placas se incuban durante no más de 4 h a 37 °C en una estufa de incubación con 5% de CO<sub>2</sub> humidificada antes de su uso en el ensayo de susceptibilidad a VIH-1pp.

30

#### Preparación de compuestos

35

[0177] Se añaden cincuenta µl de compuesto diluido a 4X la concentración final deseada por pocillo. Para compuestos solubilizados en DMSO, la 4X disolución madre contendrá 2% de DMSO (de forma que la concentración

de DMSO final en el ensayo sea siempre del 0,5% para moléculas pequeñas). En cada placa se incluyen pocillos de control que no recibieron compuesto. Además, se incluye un control de inhibición de AZT en cada ensayo. Los compuestos se prueban individualmente y a una relación molar o molar fija durante un amplio intervalo de concentraciones.

5

#### Adición de virus

[0178] Un vial de VIH-1pp en alícuotas congelado se descongela en un baño de agua a 37 °C y luego se dispone sobre hielo húmedo. El virus se diluye en medio de cultivo celular frío según sea necesario para lograr la concentración de virus final deseada en el ensayo de VIH-1pp (aproximadamente 10.000 unidades relativas de luz (url) por pocillo). Se añaden 50 µl de virus diluido por pocillo, llevando el volumen del pocillo final a 200 µl. Se incluyen un control de no virus (luminiscencia mínima o de fondo) y un control de no compuesto (luminiscencia máxima) en cada placa. Las placas se incuban durante 72 h a 37 °C en una estufa de incubación con 5% de CO<sub>2</sub> humidificada seguido de procesamiento para señal de luciferasa (véase más adelante).

15

#### Procesamiento en placa para ensayo de luciferasa

[0179] Se aspira medio de ensayo y se añaden 200 µl de PBS a cada pocillo. El PBS se aspira y se añaden 50 µl de 1X reactivo de lisis de células (Promega - n° de cat. E1531) a cada pocillo. Las placas de ensayo se congelan entonces durante al menos 2 h a -80 °C, seguido de descongelación a temperatura ambiente y mezcla vigorosa con un pipeteador eléctrico. Se transfieren 25 µl de cada pocillo a una placa de 96 pocillos opaca (Costar n° 3922). Se reúnen cuatro duplicados en el mismo pocillo sobre la placa opaca. Se añaden 100 µl de sustrato de luciferasa recientemente descongelado y reconstituido (sistema de ensayo de luciferasa, Promega - n° de cat. E1501) a cada pocillo de la placa con el pipeteador eléctrico, y la luminiscencia se detecta inmediatamente en un lector de placas Dynex MLX fijado a adquisición media.

25

#### Análisis de datos

[0180] La actividad de neutralización se muestra representando el porcentaje de inhibición de la actividad de luciferasa (después de restar los valores de url de fondo de todos los puntos de datos) frente al log<sub>10</sub> concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición se deriva del siguiente modo:  $[1 - (\text{actividad de luciferasa en presencia de fármaco} / \text{actividad de luciferasa en ausencia de fármaco})] \times 100$ . Los valores de CI<sub>50</sub> se determinan ajustando los datos de inhibición con una ecuación de pendiente variable de cuatro parámetros no lineal (GraphPad Prism, ver. 4.02; software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de inhibición superior e inferior se limitan al 100% y 0%, respectivamente, para el ajuste a curva.

35

#### Determinación de sinergia

[0181] Las interacciones cooperativas entre PRO 140 e inhibidores de molécula pequeña y basados en péptidos de CCR5, CD4, gp120 del VIH-1, gp41 del VIH-1 y transcriptasa inversa del VIH-1 (véanse las Tablas 4 y para enumeración de inhibidores del VIH-1 autorizados para uso clínico) se determinan como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los efectos de la inhibición cooperativa de combinaciones de fármacos se determinan mediante el procedimiento de Chou y Talalay (1984). Se generan valores de CI<sub>50</sub> para todas las combinaciones como se ha descrito anteriormente. Los valores del índice de combinación (IC) y de la reducción de dosis (RD) se calculan según las siguientes fórmulas:

45

$$IC = \left( \frac{CI_{50} D_{comb1}}{CI_{50} D_{solo1}} \right) + \left( \frac{CI_{50} D_{comb2}}{CI_{50} D_{solo2}} \right) + \alpha \left( \frac{(CI_{50} D_{comb1})(CI_{50} D_{comb2})}{(CI_{50} D_{solo1})(CI_{50} D_{solo2})} \right)$$

50

$$RD \text{ (para el compuesto 1)} = (CI_{50} D_{solo1} / CI_{50} D_{comb1})$$

$$RD \text{ (para el compuesto 2)} = (CI_{50} D_{solo2} / CI_{50} D_{comb2})$$

en la que:

55

"CI<sub>50</sub> D<sub>comb1</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 1 en combinación con el fármaco 2;

"CI<sub>50</sub> D<sub>solo1</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 1 cuando se prueba solo;

"CI<sub>50</sub> D<sub>comb2</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 2 en combinación con el fármaco 1;

"CI<sub>50</sub> D<sub>solo2</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 2 cuando se prueba solo;

α = 0 si los efectos de los dos fármacos son mutuamente exclusivos; y

60

α = 1 si los efectos de los dos fármacos son mutuamente no exclusivos.

[0182] Se determina que combinaciones con IC < 1 son sinérgicas, mientras que se determina que combinaciones con IC > 1 son antagonistas. La aditividad se refleja en combinaciones para las que IC = 1.

**Ejemplo 3: prueba de combinación de pro 140 con inhibidores de molécula pequeña, de péptidos y de proteínas en el ensayo de replicación de virus auténtico VIH-1**Materiales y procedimientos

5

**Preparación de CMSP**

**[0183]** La replicación del VIH-1 auténtico se mide en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) activadas usando el clon del VIH-1 trópico para monocitos/macrófagos, JRFL (VIH-1<sub>JRFL</sub>), para estos estudios.

10

**[0184]** Se aíslan CMSP de 4 donantes separados (leucopaqüetes) por centrifugación en un gradiente de Ficoll. Las células CD8 se destruyen usando la mezcla de destrucción de CD8 RosetteSep (n° 15663, StemCell Research, Vancouver, BC). Las células se diluyen a  $4 \times 10^6$ /ml y se añaden en partes iguales a tres matraces T175-cm<sup>2</sup> y luego se estimulan mediante la adición de uno de los siguientes medios: medio IL-2 [RPMI 1640 (n° 10-040-CV, Cellgro, Herndon, VA), 10% de SBF (n° 35-010-CV), L-glutamina 2 mM (n° 25-005-CI), 100 U/ml de IL-2 (Sigma, St. Louis, MO)]; medio PHA 5: [medio IL-2 con 5 ug/ml de fitohemaglutinina PHA-P (PHA) (n° L8754, Sigma, St. Louis, MO), filtrado]; o medio PHA 0,5: [medio IL-2 con 0,5 ug/ml de PHA, filtrado]. Cada matraz recibe un total de 50-150 ml de medio. Los matraces se incuban durante 3 días a 37 °C, seguido de reunión del contenido antes de uso en el ensayo de infección.

15

20

**Valoración de virus**

**[0185]** Se prueban diluciones en serie de virus por cuadruplicado sobre CMSP activadas ( $1,4 \times 10^5$  CMSP/pocillo). El medio de valoración [medio IL-2 con 100 UI/ml de penicilina/estreptomicina (n° 30-002-CI, Cellgro)] se utiliza para valoraciones de virus. Se añaden cincuenta µl de virus diluidos a 100 µl de CMSP en placas de 96 pocillos tratadas con cultivo de tejido de fondo plano (VWR n° 29442-054, Corning, Corning, NY) y las placas se incuban a 37 °C en una estufa de incubación con 5% de CO<sub>2</sub> humidificada. Después de 7 días se extraen 50 µl de cada pocillo y se prueban para niveles de virus por ELISA para antígeno p24 (Perkin Elmer, Boston, MA). El título de virus se determina mediante el procedimiento de Reed y Muench (Tabla 11).

25

30

**Ensayo de neutralización**

**[0186]** Se siembran CMSP estimuladas en pocillos de placas de fondo plano de 96 pocillos a una densidad de  $1,4 \times 10^5$  células/pocillo. El virus se diluye a 2.000 DICT<sub>50</sub>/ml y se mezcla con 0,5 log<sub>10</sub> diluciones en serie de compuesto durante 1 h a 37 °C antes de la adición a las placas de células. La cantidad final de virus añadida por pocillo es 100 DICT<sub>50</sub>. La concentración de DMSO final en el ensayo es siempre del 0,5%, siempre que se estén probando inhibidores de molécula pequeña. Las placas se incuban a 37 °C durante 5 días, momento en el que se toma una alícuota de sobrenadante para ELISA para antígeno p24. Si los pocillos de control (virus sin inhibidor) presentan bajos niveles de antígeno p24, entonces las placas se llevan de nuevo a volumen completo con medio de valoración y se incuban durante 24 h adicionales.

35

40

Tabla 11. Fórmula de Reed y Muench para calcular título de virus<sup>a</sup>

Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )
1	0,74	21	2,49	41	4,23	61	5,98
2	0,83	22	2,57	42	4,32	62	6,07
3	0,92	23	2,66	43	4,41	63	6,15
4	1,00	24	2,75	44	4,49	64	6,24
5	1,09	25	2,83	45	4,58	65	6,33
6	1,17	26	2,92	46	4,67	66	6,42
7	1,26	27	3,01	47	4,76	67	6,50
8	1,35	28	3,10	48	4,84	68	6,59
9	1,44	29	3,18	49	4,93	69	6,68
10	1,52	30	3,27	50	5,02	70	6,77
11	1,61	31	3,36	51	5,11	71	6,85
12	1,70	32	3,45	52	5,19	72	6,94
13	1,79	33	3,53	53	5,28	73	7,03
14	1,87	34	3,62	54	5,37	74	7,12
15	1,96	35	3,71	55	5,46	75	7,20

Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )	Nº de pocillos pos.	DICT <sub>50</sub> /ml (10 <sup>x</sup> )
16	2,05	36	3,80	56	5,54	76	7,29
17	2,14	37	3,88	57	5,63	77	7,38
18	2,22	38	3,97	58	5,72	78	7,47
19	2,31	39	4,06	59	5,81	79	7,55
20	2,40	40	4,15	60	5,89	80	7,64

<sup>a</sup> Para calcular el título de virus, primero multiplicar el número total de pocillos positivos por 2 (el diagrama se diseñó para ser usado con duplicados de 8), entonces buscar el título en DICT<sub>50</sub>/ml correspondiente y añadir 0,7 (la fórmula requiere la adición de un factor de dilución logarítmico).

### Análisis de datos

5 [0187] La actividad de neutralización se muestra representando el porcentaje de inhibición de la producción de antígeno p24 (después de restar valores de fondo de todos los puntos de datos) frente al log<sub>10</sub> concentración de fármaco. El porcentaje de inhibición se deriva del siguiente modo [1 - (niveles de p24 en presencia de fármaco/niveles de p24 en ausencia de fármaco)] x 100. Los valores de CI<sub>50</sub> se determinan ajustando los datos de inhibición con una ecuación de pendiente variable de cuatro parámetros no lineal (GraphPad Prism, ver. 4.02; software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de inhibición superior e inferior se limitan al 100% y 0%, respectivamente, para el ajuste a curva.

### Determinaciones de sinergia

15 [0188] Las interacciones cooperativas entre PRO 140 e inhibidores de molécula pequeña y basados en péptidos de CCR5, CD4, gp120 del VIH-1, gp41 del VIH-1, transcriptasa inversa del VIH-1 y proteasa del VIH-1 (Tabla 8) se determinan como se ha descrito en el Ejemplo 1. Los efectos de la inhibición cooperativa de combinaciones de fármacos se determinan mediante el procedimiento de Chou y Talalay (1984). Los valores de CI<sub>50</sub> se generan para todas las combinaciones como se ha descrito anteriormente. Los valores del índice de combinación (IC) y de la reducción de dosis (RD) se calculan según las siguientes fórmulas:

$$IC = \left( \frac{CI_{50} D_{comb1}}{CI_{50} D_{solo1}} \right) + \left( \frac{CI_{50} D_{comb2}}{CI_{50} D_{solo2}} \right) + \alpha \left( \frac{(CI_{50} D_{comb1})(CI_{50} D_{comb2})}{(CI_{50} D_{solo1})(CI_{50} D_{solo2})} \right)$$

$$RD \text{ (para el compuesto 1)} = (CI_{50} D_{solo1} / CI_{50} D_{comb1})$$

$$25 \quad RD \text{ (para el compuesto 2)} = (CI_{50} D_{solo2} / CI_{50} D_{comb2})$$

en la que:

30 "CI<sub>50</sub> D<sub>comb1</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 1 en combinación con el fármaco 2;  
 "CI<sub>50</sub> D<sub>solo1</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 1 cuando se prueba solo;  
 "CI<sub>50</sub> D<sub>comb2</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 2 en combinación con el fármaco 1;  
 "CI<sub>50</sub> D<sub>solo2</sub>" = CI<sub>50</sub> del fármaco 2 cuando se prueba solo;  
 α = 0 si los efectos de los dos fármacos son mutuamente exclusivos; y  
 α = 1 si los efectos de los dos fármacos son mutuamente no exclusivos.

[0189] Se determina que combinaciones con IC < 1 son sinérgicas, mientras que se determina que combinaciones con IC > 1 son antagonistas. La aditividad se refleja en combinaciones para las que IC = 1.

### Discusión

40 [0190] PRO 140 es un mAb específico para CCR5 que se ha desarrollado para terapia contra el VIH-1. Es una versión de IgG4,κ humanizada (véase la publicación internacional PCT nº WO 03/072766 publicada el 4 de septiembre de 2003) del anticuerpo murino, PA14 (Olson y col., 1999; publicación internacional PCT nº WO 00/35409 publicada el 20 de junio de 2000), que se une al receptor CCR5 sobre la superficie de una célula e inhibe la fusión mediada por CCR5 del VIH-1 a la célula. Los estudios descritos en el presente documento se refieren a probar la actividad antiviral de PRO 140 en combinación con inhibidores de molécula pequeña y de péptidos de infección por el VIH-1. Los datos generados a partir de esta prueba se analizaron para posibles efectos cooperativos sobre la inhibición de infección por el VIH-1.

50 [0191] En una serie de experimentos, la inhibición de la infección por el VIH-1 se ensayó usando un ensayo de



transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (RET) que mide la fusión de células efectoras (HeLa-Env<sub>JRFL</sub>) que expresan glucoproteínas de la envuelta (Env) de JRFL de la cepa del VIH-1 recombinante a células diana (CEM NKR-CCR5) que expresan CD4 y CCR5 (Litwin y col., 1996). En este ensayo, células efectoras se marcan con el colorante F18 y células diana con el colorante R18. La fusión mediada por la Env del VIH-1 de células efectoras y diana produce la disposición de estos dos colorantes en estrecha proximidad en la membrana celular. Cuando F18 se excita a su longitud de onda óptima (450 nm), emite luz a una longitud de onda (530 nm) que excitará R18 cuando los dos colorantes están co-localizados en la misma membrana, produciendo emisión específica de R18 a 590 nm. La susceptibilidad a fármaco se mide añadiendo concentraciones en serie de fármacos a células diana antes de la adición de células efectoras. La inhibición de la fusión medida por la Env del VIH-1 se refleja en una reducción en la emisión de fluorescencia debido a R18 de un modo dependiente de la dosis, proporcionando una medida cuantitativa de la actividad de fármaco.

**[0192]** Se realizaron experimentos iniciales que miden la inhibición de la fusión mediada por la Env del VIH-1 con el fin de demostrar la robustez del sistema de ensayo para cuantificar las interacciones cooperativas. En estos experimentos, PRO 140 se ejecutó en combinación consigo mismo, una combinación que debe producir valores del índice de combinación (IC) indicativos de interacciones aditivas. Usando la metodología de Chou y Talalay (1984), se toma que valores de IC de  $<1,0$ ,  $=1,0$  y  $>1,0$  indican interacciones sinérgicas, aditivas y antagonistas, respectivamente. De hecho, PRO 140 ejecutado en combinación consigo mismo volvió al valor de IC de  $0,97 \pm 0,08$  ( $n=9$ ; Tabla 7), que indica que el sistema de ensayo representó con exactitud esta interacción.

**[0193]** Entonces se realizaron los experimentos de sinergia entre PRO 140 y 3 antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (SCH-D, TAK-779, UK427857), un péptido (RANTES) y un mAb (2D7). Además, las interacciones cooperativas se midieron entre PRO 140 y T-20 (inhibidor basado en péptidos de gp41), PRO 542 (inhibidor basado en proteínas de gp120), BMS378806 (inhibidor de molécula pequeña de gp120) y Leu-3A (mAb anti-CD4).

**[0194]** Los resultados (véase la Tabla 7) revelaron una potente sinergia entre PRO 140 y los 3 antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, además de RANTES. Los valores de IC entre PRO 140 y estos antagonistas de CCR5 oscilaron de  $0,36 \pm 0,10$  a  $0,59 \pm 0,08$ . Los valores de reducción de dosis indicaron que el compuesto en combinación ejerció un efecto de aproximadamente 4 veces sobre la actividad de PRO 140, mientras que el efecto de PRO 140 sobre el compuesto en combinación osciló de aproximadamente 3 a aproximadamente 16 veces (Tabla 7). Se observó de sinergia modesta a aditividad entre PRO 140 y T-20, PRO 542, BMS-378806 y 2D7 ( $IC = 0,84 \pm 0,16$ ,  $0,96 \pm 0,17$ ,  $1,21 \pm 0,21$  y  $0,93 \pm 0,04$ , respectivamente).

**[0195]** Los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña ejecutados en combinación (SCH-D y TAK-779) volvieron al valor de IC medio de  $1,12 \pm 0,32$ , que indica una interacción ligeramente aditiva (Tabla 8). En cambio, la combinación de la proteína de fusión PRO 542 similar a anticuerpo recombinante con el mAb anti-CD4, Leu-3A, produjo un valor de IC medio de  $16,9 \pm 0,3$ , que indica potente antagonismo entre estos dos inhibidores del VIH-1 (Tabla 8).

**[0196]** Variar las relaciones molares de compuestos demostró patrones similares de cooperatividad. A relaciones molares de tanto 5:1 como 1:5 de PRO 140 a SCH-D, TAK-779, UK-427.857 y RANTES se observó la potente inhibición sinérgica de la entrada mediada por la Env del VIH-1 (Tabla 9). Esto representa un amplio intervalo de relaciones másicas de inhibidor, desde un mínimo de 0,15 hasta un máximo de 1.820. Los valores de IC entre PRO 140 y antagonistas de CCR5 oscilaron de  $0,52 \pm 0,20$  a  $0,84 \pm 0,14$ . Se observó de sinergia más modesta a aditividad para combinaciones de PRO 140 con T-20, PRO 542 o BMS-378806. Los resultados de estas investigaciones identifican claramente las potentes actividades sinérgicas de PRO 140 con antagonistas de CCR5, además de sinergia más modesta entre PRO 140 y T-20 (véase la Figura 4).

**[0197]** También se probó la actividad inhibitora del VIH-1 del mAb murino específico para CCR5, 2D7, en combinación con los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña y con RANTES usando el ensayo de RET fluorescente. Se encontró que 2D7 actuaba sinérgicamente con estos antagonistas de CCR5 y con RANTES (Tabla 10). Los valores de IC entre 2D7 y estos antagonistas de CCR5 oscilaron de  $0,15 \pm 0,03$  a  $0,62 \pm 0,04$ . Los valores de reducción de dosis indicaron que el compuesto en combinación ejerció un efecto de aproximadamente 2 a 3 veces sobre la actividad de 2D7, excepto para TAK-779, que tuvo un efecto de aproximadamente 17 veces sobre la actividad de 2D7. El efecto de 2D7 sobre el compuesto en combinación osciló de aproximadamente 2 a aproximadamente 12 veces (Tabla 10). Como se ha observado previamente, PRO 140 y 2D7 en combinación fueron esencialmente aditivos o modestamente sinérgicos ( $IC = 0,93 \pm 0,04$ ).

**[0198]** Estos resultados indican que la inhibición sinérgica de la fusión célula-célula mediada por la Env del VIH-1 se observa entre múltiples mAb y moléculas pequeñas que se unen a CCR5. Esta propiedad puede aplicarse ampliamente a mAb que eligen CCR5 como diana, que incluyen, por ejemplo, el mAb CCR5mAb004 que se ha mostrado que se une a y antagoniza CCR5 y bloquea la entrada del VIH-1 en un ensayo de fusión célula-célula (Roschke y col., 2004). Se ha identificado un gran número y creciente de moléculas pequeñas como antagonistas de CCR5 (véase la Tabla 12). Algunos de estos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña pueden también producir inhibición sinérgica de la fusión medida por la Env del VIH-1 en combinación con PRO 140 y otros mAb anti-CCR5.

[0199] Un enfoque alternativo para examinar interacciones sinérgicas utiliza un ensayo de fusión virus-célula como se ha descrito previamente (Nagashima y col., 2001; Trkola y col., 1998). En este ensayo, un factor genómico del VIH (pNLuc<sup>+</sup>Env) que contiene un gen indicador de luciferasa se pseudotipa con la Env del VIH-1<sub>JRFL</sub>. Las partículas de virus pseudotipadas recombinantes se usan para infectar células U87 que expresan CD4 y CCR5 (U87-CD4-CCR5). La producción de luciferasa en células diana depende de la entrada del virus y la completitud de una ronda de replicación de virus. La susceptibilidad al fármaco se mide añadiendo concentraciones en serie de fármacos a células diana antes de la adición de partículas de virus pseudotipadas. La inhibición de la entrada del virus se refleja en una reducción en la actividad de luciferasa de un modo dependiente de la dosis, proporcionando una medida cuantitativa de la susceptibilidad al fármaco. Como el vector genómico del VIH requiere expresión de transcriptasa inversa funcional del VIH-1 (RT) para accionar la expresión de luciferasa, este ensayo de pseudovirus también es sensible a inhibición por inhibidores de la transcriptasa inversa de nucleótido/nucleósido (NRTI) e inhibidores de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI). Como tal, el ensayo de VIH-1pp es adecuado para examinar las interacciones cooperativas entre PRO 140 e inhibidores de molécula pequeña, de péptidos y de proteínas de CCR5, CD4, gp120 del VIH-1, gp41 del VIH-1 y transcriptasa inversa del VIH-1.

Tabla 12. Antagonistas de CCR5 de molécula pequeña

Antagonista de CCR5 de molécula pequeña	Referencia
Pirrolidinas 1,3,4-trisustituidas	Kim y col., 2005
4-Piperidinil-2-fenil-1-(fenilsulfonilamino)-butanos modificados	Shah y col., 2005
Anibamina·TFA, ofiobolina C y 19,20-epoxicitocalasina Q	Jayasuriya y col., 2004
5-(Piperidin-1-il)-3-fenil-penrilsulfonas	Shankaran y col., 2004a
Antagonistas de ácido 4-(heteroarilpiperidin-1-il-metil)-pirrolidin-1-il-acético	Shankaran y col., 2004b
Agentes que contienen cadenas laterales de 4-(pirazolil)piperidina	Shu y col., 2004
Agentes que contienen cadenas laterales de 4-(pirazolil)piperidina.	Shen y col., 2004a; 2004b
Análogos de ácido 3-(pirrolidin-1-il)propiónico	Lynch y col., 2003c
Ácido [2-(R)-[N-metil-N-(1-(R)-3-(S)-((4-(3-bencil-1-etil-(1H)-pirazol-5-il)piperidin-1-il)metil)-4-(S)-(3-fluorofenil)ciclopent-1-il)amino]-3-metilbutanoico (MRK-1)]	Kumar y col., 2003
Pirrolidinas 1,3,4-trisustituidas que llevan cadenas laterales de piperidina sustituidas con 4-aminoheterociclo	Willoughby y col., 2003; Lynch y col., 2003a; Lynch y col., 2003b; Hale y col., 2002
Isoxazolidinas bicíclicas	Lynch y col., 2002
Síntesis combinatoria de antagonistas de CCR5	Willoughby y col., 2001
Compuestos que contienen heterociclos	Kim y col., 2001b
Antagonistas que contienen hidantoínas	Kim y col., 2001a
Pirrolidinas 1,3,4-trisustituidas	Hale y col., 2001
1-[N-(metil)-N-(fenilsulfonil)amino]-2-(fenil)-4-(4-(N-(alquil)-N-(benciloxicarbonil)amino)piperidin-1-il)butanos	Finke y col., 2001
Compuestos de la planta <i>Lippia alva</i>	Hedge y col., 2004
Antagonistas de CCR5 basados en piperazina	Tagat y col., 2004
Antagonistas de CCR5 basados en oximino-piperidino-piperidina	Palani y col., 2003b
Rotámeros de SCH 351125	Palani y col., 2003a
Antagonista de CCR5 de molécula pequeña	Referencia
Heteroarilcarboxamidas simétricas basadas en piperazina	McCombie y col., 2003
Oximino-piperidino-piperidin-amidas	Palani y col., 2002
Sch-351125 y Sch-350634	Este, 2002
SCH-C	Strizki y col., 2001
N1-óxido de 1-[(2,4-dimetil-3-piridinil)carbonil]-4-metil-4-[3(S)-metil-4-[1(S)-[4-(trifluorometil)fenil]etil]-1-piperazinil]-piperidina (Sch-350634)	Tagat y col., 2001a
N-óxido de 4-[(Z)-(4-bromofenil)-(etoxiimino)metil]-1'-[(2,4-dimetil-3-piridinil)carbonil]-4'-metil-1,4'-bipiperidina (SCH 351125)	Palani y col., 2001
2(S)-Metilpiperazinas	Tagat y col., 2001b
Derivados de piperidin-4-carboxamida	Imamura y col., 2005
Derivados de 1-benzazepina que contienen un resto sulfóxido	Seto y col., 2005

Antagonista de CCR5 de molécula pequeña	Referencia
Derivados de anilida que contienen un resto N-óxido de piridina	Seto y col., 2004a
Derivados de 1,1-dióxido de 1-benzotiepina y 1-benzazepina que contienen un resto amina terciaria	Seto y col., 2004b
N-[3-(4-bencilpiperidin-1-il)propil]-N,N'-difenilureas	Imamura y col., 2004a
Derivados de 5-oxopirrolidin-3-carboxamida	Imamura y col., 2004b
Derivados de anilida con un resto amonio cuaternario	Shiraishi y col., 2000
AK602/ONO4128/GW873140	Nakata y col., 2005
Derivados de espirodicetopiperazina	Maeda y col., 2001; Maeda y col., 2004
Antagonistas de CCR5 selectivos	Thoma y col., 2004

**[0200]** Un tercer enfoque para examinar sinergia antiviral utiliza un ensayo de virus completos. La cooperatividad entre todas las clases de moléculas inhibitoras puede examinarse en este formato de ensayo.

5 **[0201]** En tanto el ensayo de luciferasa de fusión de virus-célula como el ensayo de virus completos se generan valores de  $CI_{50}$  para todas las combinaciones como se ha descrito en el presente documento para el ensayo de RET. Los efectos de la inhibición cooperativa de combinaciones de fármacos se determinan mediante el procedimiento de Chou y Talalay (1984).

10 **[0202]** PRO 140 inhibió ampliamente y potentemente la entrada del VIH-1 mediada por CCR5 sin antagonismo de CCR5 u otros efectos secundarios inmunológicos en las pruebas preclínicas. Más recientemente, PRO 140 ha demostrado perfiles de tolerabilidad, PK e inmunológicos favorables en resultados preliminares de un estudio de fase 1a en curso en voluntarios sanos. Así, en muchos aspectos, PRO 140 ofrece un perfil de producto novedoso y atractivo para terapia anti-VIH-1. Además, las actividades del mAb anti-CCR5 son fundamentalmente distintas de, pero complementarias a, las de antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (véase la Tabla 2).

15 **[0203]** Podría haberse esperado que combinaciones del mAb anti-CCR5 y antagonistas de CCR5 de no anticuerpo produjeran efectos aditivos en la inhibición de la fusión del VIH-1 a células  $CD4^+CCR5^+$  diana ya que ambas clases de agentes se unen a la misma molécula diana. Sorprendentemente, sin embargo, los datos presentados en el presente documento revelan que mAb anti-CCR5, ejemplificados por PRO 140 y 2D7, presentaron sinergia potente y reproducible con antagonistas de CCR5 de no anticuerpo, ejemplificados por SCH-D, TAK-779, UK-427.857 y RANTES, en inhibir la fusión célula-célula mediada por la Env del VIH-1. Las sinergias se tradujeron rutinariamente en reducciones de dosis de 4 a 10 veces, sugiriendo mejora significativa en la potencia inhibitora para las combinaciones de fármacos. A diferencia, se observaron efectos puramente aditivos para combinaciones de antagonistas de CCR5 de no anticuerpo. Estos hallazgos probablemente reflejan los diferentes patrones de reconocimiento de CCR5 de estas moléculas: mientras que los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña se unen al bolsillo hidrófobo común dentro de los dominios transmembrana de CCR5, PRO 140 reconoce un epítipo extracelular hidrófilo de CCR5. En general, los datos respaldan el uso de PRO 140 en combinación con inhibidores de la entrada del VIH-1 de no anticuerpo y sugieren que PRO 140 representa una subclase distinta de inhibidor de CCR5.

20 **[0204]** Además, los datos disponibles sugieren que la sinergia observada también puede mostrarse por combinaciones que implican mAb anti-CCR5 distintos de PRO 140, que incluyen, pero no se limitan a, mAb CCR5mAb004 (Roschke y col., 2004), además de antagonistas de CCR5 de no anticuerpo distintos de SCH-D, TAK-779, UK-427.857 y RANTES. Así, estos anticuerpos probablemente producen efectos sinérgicos en combinación con GW873140 (Lalezari y col., 2004), TAK-652 (Baba y col., 2005) y al menos ciertos de los antagonistas de CCR5 de molécula pequeña enumerados en la Tabla 12. Por consiguiente, la terapia de combinación que comprende administración de mAb anti-CCR5 y antagonistas de CCR5 de no anticuerpo puede ofrecer nuevos enfoques poderosamente eficaces para prevenir y tratar infección por el VIH-1. Se espera que tal terapia produzca tratamientos anti-VIH-1 más potentes y más duraderos. Adicionalmente, los efectos sinérgicos descritos en el presente documento pueden permitir una reducción en las dosificaciones de fármacos administradas a un sujeto, además de una reducción en la frecuencia de dosificación.

#### Ejemplo 4: pautas de dosis de carga y de mantenimiento

45 **[0205]** La pauta de carga que puede, por ejemplo, ser más sensible a dosis que la pauta de mantenimiento puede, por ejemplo, tener las siguientes características:

Número de dosis: 1 o más (hasta aproximadamente 5 dosis).

50 Nivel de dosis: Aproximadamente el 25%, 50%, 75%, 100%, 150% o 200% superior a la pauta de dosis de mantenimiento.

Frecuencia de dosis: Aproximadamente 1,5X, 2X, 3X o 4X más frecuentemente que la pauta de dosis de mantenimiento.

[0206] Como ejemplo, si la pauta de dosis de mantenimiento es 2 mg/kg cada dos semanas, la pauta de dosis de carga comprendería semanalmente 2 mg/kg de dosis. Alternativamente, la pauta de dosis de carga comprendería una única dosis de 4 mg/kg o múltiples dosis de 4 mg/kg a intervalos semanales o bisemanales.

[0207] La pauta de dosis de carga puede diseñarse, por ejemplo, de manera que acelere el logro de un estado estacionario farmacocinético en el sujeto, como se define por pico uniforme y mediante concentraciones de fármaco en sangre entre dosis. Una pauta de dosis de carga preferida puede determinarse por experimentación rutinaria en la que el fármaco se administra al sujeto por diferentes pautas de carga y de mantenimiento, y se miden niveles de fármaco en sangre.

[0208] Por tanto, en otra realización, PRO 140 se administra según una pauta de dosis fija tal como, por ejemplo, 75 mg, 150 mg, 300 mg y 600 mg por administración.

### PARTE III

#### Materiales y procedimientos

#### **Inhibidores**

[0209] PRO 140 se expresó en células de mamífero y se purificó por proteína A, cromatografías de intercambio iónico y de hidroxiapatita. UK-427.857 (Dorr y col. 2005), SCH-D (Tagat y col. 2004), TAK-779 (Baba y col. 1999), enfuvirtida (T-20 (Wild y col. 1992); BMS-378806 (Lin y col. 2003)) y PRO 542 (CD4-IgG2, (Allaway y col. 1995)) se prepararon según procedimientos publicados. Zidovudina (azidotimidina, AZT), RANTES, el mAb para CCR5 2D7 y el mAb para CD4 Leu-3A se compraron de Sigma Chemicals (St. Louis, MO), R&D Systems (Mineápolis, MN), Pharmingen (San Diego, CA) y Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ), respectivamente. UK-427.857 y SCH-D se radiomarcaron con tritio por GE Healthcare (Piscataway, NJ), y PRO 140 se conjugó con ficoeritrina (PE) por Southern Biotech, Inc. (Birmingham, AL).

#### **Ensayo de fusión de membranas del VIH-1**

[0210] La fusión de membranas mediada por la envuelta del VIH-1 se examinó usando un ensayo de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (RET) (Litwin y col. 1996) con modificaciones. Brevemente, células HeLa que expresan establemente gp120/gp41 del VIH-1<sub>JR-FL</sub> (Litwin y col. 1996) y células CEM.NKR-CCR5 (Programa de Reactivos de Investigación y Referencia del SIDA de NIH (Spenlehauer y col. 2001; Trkola y col. 1999)) se marcaron por separado durante la noche con octadeciléster de fluoresceína (F18; Molecular Probes, Eugene, OR) y octadeciléster de rodamina (R18; Molecular Probes), respectivamente. Las células se lavaron en solución salina tamponada con fosfato que contenía 15% de suero bovino fetal (SBF) y se co-sembraron a 15.000 células/pocillo en una placa de 384 pocillos. Se añadieron inhibidores, y las placas se incubaron en SBF más 0,5% de sulfóxido de dimetilo (DMSO) durante 4 h a 37 °C antes de la medida de RET usando un lector de placas Victor (Perkin-Elmer, Boston, MA) como se ha descrito previamente (Litwin y col. 1996). El mAb para CD4 Leu3a se usó como inhibidor de control, y el porcentaje de inhibición se calculó como: (RET en ausencia de inhibidor - RET en presencia de inhibidor)/(RET en ausencia de inhibidor - RET en presencia de Leu3a) × 100.

#### **Ensayo de pseudovirus del VIH-1**

[0211] Se derivó un vector auto-inactivante (SIN) del vector pNL4-30ΔEnv-luciferasa (Dragic y col. 1996) delecionando 507 pares de bases en la región U3 de la repetición del extremo largo 3' (LTR) de manera que se eliminara la caja TATA y los sitios de unión de factor de transcripción. Se insertó el promotor del citomegalovirus humano en la dirección 5' del gen luciferasa (luc) para permitir la expresión de luciferasa tras la integración.

[0212] Los virus indicadores pseudotipados con envueltas de VIH-1<sub>JR-FL</sub> o VIH-1<sub>SF162</sub> se generaron por cotransfección de células 293T con el vector SIN y el vector que expresa env de pcDNA apropiado como se describe previamente (Dragic y col. 1996). Se infectaron células U87-CD4-CCR5 (8.000/pocillo; Programa de Reactivos de Investigación y Referencia del SIDA de NIH) con 125-375 pg de pseudovirus del VIH-1 en placas de 384 pocillos en presencia o ausencia de inhibidor(es). Los cultivos se incubaron durante 72 h a 37 °C en DMEM que contenía 10% de suero bovino fetal, 1 mg/ml de puomicina, 0,3 mg/ml de geneticina, antibióticos y 0,5% de DMSO. La actividad de luciferasa (unidades relativas de luz o URL) se midió usando reactivo BrightGlo (Promega, Madison, WI) según las instrucciones del fabricante. El porcentaje de inhibición se calculó como: (1 - URL en presencia de inhibidor/URL en ausencia de inhibidor) × 100. Se usaron CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> para indicar las concentraciones respectivas requeridas para la inhibición del 50% y el 90% del VIH-1.

### Determinaciones de sinergia

[0213] El diseño experimental y el análisis de datos se basaron en el procedimiento de índice de combinación (IC) (Chou y col. 1991; Chou y col. 1984). Los compuestos se probaron individualmente y en combinación a una relación molar fija durante un intervalo de diluciones en serie. Los inhibidores de la entrada se combinaron en cantidades equimolares, mientras que se usó una relación molar 1:10 para PRO 140 en combinación con azidotimidina y nevirapina. Las curvas de respuesta a dosis se ajustaron usando una ecuación sigmoide de cuatro parámetros con valores de inhibición superior e inferior limitados al 100% y 0%, respectivamente, con el fin de calcular concentraciones requeridas para la inhibición del 50% ( $CI_{50}$ ) y el 90% ( $CI_{90}$ ) (GraphPad Prism, software GraphPad, San Diego, CA). Los valores de IC para inhibición del 50% ( $IC_{50}$ ) y el 90% ( $IC_{90}$ ) se calcularon como se ha descrito previamente (Chou y col. 1991; Chou y col. 1984). La fórmula de IC mutuamente exclusiva se usó para combinaciones de inhibidores de CCR5, mientras que la fórmula de IC mutuamente no exclusiva se utilizó para combinaciones de inhibidores con distintas dianas (Chou y col. 1991). Cada prueba se realizó de 4-12 veces. La sinergia, aditividad y antagonismo se indican por  $IC < 1$ ,  $IC = 1$  e  $IC > 1$ , respectivamente.

### Ensayos de unión por competición

[0214] Para examinar la inhibición de la unión de PRO 140, células CEM.NKR-CCR5 se suspendieron en solución salina tamponada con fosfato con 0,1% de azida de sodio (PBSA) y se incubaron con concentraciones variables de antagonistas de CCR5 sin marcar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se añadió azida para bloquear la internalización de CCR5 durante el ensayo. Las células se lavaron en PBSA y se incubaron con PRO 140-PE 5 nM durante 30 min antes del lavado y análisis por citometría de flujo usando un instrumento FACSCalibur (Becton Dickinson). El grado de unión de PRO 140-PE se midió en términos de tanto la intensidad media de fluorescencia (IMF) como el porcentaje de células seleccionadas para tinción positiva.

[0215] Para examinar la inhibición de la unión de UK-427.857, células CEM.NKR-CCR5 se pre-incubaron con inhibidores de CCR5 sin marcar como se ha descrito anteriormente antes de la adición de  $^3H$ -UK-427.857 2 nM durante 30 min adicionales. Las células se lavaron en PBSA y se lisaron con HCl 0,5 N antes del recuento por centelleo usando un instrumento Wallac1410. Un estudio adicional invirtió el orden de adición con el fin de examinar la estabilidad de la unión de UK-427.857 durante el transcurso del ensayo. Las células se pre-incubaron con  $^3H$ -UK-427.857 2 nM durante 30 min antes del lavado, adición de inhibidores sin marcar y procesamiento como se ha descrito anteriormente. Se usaron  $CE_{50}$  y  $CE_{90}$  para indicar las concentraciones de compuesto sin marcar requeridas para inhibir la unión del compuesto marcado el 50% y el 90%, respectivamente.

### Análisis estadísticos

[0216] Se usaron pruebas de la t bilaterales para probar los valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  medios para la hipótesis nula  $H_0$ :  $IC = 1$  (aditividad) usando el software GraphPad Prism. Los valores de P se corrigieron para múltiples comparaciones de  $\alpha = 0,05$  según el método de Bonferroni (Cudeck y O'Dell 1994), excluyendo la combinación vacía de PRO 140/PRO 140 que se incluyó como control de ensayo. En la corrección de Bonferroni,  $P = \alpha/n$  en la que n es el número de comparaciones. Se hicieron veintidós comparaciones de sinergia (11 compuestos  $\times$  2 valores de IC) basándose en los datos generados en el ensayo de fusión de membranas, produciendo un valor de P corregido de 0,0023. En el ensayo de pseudovirus, 32 comparaciones de sinergia (8 compuestos  $\times$  2 virus  $\times$  2 valores de IC) produjeron un valor de P corregido de 0,0016.

### Resultados

#### Inhibición de la fusión de membranas del VIH-1

[0217] PRO 140 y UK-427.857 se usaron individualmente y juntos para inhibir la fusión de membranas mediada por la envuelta del VIH-1<sub>JR-FL</sub> en el ensayo de fusión célula-célula de RET, y en la Fig. 15A se ilustran curvas de respuesta a dosis representativas para los agentes individuales y combinación. Aunque tanto PRO 140 como UK-427.857 bloquearon individualmente la fusión del VIH-1 a baja potencia nanomolar, la combinación fue significativamente más potente. En este ensayo, el 50% de inhibición se obtuvo usando PRO 140 2,9 nM solo, UK-427.857 5,0 nM usado solo, o 2,1 nM de la combinación (PRO 140 1,05 nM más UK-427.857 1,05 nM). Este efecto superior a aditivo es indicativo de sinergia antiviral entre los dos agentes. A diferencia, la combinación de SCH-D y UK-427.857 no fue más potente que los agentes individuales (Fig. 15B). En este ejemplo, las curvas de respuesta a dosis para los inhibidores individuales y la combinación se solaparon, requiriendo el 50% de inhibición UK-427.857 9,7 nM, SCH-D 5,5 nM y 6,1 nM de la combinación. Los datos sugieren efectos puramente aditivos para estos inhibidores.

[0218] Estos estudios se extendieron a inhibidores de CCR5 (TAK-779, RANTES y 2D7), gp120 (BMS-378806 y PRO 542) y gp41 (enfuvirtida) adicionales y se repitieron cuatro o más veces para cada condición. Los valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  se calcularon para cada condición y se promediaron a lo largo de los ensayos independientes. La cooperatividad se evaluó usando pruebas de la t para determinar si los valores de  $IC_{50}$  e  $IC_{90}$  fueron significativamente diferentes de uno. Como prueba de estos procedimientos, una combinación vacía de PRO

140/PRO 140 se examinó añadiendo PRO 140 a los pocillos de ensayo en dos adiciones separadas. Los valores de IC<sub>50</sub> e IC<sub>90</sub> para la combinación de PRO 140/PRO 140 fueron 0,96 y 0,97, respectivamente (Tabla 13); por tanto, se observaron efectos puramente aditivos para esta combinación vacía, como era de esperar.

5 Tabla 13. Valores de IC para la inhibición de la fusión de membranas mediada por la envuelta del VIH-1<sub>JR-FL</sub><sup>a</sup>

1º Inhibidor	Diana	CI <sub>50</sub> , nM	CI <sub>90</sub> , nM	2º Inhibidor	IC <sub>50</sub>	Valor de P	IC <sub>90</sub>	Valor de P
PRO 140	CCR5	2,5	8,6	PRO 140	0,97 ± 0,07	0,13	0,96 ± 0,14	0,37
UK-427.857	CCR5	5,3	27	PRO 140	0,61 ± 0,05	<0.0001	0,40 ± 0,06	<0.0001
SCH-D	CCR5	3,2	16	PRO 140	0,51 ± 0,05	<0.0001	0,36 ± 0,06	<0.0001
TAK-779	CCR5	11	>200	PRO 140	0,38 ± 0,08	<0.0001	N/A	N/A
RANTES	CCR5	2,4	38	PRO 140	0,59 ± 0,08	0,0022	0,43 ± 0,05	0.0002
RANTES	CCR5	2,4	38	UK-427.857	0,48 ± 0,03	0,0017	0,18 ± 0,01	<0.0001
SCH-D	CCR5	3,2	16	UK-427.857	0,86 ± 0,03	0,016	0,75 ± 0,02	0,0033
SCH-D	CCR5	3,2	16	TAK-779	1,3 ± 0,18	0,12	N/A	N/A
2D7	CCR5	3,7	58	PRO 140	1,0 ± 0,14	0,61	1,9 ± 0,61	0,024
enfuvirtida	gp41	8,6	66	PRO 140	0,84 ± 0,16	0,040	0,89 ± 0,20	0,19
PRO 542	gp120	8,9	91	PRO 140	0,96 ± 0,17	0,56	0,94 ± 0,19	0,45
BMS-378806	gp120	5,2	20	PRO 140	1,3 ± 0,19	0,0015	1,1 ± 0,22	0,19

<sup>a</sup> Resultados estadísticamente significativos (P<0,0023 después de la aplicación de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples) se indican en texto en cursiva. CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> indican valores para el 1º inhibidor. N/A = no aplicable; TAK-779 no alcanzó coherentemente el 90% de inhibición en el ensayo. Los valores de IC representan las medias y las desviaciones estándar de 4-12 ensayos independientes

[0219] Se observó potente sinergia para PRO 140 en combinación con cada uno de los tres antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (UK-427.857, SCH-D y TAK-779), y los hallazgos fueron estadísticamente significativos incluso cuando los datos se corrigieron para comparaciones múltiples mediante el método de Bonferroni (Tabla 13). Los valores de IC oscilaron de 0,36 a 0,61, y estas sinergias se tradujeron en reducciones de dosis que oscilan de 3 a 8 veces a lo largo de diferentes condiciones. Las sinergias fueron superiores al 90% de inhibición que al 50% de inhibición. La sinergia entre PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña fue robusta porque se observó a niveles de tanto el 50% como del 90% de inhibición en cada caso. La excepción fue TAK-779, que no medió en el 90% de inhibición cuando se usó individualmente y, por tanto, no se determinó una IC<sub>90</sub>. Similarmente se observó sinergia potente cuando RANTES se usó en combinación con tanto PRO 140 como UK-427.857 (Tabla 13). Pruebas adicionales examinaron combinaciones de dos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (SCH-D/UK-427.857 y SCH-D/TAK-779) o dos mAb para CCR5 (PRO 140/2D7). No se observó sinergia significativa para estas combinaciones, aunque los valores de IC<sub>90</sub> de SCH-D/UK-427.857 tendieron hacia la significancia. Los hallazgos están de acuerdo con observaciones previas de sitios de unión que se solapan para PRO 140 y 2D7 (Olson y col. 1999) y para SCH-D y TAK-779 (Seibert y col. 2006). PRO 140 también se probó en combinación con el inhibidor de la fusión de gp41 enfuvirtida y con los inhibidores de unión a gp120 PRO 542 y BMS-378806 (Tabla 13). Los valores de IC oscilaron de 0,84 a 1,28, y ninguna de estas combinaciones demostró sinergia que cumpliera los criterios para significancia estadística. Para la combinación PRO 140/BMS-378806 se observó un modesto antagonismo al 50%, pero no al 90% de inhibición. La significancia biológica de este resultado no está clara.

#### Inhibición de pseudovirus del VIH-1

[0220] Se usaron virus indicadores del VIH-1 de un único ciclo para examinar si los efectos sinérgicos se limitaron o no a la fusión célula-célula o si se extendieron o no a otros modos de entrada del VIH-1. Las señales en este ensayo requieren tanto la entrada viral como la transcripción inversa, de manera que tanto NRTI como NNRTI pueden incluirse en los análisis. Cada combinación se probó contra virus indicadores pseudotipados con envueltas del VIH-1<sub>JR-FL</sub> y VIH-1<sub>SF162</sub> en al menos 4 ensayos independientes por virus. Una combinación vacía de PRO 140/PRO 140 se incluyó de nuevo como control de ensayo, y demostró efectos aditivos contra tanto pseudovirus del VIH-1<sub>JR-FL</sub> como VIH-1<sub>SF162</sub>, como era de esperar (Tabla 14).

[0221] PRO 140 se sinergizó potentemente con tanto UK-427.857 como SCH-D en bloquear la fusión virus-célula, y los resultados cumplieron los criterios para significancia estadística. Se observaron niveles de sinergia comparables contra tanto pseudovirus del VIH-1<sub>JR-FL</sub> como del VIH-1<sub>SF162</sub> al 50% y 90% de inhibición (Tabla 14), oscilando los valores de IC de 0,18 a 0,64. Estas sinergias se tradujeron en reducciones de dosis que oscilan a 14 veces. Estos resultados concuerdan bien con aquellos obtenidos en el ensayo de fusión célula-célula (Tabla 13). Ni TAK-779 ni RANTES mediaron en la inhibición de alto nivel coherente de la entrada del pseudovirus del VIH-1 y, por tanto, estos compuestos no se incluyeron en este análisis (datos no mostrados).

Tabla 14: Valores de IC para inhibición de virus indicadores del VIH-1 pseudotipados con envueltas del VIH-1<sub>JR-FL</sub> y VIH-1<sub>SF162</sub><sup>a</sup>.

1º Inhibidor	Diana	Envuelta del VIH-1	CI <sub>50</sub> , nM	CI <sub>90</sub> , nM	2º Inhibidor	IC50	Valor de P	IC90	Valor de P
PRO 140	CCR5	JRFL	2,2	28	PRO 140	1,2 ± 0,32	0,16	0,90 ± 0,15	0,047
		SF162	1,3	20	PRO 140	1,0 ± 0,27	1,0	0,86 ± 0,33	0,21
SCH-D	CCR5	JRFL	2,4	44	PRO 140	0,47 ± 0,15	<0,001	0,18 ± 0,04	<0,001
		SF162	0,34	14	PRO 140	0,60 ± 0,17	<0,001	0,28 ± 0,11	<0,001
UK-427.857	CCR5	JRFL	7,4	46	PRO 140	0,44 ± 0,06	<0,001	0,24 ± 0,11	<0,001
		SF162	0,87	13	PRO 140	0,64 ± 0,07	<0,001	0,31 ± 0,11	<0,001
UK-427.857	CCR5	JRFL	7,4	46	SCH-D	0,71 ± 0,11	0,16	1,2 ± 0,15	0,32
		SF162	0,87	13	SCH-D	0,87 ± 0,06	0,19	0,86 ± 0,28	0,61
2D7	CCR5	JRFL	8,8	>200	PRO 140	1,5 ± 0,25	0,024	N/A	N/A
		SF162	2,2	74	PRO 140	1,1 ± 0,47	0,61	1,0 ± 0,16	0,65
PRO 542	gp120	JRFL	0,19	2,9	PRO 140	1,2 ± 0,32	0,22	1,0 ± 0,18	0,92
		SF162	0,36	7,1	PRO 140	0,98 ± 0,28	0,84	0,64 ± 0,26	0,010
BMS-378806	gp120	JRFL	1,2	11	PRO 140	1,2 ± 0,38	0,43	0,74 ± 0,23	0,059
		SF162	0,03	0,42	PRO 140	1,1 ± 0,28	0,36	0,82 ± 0,21	0,068
nevirapina	RT	JRFL	30	310	PRO 140	1,2 ± 0,38	0,36	0,73 ± 0,28	0,068
		SF162	42	280	PRO 140	1,2 ± 0,34	0,30	0,63 ± 0,19	0,033
zidovudina	RT	JRFL	140	1900	PRO 140	1,1 ± 0,38	0,37	0,85 ± 0,26	0,21
		SF162	86	2100	PRO 140	0,99 ± 0,27	0,91	1,0 ± 0,38	1,0

<sup>a</sup> Resultados estadísticamente significativos ( $P < 0,0016$  después de la aplicación de la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples) se indican en texto en cursiva. CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub> se refieren a valores para el 1º inhibidor. N/A = no aplicable; 2D7 no alcanzó coherentemente el 90% de inhibición en el ensayo. Los valores de IC representan las medias y las desviaciones de 4 o más ensayos independientes

5 [0222] Se observaron efectos aditivos para tanto las combinaciones UK-427.857/SCH-D como PRO 140/2D7 (Tabla 14). Similarmente, se observó aditividad para PRO 140 usado en combinación con los inhibidores de gp120 PRO 542 y BMS-378806. No se observó antagonismo para la combinación PRO 140/BMS-378806 contra ningún virus. En general, estos hallazgos están de acuerdo con aquellos observados para la fusión célula-célula. Por último lugar, se observaron efectos aditivos para PRO 140 en combinación con tanto zidovudina (NRTI) como nevirapina (NNRTI).

10 **Ensayos de unión por competición**

15 [0223] Como se ha descrito anteriormente, se observaron efectos antivirales aditivos para inhibidores que se sabe (PRO 140 y 2D7) o que se deduce (UK-427.857 y SCH-D) que compiten por la unión de CCR5; sin embargo, poco se sabe con respecto a la unión competitiva de compuestos sinérgicos (por ejemplo, PRO 140/UK-427.857 y PRO 140/SCH-D). Como la unión no competitiva proporciona un posible mecanismo de sinergia entre inhibidores de CCR5, esta cuestión se exploró usando formas marcadas de UK-427.857 y PRO 140.

20 [0224] Se usó citometría de flujo para examinar la inhibición de la unión de PRO 140-PE a células CEM.NRK.CCR5 por PRO 140 sin marcar, UK-427.857 y SCH-D. La unión de PRO 140-PE se inhibió eficientemente por PRO 140 sin marcar, como era de esperar. Se observó inhibición completa en términos de tanto valores de IMF (Fig. 16A) como el porcentaje de células seleccionadas para la unión positiva (Fig. 16B). La CE50 basada en datos de IMF fue 2,5 nM (Fig. 16A), y este valor se compara favorablemente con la CI50 antiviral de PRO 140 (Tablas 13 y 14). Como el porcentaje de células seleccionadas es una lectura de la inhibición esencialmente completa de la unión, se calculó un valor de CE90 como 17 nM, y este valor es similar a los valores de CI90 antivirales observados para PRO 140 (Tablas 13 y 14). 2D7 también inhibió completamente la unión de PRO 140-PE a CEM.NKR-CCR5. La especificidad por CCR5 de PRO 140-PE también se demostró por su incapacidad para unirse a células CEM.NKR parentales.

30 [0225] A diferencia, se observaron modestos niveles de inhibición para UK-427.857 y SCH-D (Fig. 16). Las concentraciones micromolares de UK-427.857 y SCH-D redujeron los valores de PRO 140-PE IMF el 50% o menos

(Fig. 16A). Más espectacularmente, UK-427.857 y SCH-D tuvieron poco impacto sobre el porcentaje de células seleccionadas para la unión positiva de PRO 140-PE (Fig. 16B). Los hallazgos sugieren que UK-427.857 y SCH-D reducen parcialmente el número de moléculas de PRO 140-PE unidas por célula; sin embargo, estos compuestos no reducen el número de células que se unen a cantidades medibles de PRO 140-PE. Por tanto, UK-427.857 y SCH-D representan antagonistas parciales de la unión de PRO 140, y este hallazgo proporciona un mecanismo para la sinergia antiviral observada entre PRO 140 y estos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña.

**[0226]** A continuación se examinó la inhibición de la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 por UK-427.857 sin marcar, SCH-D y PRO 140. La unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 a células CEM.NKR-CCR5 se inhibió eficazmente por UK-427.857 sin marcar (Fig. 17A). La CE50 para la unión fue 4,3 nM y es similar a los valores de CI50 antivirales observados para UK-427.857 (Tablas 13 y 14).

**[0227]** SCH-D también bloqueó la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 a niveles de fondo (Fig. 17A). Sin embargo, no hubo correlación entre la potencia antiviral de los compuestos y su potencia en bloquear la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857. Por ejemplo, mientras que SCH-D demostró potencia antiviral igual o ligeramente mayor que UK-427.857 (Tablas 13 y 14), SCH-D fue menos potente en el bloqueo de la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 (CE50 = 17 nM, Fig. 17A). Este resultado está de acuerdo con diferencias menores en los sitios de unión a CCR5 de estos compuestos.

**[0228]** Sorprendentemente, PRO 140 también bloqueó la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 a niveles de fondo (Fig. 17A), y este resultado contrasta con la modesta inhibición de la unión de PRO 140-PE por UK-427.857 (Fig. 16). PRO 140 inhibió la unión de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 con una CE50 de 14 nM, que es 5-10 veces superior a la CI50 antiviral de PRO 140 (Tablas 13 y 14).

**[0229]** Un experimento final examinó la estabilidad de la unión de UK-427.857 a células CEM.NKR-CCR5 en las condiciones del ensayo de competición. Para esto, células se pre-incubaron con  $^3\text{H}$ -UK-427.857 y luego se examinó la disociación en presencia de UK-427.857 sin marcar, SCH-D y PRO 140. Como se indica en la Fig. 17B, hubo disociación mínima de  $^3\text{H}$ -UK-427.857 durante 30 min a temperatura ambiente, y UK-427.857 no se desplazó por ninguno de PRO 140 o SCH-D. Por tanto, la incapacidad de UK-427.857 para competir eficazmente por la unión de PRO 140 a CCR5 (Fig. 16) no es debida a la rápida disociación de UK-427.857 de CCR5 durante la evolución del ensayo. Conjuntamente, los datos indican que PRO 140 puede unirse a CCR5 en presencia de UK-427.857 pre-unido.

### Discusión

**[0230]** Este estudio explora las interacciones entre mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña y examina combinaciones de fármacos de CCR5 que actualmente están en desarrollo para terapia contra el VIH-1. Sorprendentemente, se observó potente sinergia antiviral entre el mAb para CCR5 PRO 140 y cada uno de los tres antagonistas de CCR5 de molécula pequeña estructuralmente distintos. Coherentemente, se observó sinergia de alto nivel a través de sistemas de ensayo variables, cepas aisladas virales, células diana y niveles de inhibición. PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña fueron más potentemente sinérgicos cuando se usaron juntos en vez de en combinación con inhibidores que bloquean otras etapas de la entrada del VIH-1. A diferencia, se observaron efectos aditivos para combinaciones de dos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Los estudios de unión por competición revelaron patrones complejos y no recíprocos de la unión de CCR5 por mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña, y sugieren que las interacciones sinérgicas se producen al nivel de unión a receptor.

**[0231]** En este estudio se observó la robusta sinergia entre mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña. Se observó la potente sinergia para tanto fusión célula-célula como virus-célula, y hubo una buena concordancia de hallazgos en estos dos sistemas de ensayo bien establecidos. Se observaron niveles de sinergia comparables para PRO 140 en combinación con cada uno de los 3 antagonistas de CCR5 de molécula pequeña de series químicas sin relacionar. Además, se observó sinergia coherente para cada una de las dos envueltas del VIH-1 bien caracterizadas y dos células diana de CCR5. La sinergia aumentó con niveles crecientes de inhibición viral y se tradujo en reducciones de dosis *in vitro* de hasta 14 veces. Visto alternativamente, este grado de sinergia proporciona un aumento correspondiente en la presión antiviral a una concentración dada de fármacos, mejorándose así la supresión viral y retrasándose posiblemente la emergencia de virus resistentes a fármaco. Esto está respaldado por estudios preliminares que indican que el mAb y los inhibidores de CCR5 de molécula pequeña poseen patrones complementarios de resistencia viral (Kuhmann y col. 2004 y Marozsan y col. 2005). Los presentes hallazgos proporcionan una exposición razonada para exploración clínica de pautas que combinan mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña.

**[0232]** También se observó potente sinergia para RANTES usado en combinación con tanto UK-427.857 como PRO 140. Niveles endógenos de RANTES pueden proporcionar alguna protección contra la progresión de la enfermedad por el VIH-1 durante la infección natural (Garzino-Demo y col. 1999; Lui y col. 1999) y, por tanto, este hallazgo de sinergia tiene importantes y positivas implicaciones para terapias que eligen CCR5 como diana del VIH-1. La sinergia antiviral entre RANTES y PRO 140 no es sorprendente basándose en una observación anterior de que la señalización de RANTES no está bloqueada por concentraciones antivirales de PRO 140 murino (PA14) (Olson y col. 1999). La sinergia entre RANTES y UK-427.857 se explica menos fácilmente dado que UK-427.857 es un



potente antagonista de CCR5. Sin embargo, estos hallazgos están de acuerdo con observaciones previas de sinergia entre el antagonista de CCR5 de molécula pequeña SCH-C y aminooxipentano-RANTES (AOP-RANTES) (Tremblay y col. 2002), un derivado de RANTES que se ha evaluado como un posible microbicida tópico (Kawamura y col. 2000).

**[0233]** A diferencia de la robusta sinergia observada entre mAb y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, se observaron efectos aditivos para combinaciones de antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. La falta de cooperatividad está de acuerdo con el punto de vista de que estas moléculas compiten para unirse a un bolsillo común sobre CCR5 (Dragic y col. 2000; Nishikawa y col. 2005; Tsamis y col. 2003; Watson y col. 2005). Los estudios *in vitro* no proporcionan una base para combinar antagonistas de CCR5 de molécula pequeña en la clínica basada únicamente en la inhibición de virus natural.

**[0234]** Similarmente, no se observó potente sinergia entre PRO 140 e inhibidores de unión del VIH-1 (PRO 542 y BMS-378806), fusión (enfuvirtida) o transcriptasa inversa (zidovudina y nevirapina), y estos hallazgos enfatizan la significancia de la sinergia observada para PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Varios estudios previos han examinado interacciones entre diversos antagonistas de CCR5 de molécula pequeña (UK-427.857, SCH-C, TAK-220, TAK-652 y E913) y fármacos de cada una de las clases de tratamiento del VIH-1 existentes. La mayoría de los estudios (Tremblay y col. 2005 *Antivir. Ther.*; Tremblay y col. 2005 *Antimicrob. Agents Chemother.*; Tremblay y col. 2002), pero no todos (Dorr y col. 2005; Maeda y col. 2001), han informado de una amplia sinergia entre inhibidores de CCR5 y las otras clases de tratamiento para el VIH-1, y los divergentes resultados pueden reflejar diferencias en los compuestos y procedimientos usados para la prueba antiviral, además de diferencias en los procedimientos usados para análisis de datos. Cuando UK-427.857 se probó contra 20 agentes antirretrovirales autorizados, se observaron efectos aditivos en todos, excepto tres casos, en los que se informó de modesta sinergia (Dorr y col. 2005). Este resultado está de acuerdo con los presentes hallazgos para combinaciones de PRO 140 e inhibidores del VIH-1 que no eligen CCR5 como diana.

**[0235]** Sin pretender ligarse a la teoría, la sinergia entre fármacos anti-VIH-1 puede proceder de una variedad de mecanismos. En cultivos de virus mixtos, un compuesto puede inhibir virus resistentes a un segundo compuesto (Johnson y col. 1991), y las combinaciones de NRTI/NNRTI pueden vencer mecanismos de resistencia específicos mediados por RT (Basavapathruni y col. 2004; Borkow y col. 1999). Las interacciones metabólicas entre inhibidores pueden aumentar sus concentraciones de fármaco intracelular eficaces (Molla y col. 2002), y los inhibidores de la entrada sinérgicos pueden afectar etapas interdependientes en la cascada de entrada (Nagashima y col. 2001; Tremblay y col. 2000). El presente estudio examinó las envueltas virales clónicas en vez de poblaciones mixtas, y la naturaleza extracelular de la diana da razones en contra de interacciones metabólicas. Múltiples dominios de gp120 contribuyen a la unión de CCR5 (Cormier y col. 2002), pero actualmente no está claro si estas interacciones representan o no eventos separados o discretos durante la infección.

**[0236]** Los presentes hallazgos indican que la sinergia antiviral entre mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña pueden producirse al nivel de receptor. Como se trata anteriormente, mAb y moléculas pequeñas se unen a distintos sitios sobre CR5 (Dragic y col. 2000; Nishikawa y col. 2005; Tsamis y col. 2003; Olson y col. 1999; Watson y col. 2005). Cuando se pre-incubaban con células CCR5 en el presente estudio, PRO 140 bloqueó completamente la posterior unión de UK-427.857 al receptor; aunque las concentraciones de PRO 140 fueron superiores a aquellas necesarias para bloquear la entrada del VIH-1 en las mismas células. A diferencia, la pre-incubación de células CCR5 con concentraciones super-saturantes de UK-427.857 o SCH-D redujo la unión de PRO 140 el 50% o menos. Como posible explicación, PRO 140 podría reconocer conformeros de CCR5 que no son unidos por UK-427.857 o SCH-D. Aunque existe CCR5 de la superficie celular en múltiples conformaciones (Lee y col. 1999), parece poco probable que los antagonistas de molécula pequeña pudieran demostrar potente actividad antiviral a la vez que fallan en la unión a fracción significativa de CCR5 de la superficie celular. A este respecto, es importante observar que un fondo celular común (células CEM.NKR-CCRS) se usó para la unión por competición y estudios antivirales y, por tanto, los hallazgos no están relacionados con diferencias específicas para célula en la expresión de CCR5.

**[0237]** Sin pretender ligarse a la teoría, otra explicación plausible para los presentes hallazgos es que PRO 140 puede formar un complejo ternario con CCR5 unido a UK-427.857, y este complejo ternario proporciona una elevada barrera a la entrada del VIH-1. Dentro del contexto de este modelo, PRO 140 puede unirse a CCR5 unido a UK-427.857 algo menos eficazmente que CCR5 libre, como se ha evidenciado por la modesta reducción en la unión de PRO 140 en presencia de UK-427.857.

**[0238]** El procedimiento del índice de combinación se usa ampliamente para evaluar interacciones fármaco-fármaco. En este procedimiento, la cooperatividad frecuentemente se define basándose en valores de IC empíricos (por ejemplo, <0,9 para sinergia y >1,1 para antagonismo) independientemente de la variabilidad entre ensayos. Se realizan análisis estadísticos con poca frecuencia, e incluso más raramente son ajustes hechos para comparaciones múltiples. En ausencia de tales análisis hay elevada posibilidad de sobrestimar el número de combinaciones sinérgicas.

**[0239]** Se empleó un enfoque riguroso y conservativo para identificar efectos sinérgicos. Los valores de IC se

probaron para significancia estadística contra la hipótesis nula de aditividad (IC=1). Además, estos estudios determinaron 20-30 valores de IC diferentes por experimento (Tablas 13 y 14), como es común en estudios de sinergia. Con el fin de reducir las posibilidades de resultados positivos falsos, el nivel de significancia se redujo usando la corrección de Bonferroni. También se evaluó una combinación vacía como prueba de estos procedimientos para prueba antiviral y análisis de datos. Por tanto, se concluyó que las numerosas sinergias evidentes (IC < 0,9) podrían no distinguirse de la variación entre ensayos basándose en los datos disponibles. Sin embargo, a pesar de la rigurosa naturaleza de estos procedimientos, PRO 140 e inhibidores de molécula pequeña demostraron sinergia significativa bajo cada condición de prueba, dando credibilidad a este hallazgo. Las combinaciones con valores de IC que tendieron hacia la significancia en el presente estudio podrían explorarse en futuros estudios. Por ejemplo, los datos para la combinación de PRO 140/enfuvirtida sugirieron una modesta sinergia que tendió hacia la significancia; así, esta combinación también puede ser útil para tratar infección por el VIH-1.

**[0240]** Un conjunto creciente de datos indica que mAb y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña representan distintas subclases de inhibidores de CCR5, y pueden extraerse varios paralelismos importantes entre NRTI y NNRTI, por una parte, y entre mAb y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña, por otra parte. En cada caso hay distintos sitios de unión para los inhibidores sobre la proteína diana (transcriptasa inversa o CCR5). Un conjunto de inhibidores (NNRTI o antagonistas de CCR5 de molécula pequeña) actúa mediante mecanismos alostéricos, mientras que el otro conjunto (mAb para NRTI o CCR5) actúa de inhibidor competitivo. Al igual que NRTI y NNRTI, los mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña son sinérgicos y poseen patrones complementarios de resistencia viral *in vitro* en pruebas preliminares (Kuhmann y col. 2004; Marozsan y col. 2005). NRTI y NNRTI representan importantes clases de tratamiento y distintas aún cuando elijan como diana la misma proteína, y mAb e inhibidores de CCR5 de molécula pequeña pueden ofrecer similarmente distintas modalidades de tratamiento para el VIH-1.

## PARTE IV

### Materiales y procedimientos

**[0241]** Se prepararon PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña y/o se obtuvieron como se ha descrito en el presente documento anteriormente. Las cepas aisladas del VIH-1 R5 primarias JR-FL y Case C 1/85 (CC1/85) se pasaron semanalmente *in vitro* sobre células mononucleares de sangre periférica (CMSP) en presencia o ausencia de concentraciones progresivamente crecientes de PRO 140 o SCH-D, y los cultivos virales se examinaron para susceptibilidad a estos y otros inhibidores de CCR5. Para la prueba de susceptibilidad, los virus se cultivaron *in vitro* sobre CMSP estimuladas. En presencia y ausencia de fármaco diluido en serie, y el grado de replicación viral se determinó por ELISA de p24.

### Resultados

**[0242]** Para tanto JR-FL como CC1/85 se generaron variantes resistentes a fármaco en presencia de PRO 140 y SCH-D. En el pase 12, los mutantes de escape fueron aproximadamente de 10 a 100 veces menos susceptibles al fármaco usado para la selección. En cada caso, los mutantes de escape continuaron requiriendo CCR5 para la replicación sobre CMSP. Se observaron patrones de resistencia complementarios: mutantes de escape de SCH-D se inhibieron eficazmente por PRO 140 y mutantes de escape de PRO 140 se inhibieron eficazmente por SCH-D.

### Discusión

**[0243]** Los mutantes de escape de PRO 140 continúan requiriendo CCR5 para la entrada y siguen siendo susceptibles a antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Además, PRO 140 es activo contra virus resistentes a antagonistas de CCR5 de molécula pequeña. Estos hallazgos indican que PRO 140 y antagonistas de CCR5 de molécula pequeña pueden representar distintas subclases de inhibidores de CCR5.

### Referencias

#### **[0244]**

- Patente de EE.UU. n° 4.816.567, concedida el 28 de marzo de 1989 a Cabilly y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.225.539, concedida el 6 de julio de 1993 a Gregory Winter.
- Patente de EE.UU. n° 5.229.275, concedida el 20 de julio a 1993 a Goroff.
- Patente de EE.UU. n° 5.545.806, concedida el 13 de agosto de 1996 a Lonberg y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.545.807, concedida el 13 de agosto de 1996 a Surani y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.565.332, concedida el 15 de octubre de 1996 a Hoogenboom y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.567.610, concedida el 22 de octubre de 1996 a Borrebaeck y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.585.089, concedida el 17 de diciembre de 1996 a Queen y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.591.669, concedida el 7 de enero de 1997 a Krimpenfort y col.
- Patente de EE.UU. n° 5.693.761, concedida el 2 de diciembre de 1997 a Queen y col.
- Patente de EE.UU. n° 6.150.584, concedida el 21 de noviembre de 2000 a Kucherlapati y col.

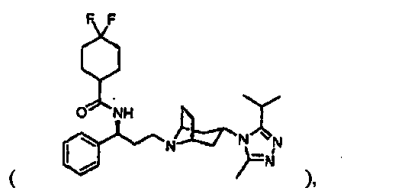
- Patente de EE.UU. nº 6.476.034 B2, concedida el 5 de noviembre de 2002 a Wang y col.  
 Patente de EE.UU. nº 6.759.519 B2, concedida el 6 de julio de 2004 a Li y col.  
 Publicación internacional PCT nº WO 90/07861, publicada el 26 de julio de 1990.  
 Publicación internacional PCT nº WO 00/35409, publicada el 22 de junio de 2000.  
 5 Publicación internacional PCT nº WO 01/55439, publicada el 2 de agosto de 2001.  
 Publicación internacional PCT nº WO 01/90106 A2, publicada el 29 de noviembre de 2001.  
 Publicación internacional PCT nº WO 02/22077, publicada el 21 de marzo de 2002.  
 Publicación internacional PCT nº WO 01/62255 A1, publicada el 30 de agosto de 2001.  
 Publicación internacional PCT nº WO 03/082289 A1, publicada el 9 de octubre de 2003.  
 10 Alkhatib, G. y col. (1996) *Science* 272:1955.  
 Allaway, G.P. y col. (1993) *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 9: 581-587.  
 Allaway, G.P. y col. (1995) *AIDS Research and Human Retroviruses.* 11: 533-539.  
 Baba, M. y col. (2005) 12ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Boston, MA, 22-25 de  
 febrero de 2005, Resumen 541.  
 15 Baba, M. y col. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 5698-5703.  
 Balotta, C. P. y col. (1997) *AIDS* 11: F67-F71.  
 Basavapathruni, A. y col. (2004) *J Biol Chem.* 279:6221-6224  
 Berger, E.A. (1997) *AIDS* 11 (Suppl A): S3-S16.  
 Bieniasz, P.D. and B.R. Cullen (1998) *Frontiers in Bioscience* 3: d44-58.  
 20 Biti, R., R. y col. (1997) *Nature Med.* 3: 252-253.  
 Borkow, G. y col. (1999) *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:259-263  
 Burkly, L. y col. (1992) *J. Immunol.* 149: 1779-1787.  
 Burkly, L. y col. (1995) *J. Virol.* 69: 4267-4273.  
 Choe, H. y col. (1996) *Cell* 85: 1135-1148.  
 25 Chou, T.C. and D.C. Rideout (1991) *Synergism and antagonism in chemotherapy.* Academic Press, Nueva  
 York.  
 Chou, T.C. and P. Talalay (1984) *Adv. Enzyme Regulation* 22:27-55.  
 Cocchi, F. y col. (1995) *Science* 270: 1811-1815.  
 Combadiere, C y col. (1996) *J. Leukocyte Biol.* 60: 147-152.  
 30 Connor, R.I. y col. (1997) *J. Exp. Med.* 185: 621-628.  
 Cormier, E. G. and T. Dragic (2002) *J Virol.* 76:8953-8957.  
 Cudeck, R. and L. L. ODeil (1994) *Psychol. Bull.* 115:475-487.  
 Dalglish, A.G. y col. (1984) *Nature* 312: 763-766.  
 Demarest, J. y col. (2004) 11ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Resumen 139. San  
 35 Francisco, CA, 8-11 de febrero de 2004.  
 Deng, H. y col. (1996) *Nature* 381: 661-666.  
 Dorr, P. y col. (2003) 10ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas, Boston, MA, 10-14 de  
 febrero de 2003, Documento nº 12.  
 Dorr, P. y col. (2005) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49:4721-4732. Dragic, T. y col. (1997)  
 40 *Advances in Research and Therapy* 7: 2-13.  
 Dragic, T. y col. (1992) *J. Virol.* 66: 4794-4802.  
 Dragic, T. y col. (1996) *Nature* 381: 667-673.  
 Dragic, T. y col. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5639-44.  
 Este JA. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs.* 3: 379-383.  
 45 Fatkenheuer, G. y col. (2005) *Nat Med* 11:1170-1172.  
 Feng, Y. y col. (1996) *Science* 272: 872-877.  
 Finke, P.E. y col. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2475-2479.  
 Garzino-Demo, A. y col. (1999) *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:11986-11991.  
 Hale, J.J. y col. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2741-2745.  
 50 Hale, J.J. y col. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 2997-3000.  
 Hegde, V.R. y col. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 5339-5342.  
 HGS Press Release (2004) Human Genome Sciences characterizes panel of novel human monoclonal  
 antibodies that specifically antagonize the CCR5 receptor and block HIV-1 entry. 2 de noviembre de 2004.  
 HGS Press Release (2005) Human Genome Sciences begins dosing of patients in a phase 1 clinical trial of  
 55 CCR5 mAb in patients infected with HIV-1. 30 de marzo de 2005.  
 Huang, Y. y col. (1996) *Nature Med.* 2: 1240-1243.  
 Huffnagle, G.B. y col. (1999) *Immunol.* 163: 4642-4646.  
 Y. Iizawa y col. (2003) 10ª Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Boston, MA, 10-14 de  
 febrero de 2003  
 60 Imamura, S. y col. (2004a) *Bioorg. Med. Chem.* 12: 2295-2306.  
 Imamura, S. y col. (2004b) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 52: 63-73.  
 Imamura, S. y col. (2005) *Bioorg. Med. Chem.* 13: 397-416.  
 Jayasuriya, H. y col. (2004) *J. Nat. Prod.* 67: 1036-1038.  
 Johnson, V. A. y col. (1991) *Journal of Infectious Diseases* 164:646-655.  
 65 Kawamura, T. y col. (2000) *J Exp Med.* 192:1491-1500.  
 Kuhmann, S. E. y col. (2004) *J Virol* 78:2790-2807.

- Ketas, T.J. y col. (2003) *J. Virol.* 77: 2762-2767.
- Kim D. y col. (2001a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 3099-3102.
- Kim D. y col. (2001b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 3103-3106.
- Kim D. y col. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 2129-2134.
- 5 Klatzmann, D. y col. (1984) *Nature* 312: 382-385.
- Koyanagi, Y. y col. (1987) *Science* 236: 819-822.
- Kuhmann, S.E. y col. (2004) *J. Virol.* 78: 2790-2807.
- Kumar, S y col. (2003) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304: 1161-1171.
- Laal, S. y col. (1994) *J. Virol.* 68: 4001-4008.
- 10 Lalezari, J.P. y col. (2003) *New Engl. J. of Med.* 348: 2175-2185.
- Lalezari, J. y col. (2004) 44<sup>a</sup> Conferencia Intercientífica anual sobre Agentes antimicrobianos y Quimioterapia, Resumen 2871, Washington, D.C., 30 de octubre – 2 de noviembre de 2004.
- Lalezari, J. y col. (2005) *AIDS* 19:1443-1448.
- Lapidot, T. (2001) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 938: 83-95.
- 15 Lazzarin, A. y col. (2003) *New Engl. J. Med.* 348: 2186.
- Lee, B. y col. (1999) *Journal of Biological Chemistry* 274:9617-9626.
- Li, A. y col. (1997) *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 13: 647-656.
- Li, A. y col. (1998) *J. Virol.* 72: 3235-3240.
- Lin, P.F. y col. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 11013-11018.
- 20 Lin, P.F. y col. (2002) 9<sup>a</sup> Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Seattle, WA, 24-28 de febrero de 2002
- Littman, D.R. (1998) *Cell* 93: 677-680.
- Litwin, V. y col. (1996) *J. Virol.* 70: 6437-6441.
- Liu, R. y col. (1996) *Cell* 86: 367-377.
- 25 Liu, H. y col. (1999) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:4581-4585
- Lynch, C.L. y col. (2003a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 3001-3004.
- Lynch, C.L. y col. (2003b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 119-123.
- Lynch, C.L. y col. (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12: 677-679.
- 30 Lynch, C.L. y col. (2003c) *Org. Lett.* 5: 2473-2475.
- Maddon, P.J. y col. (1986) *Cell* 47: 333-348.
- Maeda, K. y col. (2004) *J. Virol.* 78: 8654-8662.
- Maeda, K. y col. (2001) *J. Biol. Chem.* 276: 35194-35200.
- 35 Marozsan, A.J. y col. (2005) *Virology* 338: 182-199.
- McCombie, S.W. y col. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 567-571.
- McDougal, J.S. y col. (1986) *Science* 231: 382-385.
- Merluzzi, V.J. y col. (1990) *Science* 250: 1411-1413.
- Michael, N.L. y col. (1997) *Nature Med.* 3: 338-340.
- 40 Molla, A. y col. (2002) *Antimicrob. Agents Chemother.* 46:2249-2253.
- Moore, J.P., Q.J. Sattentau, P.J. Klasse and L.C. Burkly (1992) *J. Virol.* 66: 4784-4793.
- Nagashima, K.A. y col. (2001) *J. Infect. Dis.* 183: 1121-1125.
- Nakata, H. y col. (2005) *J. Virol.* 79: 2087-2096.
- Nishikawa, M. y col. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:4708-4715.
- 45 O'Brien, T.R. y col. (1997) *Lancet* 349: 1219.
- Olson, W.C y col. (1999) *J. Virol.* 73: 4145-4155.
- Olson, W.C. and P. J. Maddon (2003) *Current Drug Targets -Infectious Disorders* 3:283-294.
- Palani, A y col. (2002) *J. Med. Chem.* 45: 3143-3160.
- Palani, A y col. (2001) *J. Med. Chem.* 44: 3339-3342.
- 50 Palani, A y col. (2003a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 705-708.
- Palani, A y col. (2003b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 709-712.
- Palella, F. J. y col. (1998) *The New England Journal of Medicine* 338:853.
- Raport, C.J. y col. (1996) *J. Leukocyte Biol.* 59: 18-23.
- Ray, N. and R. W. Doms (2006) *Curr. Top. Microbiol Immunol.* 303:97-120.
- 55 Reyes, G. (2001) Development of CCR5 antagonists as a new class of anti-HTV therapeutic. 8<sup>a</sup> Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Chicago, IL, 5 de febrero de 2001.
- Reynes, J. y col. (2002) SCH C: Safety and antiviral effects of a CCR5 receptor antagonist in HIV-1 infected subjects. 9<sup>a</sup> Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Seattle, WA, 25 de febrero de 2002
- Robinson, B.S. y col. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 2093-2099.
- 60 Roschke, V. y col. (2004) 44<sup>a</sup> Conferencia Intercientífica anual sobre Agentes antimicrobianos y Quimioterapia, Resumen 2871, Washington, D.C., 30 de octubre – 2 de noviembre de 2004, Resumen n<sup>o</sup> 2871.
- Samson, M. y col. (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 24934-24941.
- Schecter, A.D. y col. (2000) *J. Biol. Chem.* 275: 5466-5471.
- Schols, D. y col. (1997) *J. Ex. Med.* 186: 1383-1388.
- 65 Schuh, J.M. y col. (2002) *FASEB J.* 16: 228-230.
- Schurmann, D. y col. (2004) Resumen 140LB, San Francisco, CA, 8-11 de febrero de 2004.

- Seibert, C. y col. (2006) *Virology* 349(1):41-54.
- Seto, M. y col. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 363-386.
- Seto, M. y col. (2004a) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 52: 818-829.
- Seto, M. y col. (2004b) *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. 52: 577-590.
- 5 Shah, S.K. y col. (2005) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15: 977-982.
- Shankaran, K. y col. (2004a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3589-3593.
- Shankaran, K. y col. (2004b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 3419-3424.
- Shen, D.M. y col. (2004a) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 935-939.
- Shen, D.M. y col. (2004b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 941-945.
- 10 Shiraishi, M. y col. (2000) *J. Med. Chem.* 43: 2049-2063.
- Shu, M. y col. (2004) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14: 947-52.
- Si, Z. y col. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 5036-5041.
- Simmons, G. y col. (1996) *J. Virol.* 70: 8355-8360.
- Spenlehauer, C. y col. (2001) *Virology* 280:292-300.
- 15 Strizki, J.M. y col. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 98:12718-12723.
- Tagat, J.R. y col. (2001a) *J. Med. Chem.* 44: 3343-3346.
- Tagat, J.R. y col. (2001b) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 2143-2146.
- Tagat, J.R. y col. (2004) *J. Med. Chem.* 47: 2405-2408.
- 20 Takashima, K. y col. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:374-3482.
- Thali, M. y col. (1992) *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 5: 591-599.
- Thoma, G. y col. (2004) *J. Med. Chem.* 47: 1939-1955.
- Tilley, S.A. y col. (1992) *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 8: 461-467.
- Tran, E.H. y col. (2000) *Eur. J. Immunol.* 30:1410-1415.
- Tremblay, C. y col. (2000) *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes and Human Retrovirology*  
25:99-102
- 25 Tremblay, C. L. y col. (2002) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1336-1339.
- Tremblay, C.L. y col. (2005) 12<sup>a</sup> Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas. Boston, MA, 22-25  
de febrero de 2005, Resumen 542.
- Tremblay, C. L. y col. (2005) *Antivir. Ther.* 10:967-968.
- 30 Tremblay, C. L. y col. (2005) *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:3483-3485.
- Trkola, A. y col. (2001) *J. Virol.* 75: 579-588.
- Trkola, A. y col. (1999) *Journal of Virology* 73:8966-8974.
- Trkola, A. y col. (1998) *J. Virol.* 72: 1876-1885.
- 35 Tsamis, F. y col. (2003) *Journal of Virology* 77:5201-5208.
- Vijh-Warrier, S. y col. (1996) *J. Virol.* 70:466-4473.
- Watson, C. y col. (2005) *Mol Pharmacol.* 67:1268-1282.
- Wild, C. y col. (1992) *PNAS* 89:10537-10541.
- Willoughby, C.A. y col. (2001) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11: 3137-41.
- Willoughby, C.A. y col. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13: 427-431.
- 40 Wu, L. y col. (1997) *J. Exp. Med.* 186: 1373-1381.
- Zhou, Y. y col. (1998) *J. Immunol.* 160: 4018-4025.
- Zhu, P. y col. (2001) *J. Virol.* 75: 6682-6686.

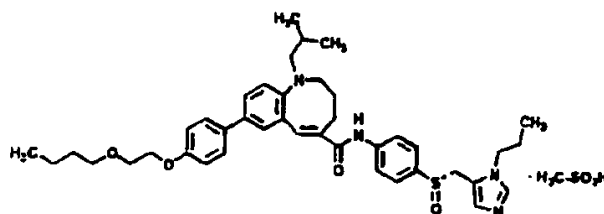
REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo monoclonal que (i) se une a un receptor CCR5 sobre la superficie de células CD4<sup>+</sup> de un sujeto y (ii) inhibe la fusión del VIH-1 a las células CCR5<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> del sujeto para su uso en un tratamiento para reducir la carga viral del VIH del sujeto  
 5 además de un antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo, en el que la carga viral del VIH-1 del sujeto se reduce al menos el 90% tras la administración del anticuerpo, y en el que la reducción se mantiene durante al menos dos semanas, cuyo anticuerpo va a administrarse a 0,5 mg por kg a 5 mg por kg de peso corporal del sujeto, en el que el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 o un anticuerpo que compite con la unión de PRO 140 al receptor CCR5,  
 10 en el que PRO 140 comprende (i) dos cadenas ligeras, comprendiendo cada cadena ligera el producto de expresión del plásmido designado pVK:HuPRO140-VK depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4097, y (ii) dos cadenas pesadas, comprendiendo cada cadena pesada el producto de expresión de tanto el plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4098 como el plásmido designado pVg4:HuPRO140 (mut B<sup>+</sup>D<sup>+</sup>I)-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4099, y  
 15 en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es una molécula orgánica pequeña.
2. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal y el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo van a administrarse simultáneamente.
3. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 y la cadena pesada de PRO 140 comprende el producto de expresión del plásmido designado pVg4:HuPRO140 HG2-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4098.
- 25 4. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es el anticuerpo humanizado designado PRO 140 y en el que la cadena pesada de PRO 140 comprende el producto de expresión del plásmido designado pVg4:HuPRO 140 (mut B+D+I)-VH depositado bajo la designación de depósito de la ATCC PTA-4099.
- 30 5. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo va a administrarse a un intervalo predefinido, y el intervalo predefinido es al menos una vez a la semana, cada dos a cuatro semanas, cada dos semanas, cada cuatro semanas, o al menos una vez al mes.
- 35 6. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1 ó 3, en el que el anticuerpo va a administrarse mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea.
7. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que el antagonista del receptor CCR5 de no anticuerpo es SCH-D (1-[(4,6-dimetil-5-pirimidinil)carbonil]-4-[4-[2-metoxi-1(R)-4-(trifluorometil)fenil]etil]-3(S)-metil-1-piperazinil]-4-metilpiperidina), UK-427.857
- 40



TAK-779 ( R<sup>1</sup> = -CH<sub>3</sub>),

en la que Y = -CH<sub>2</sub>, X = -Cl,



TAK-652 ( )

45 o GW873140.

8. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 1, en el que al sujeto va a administrarse adicionalmente al menos un agente antirretroviral adicional.

5 9. El anticuerpo para su uso según la reivindicación 8, en el que el agente antirretroviral es un inhibidor de la transcriptasa inversa no nucleósido (NNRTI), un inhibidor de la transcriptasa inversa nucleósido (NRTI), un inhibidor de proteasa (PI), un inhibidor de la fusión, o cualquier combinación de los mismos.

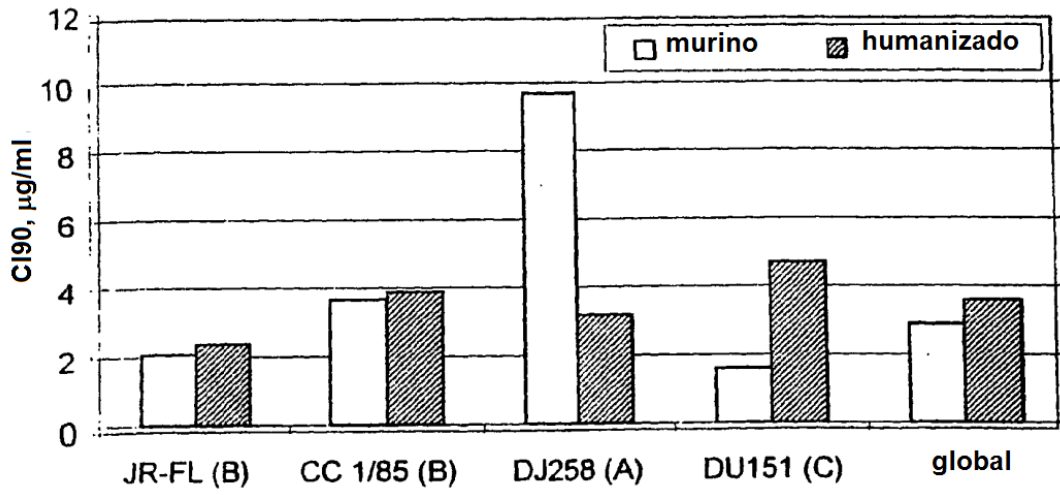


Figura 1



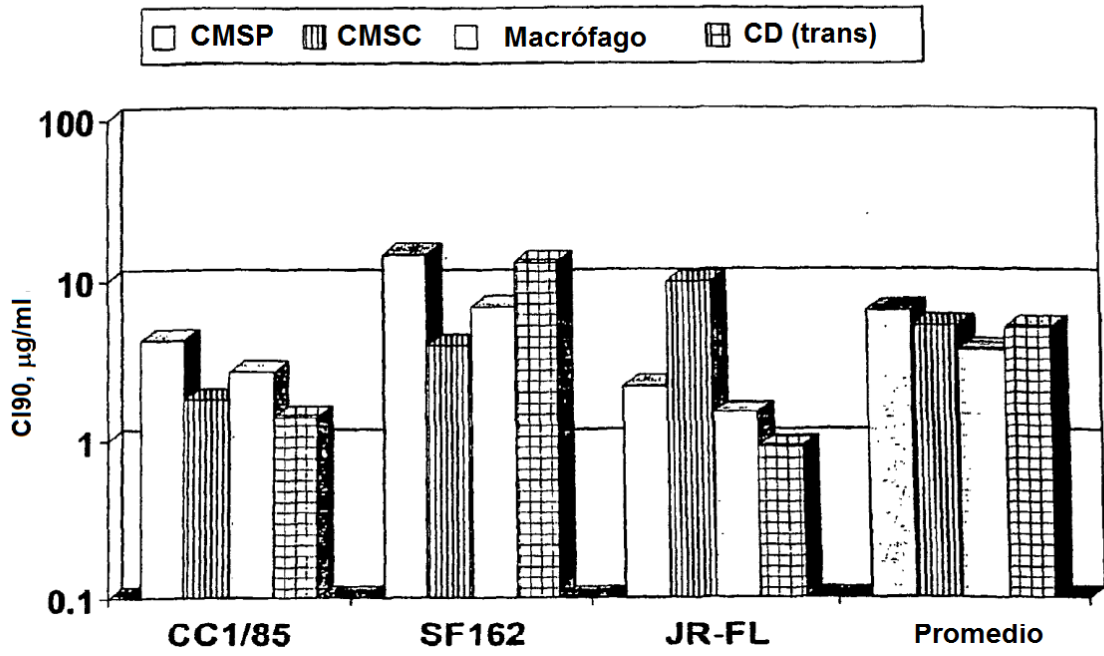


Figura 2

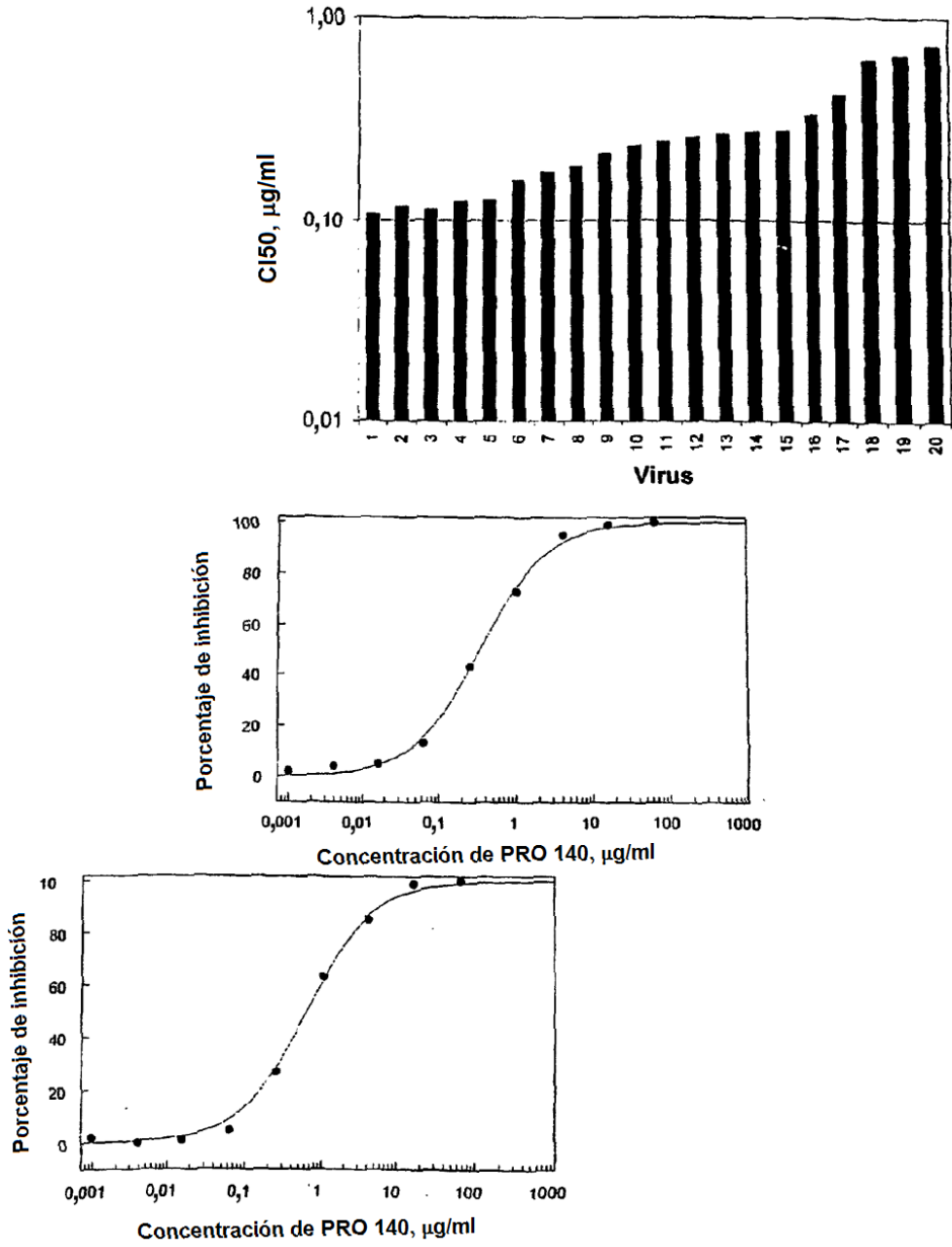


Figura 3

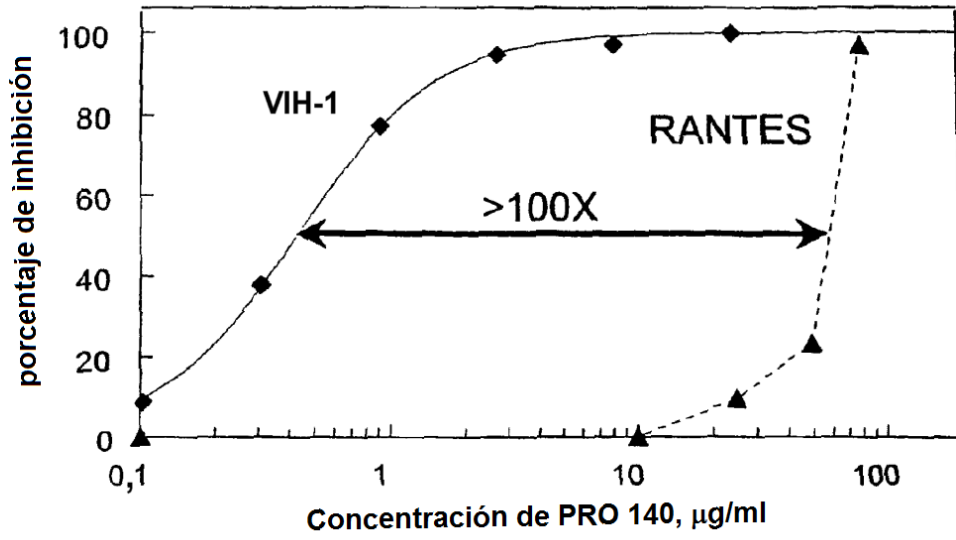


Figura 4

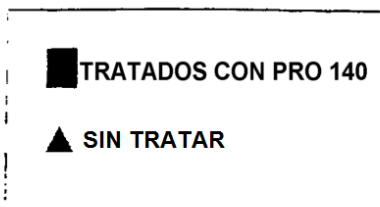
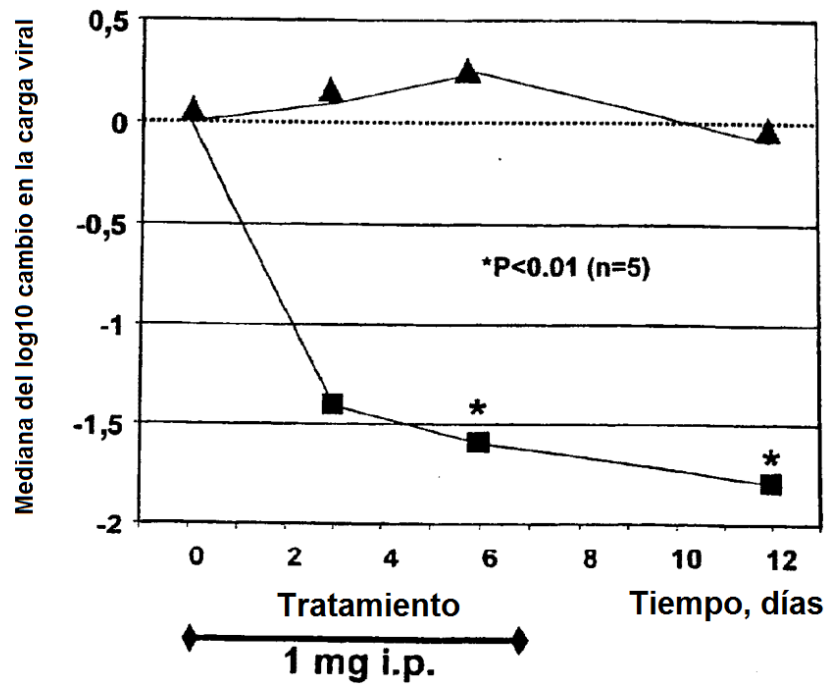


Figura 5

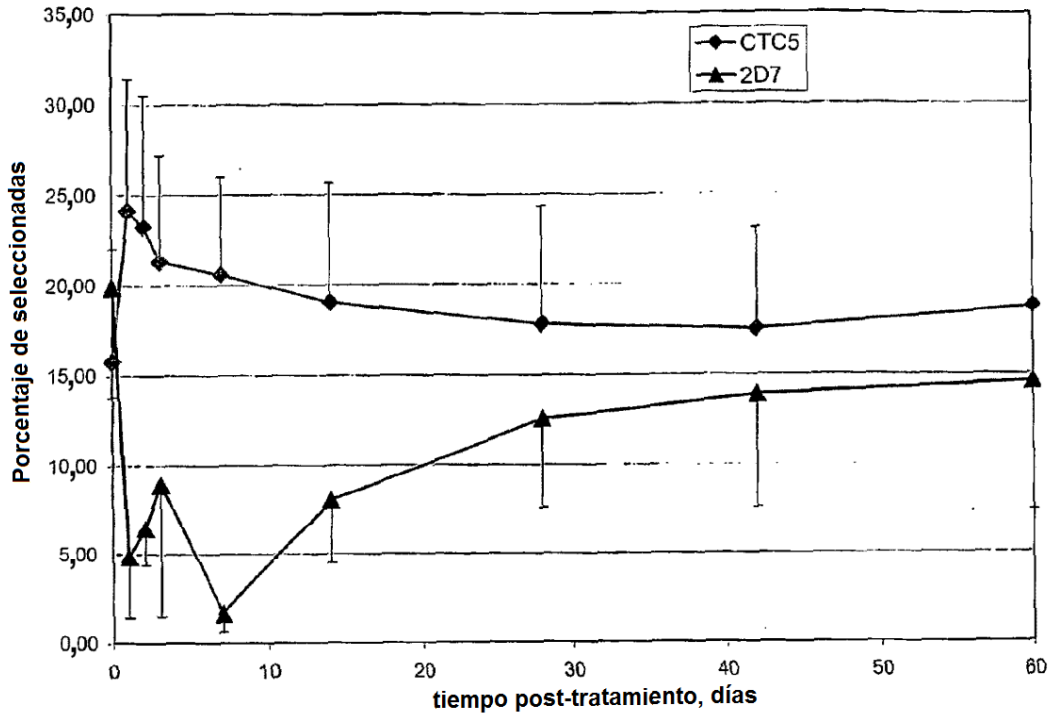


Figura 6

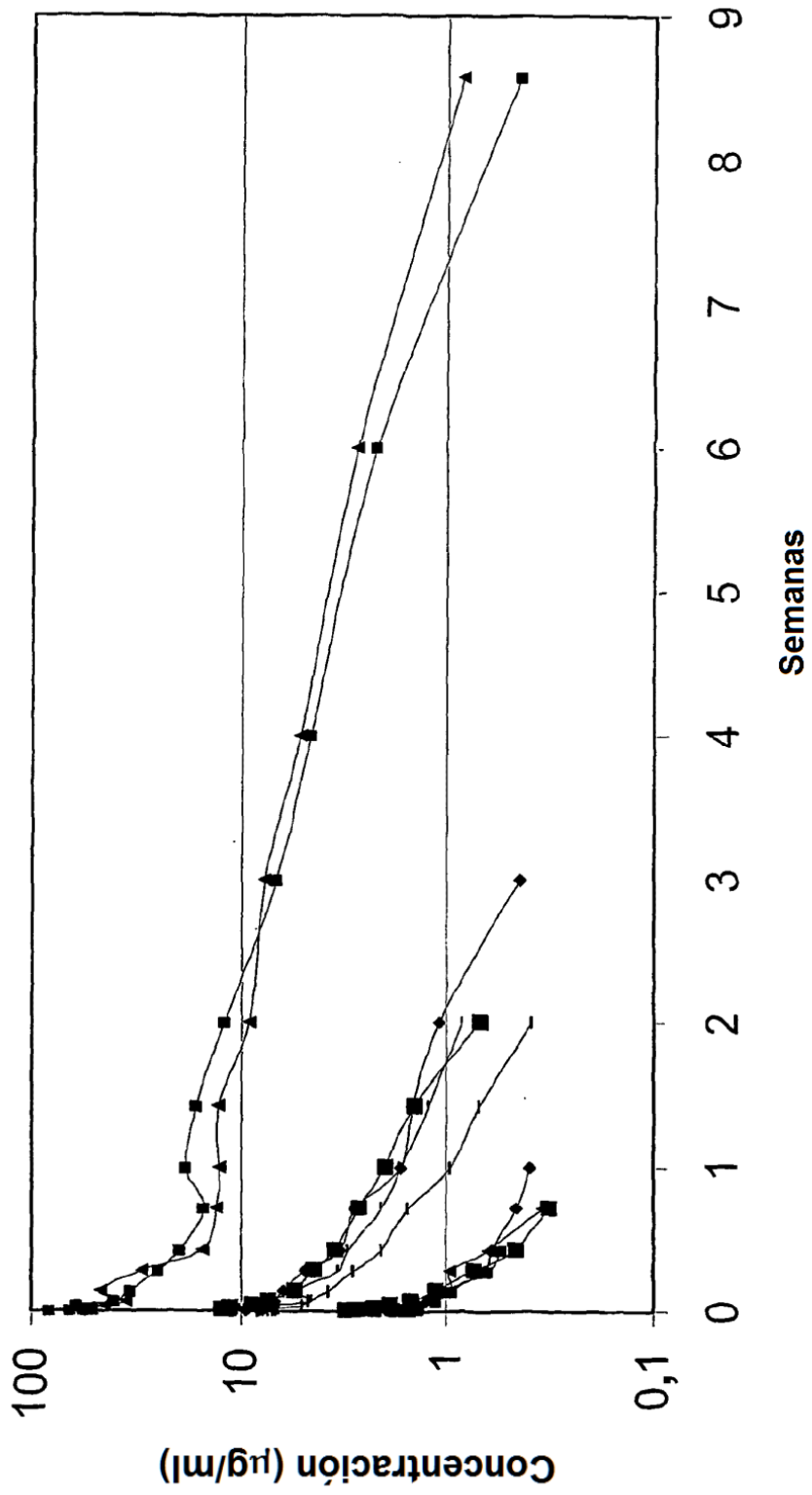
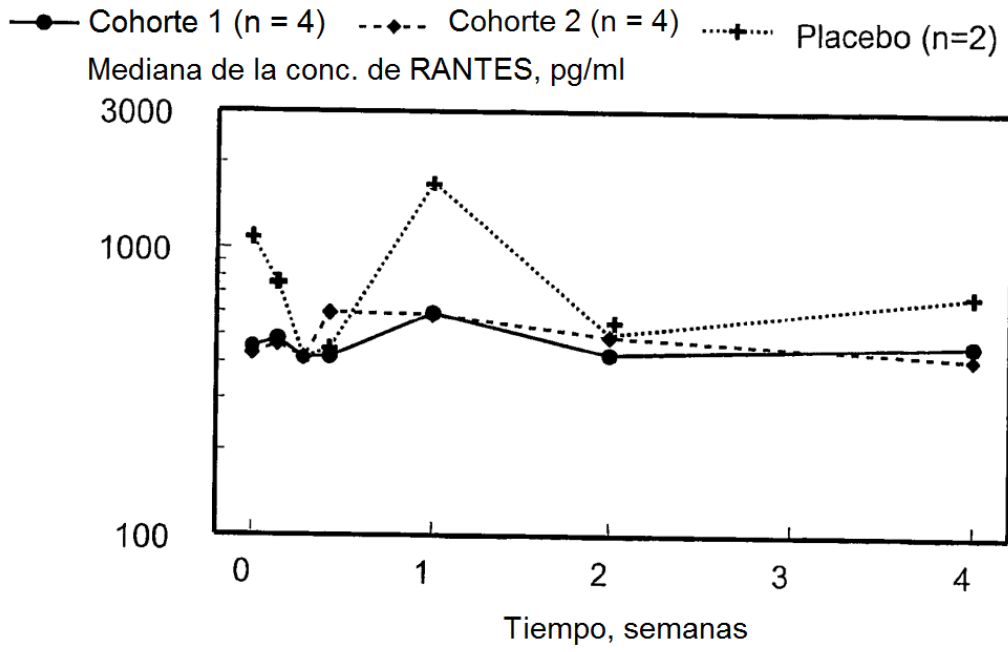


Figura 7



**Figura 8**

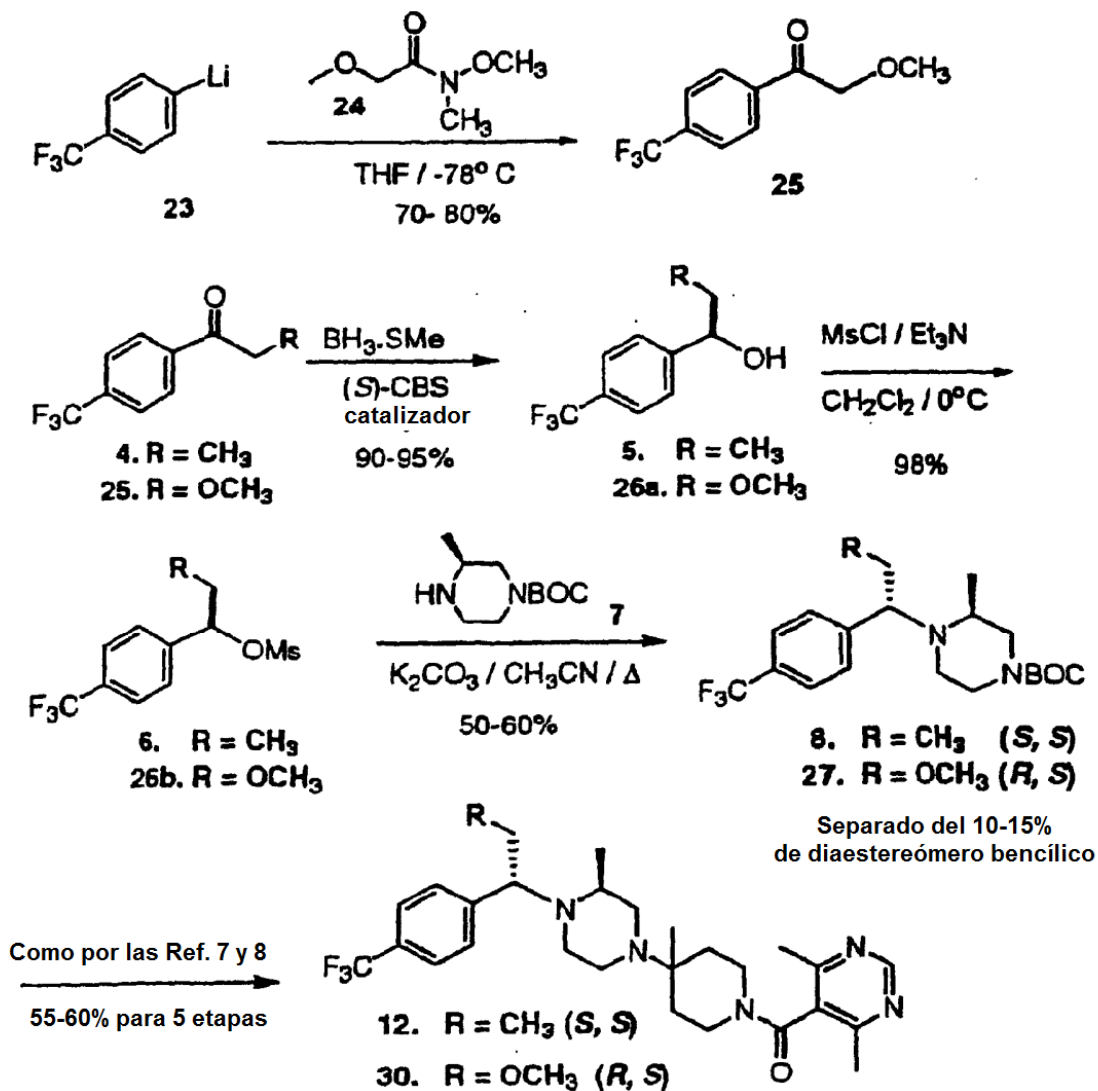
Esquema 1. La ruta de desplazamiento S<sub>N</sub>2

Figura 9



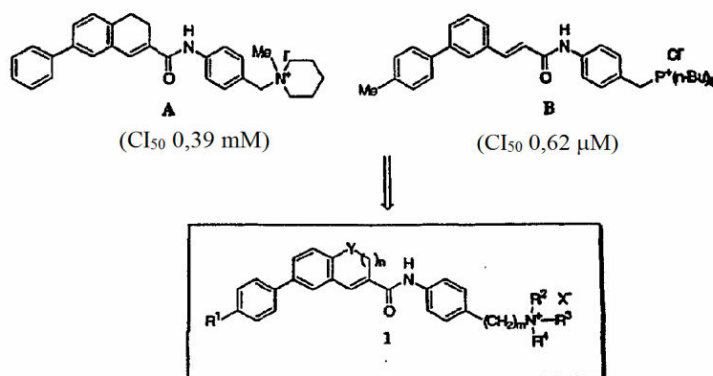
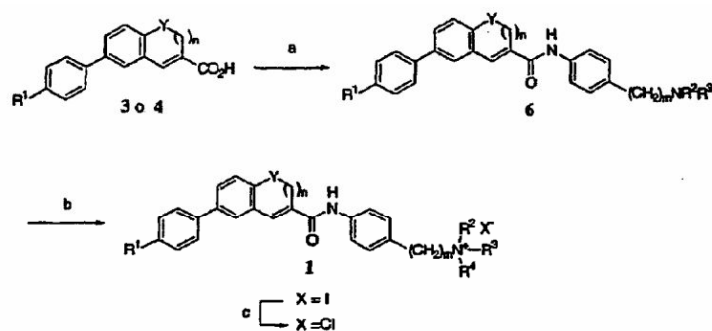


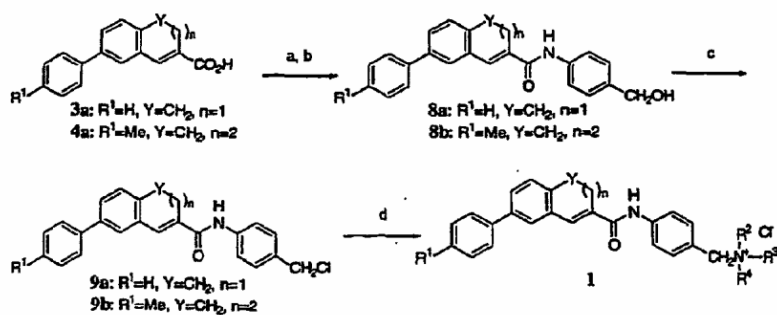
Figura 1. Estructuras de compuestos de partida (A, B) y diseño de derivados 1 de anilida con un resto de amonio cuaternario.

Esquema 1\*



\*(a) (1) (COCl)<sub>2</sub>, DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> cat. (2) 5, NEt<sub>3</sub>/THF o 5. HOBt, WSC, NEt<sub>3</sub>/DMF; (b) MeI/DMF; (c) resina de intercambio iónico (Cl<sup>-</sup>)/MeOH ac.

Esquema 2\*



\*(a) (1) (COCl)<sub>2</sub>, DMF/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> cat. (2) 7, NEt<sub>3</sub>/THF; (b) HCl/acetona; (c) SOCl<sub>2</sub>, piridina/CHCl<sub>3</sub>; (d) NR<sup>2</sup>R<sup>3</sup>R<sup>4</sup>/DMF.

FIGURA 10

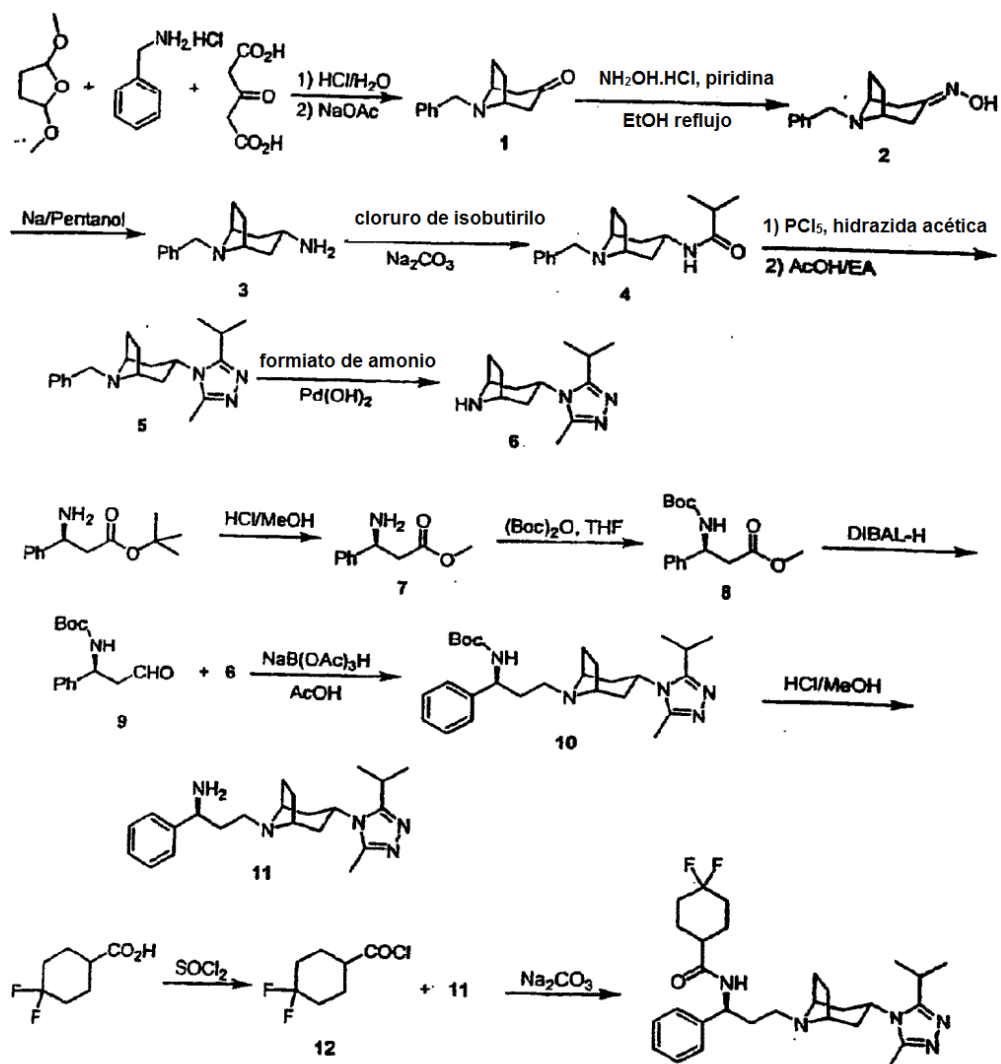


Figura 11

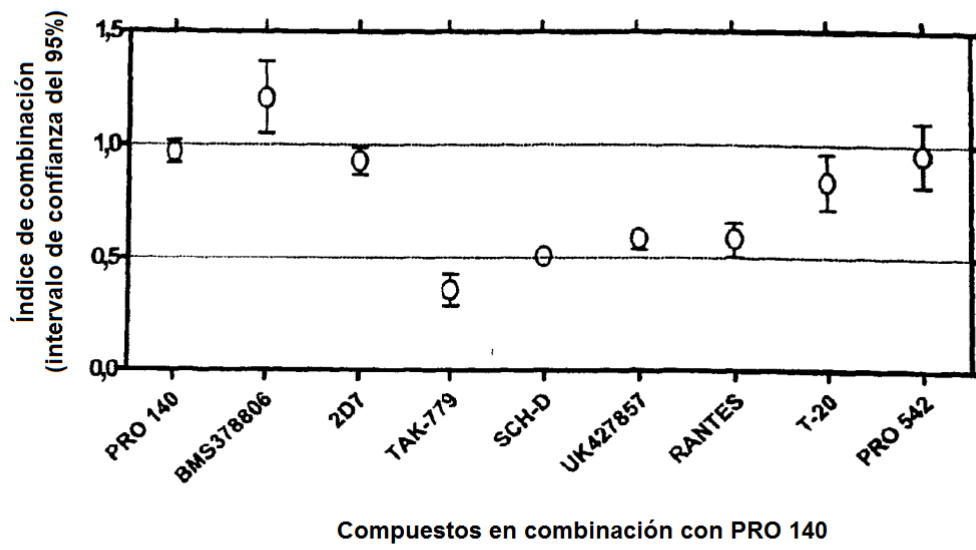
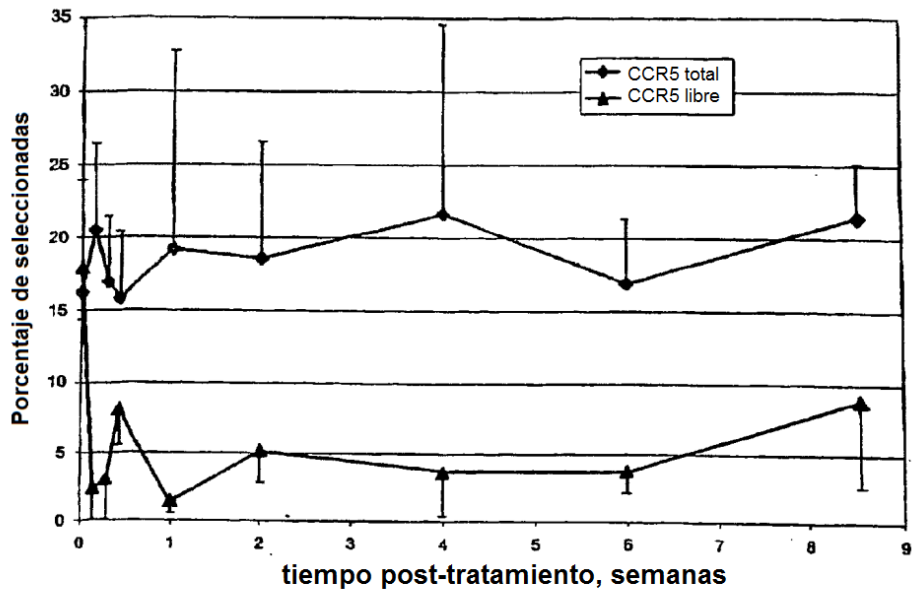


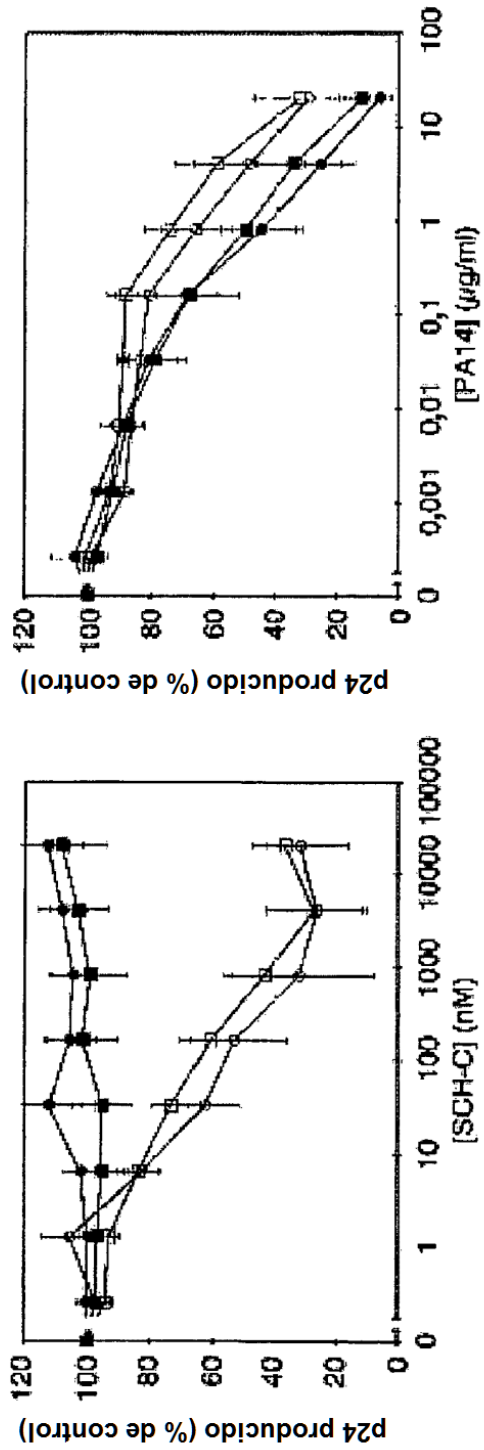
Figura 12

**Recubrimiento de linfocitos CCR5 con PRO140-1101**  
**Cohorte de 5 mg/kg**



**Figura 13**

Virus resistente a AD101



Virus resistente a SCH-D

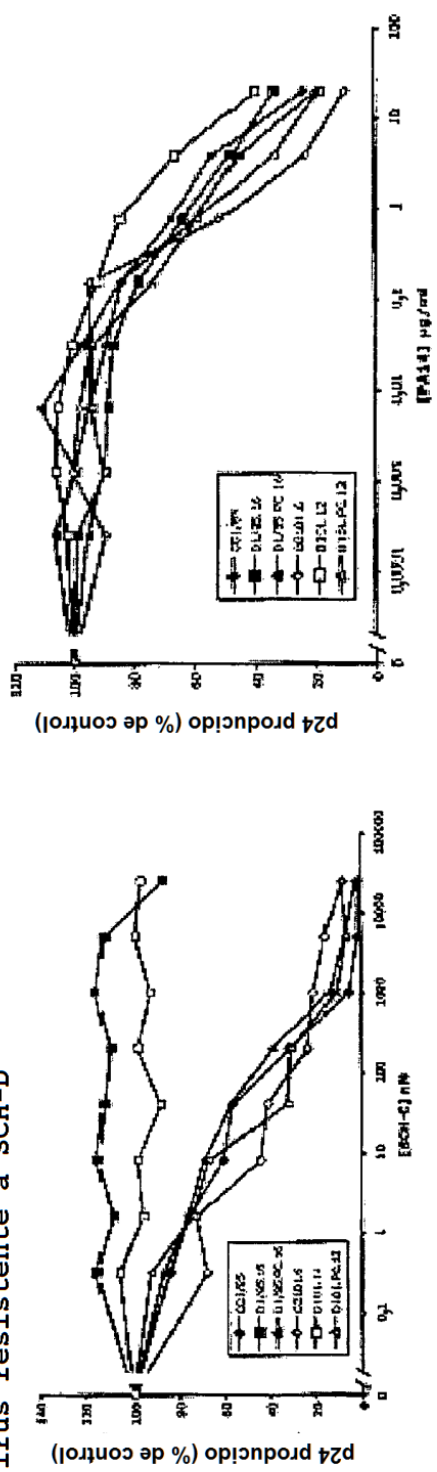


Figura 14

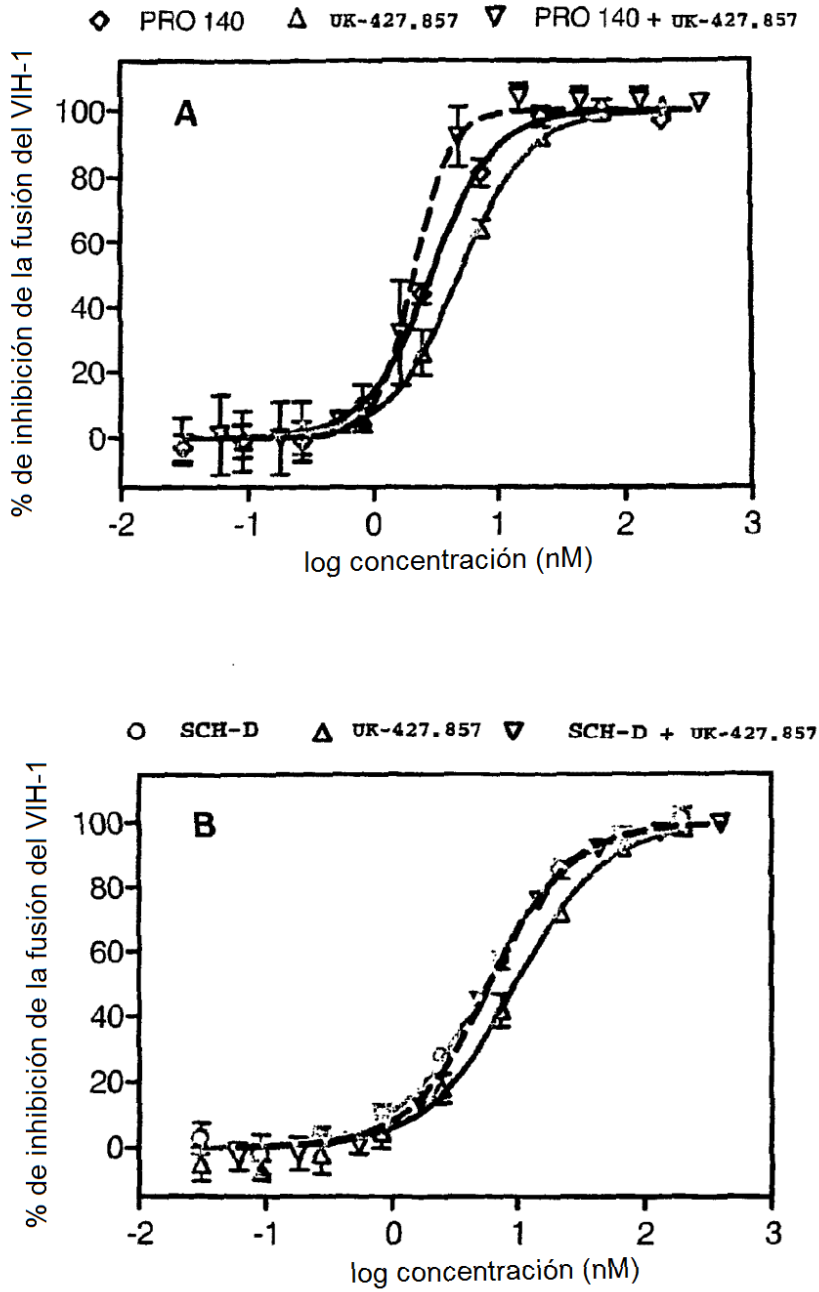


Figura 15

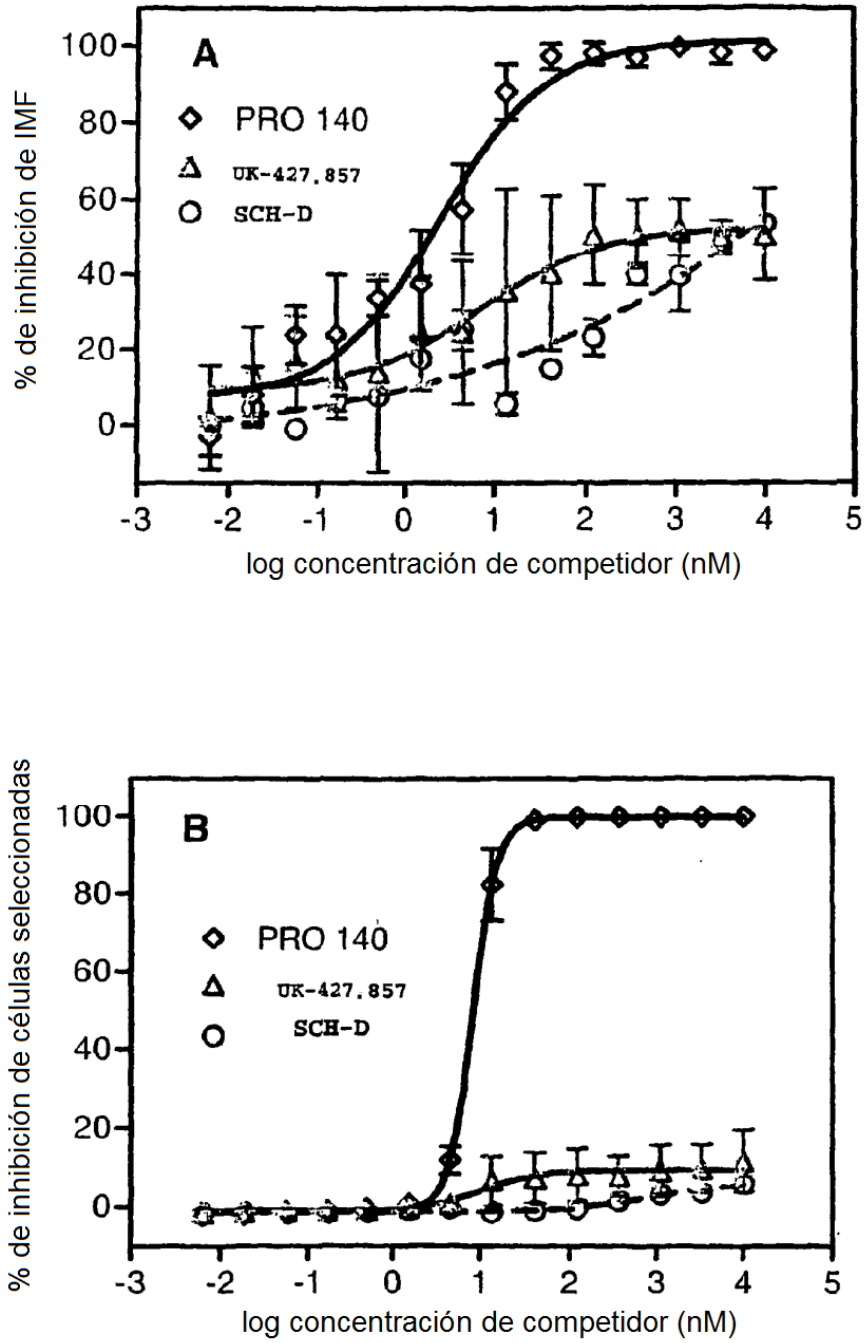


Figura 16

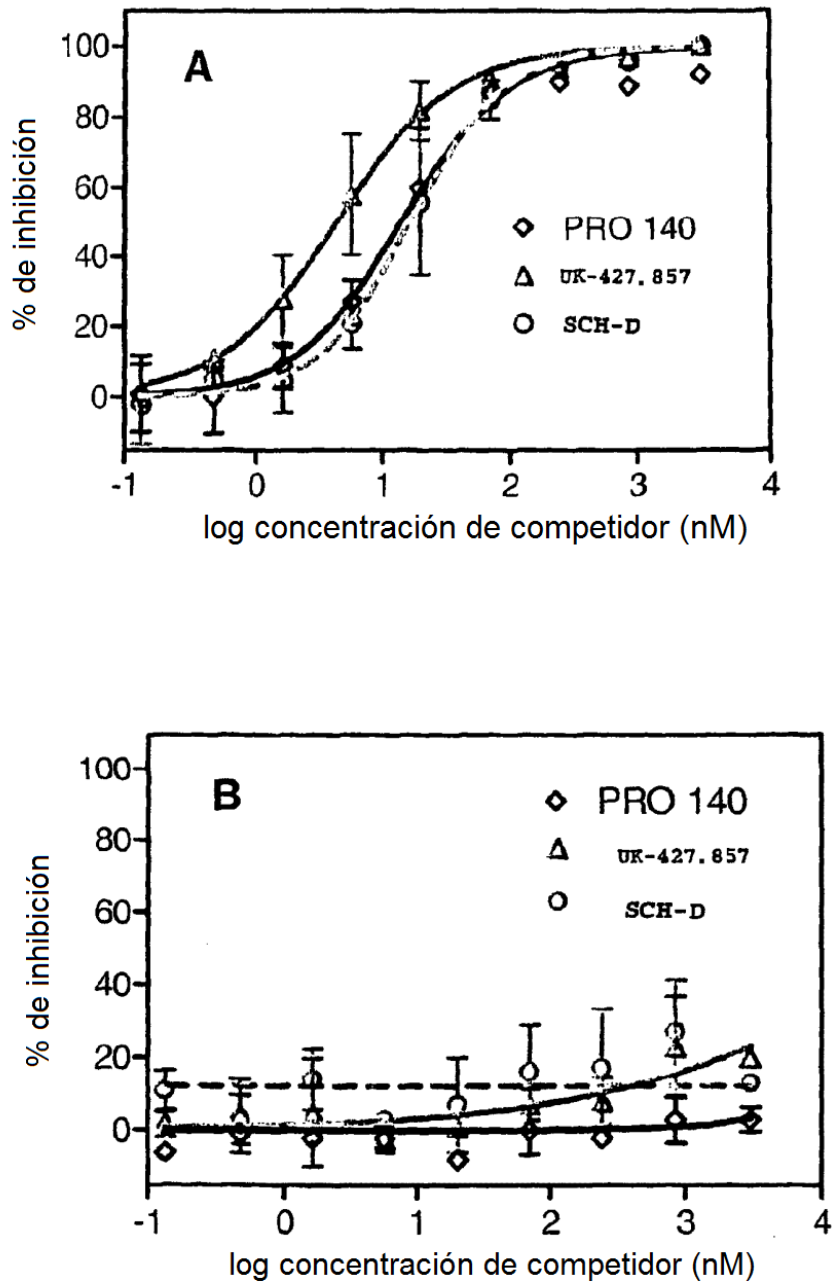


Figura 17