

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 086**

51 Int. Cl.:

A61K 31/19 (2006.01)

A61K 31/7068 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 31/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2012 PCT/EP2012/069544**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.04.2013 WO13050422**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 12777879 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2763670**

54 Título: **Reactivación de la expresión génica del VIH-1 para tratar la infección persistente por VIH**

30 Prioridad:

03.10.2011 US 201161542545 P

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

30.04.2019

73 Titular/es:

**UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES (100.0%)
50, avenue Franklin D. Roosevelt
1050 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**VAN LINT, CARINE;
ROHR, OLIVIER;
BOUCHAT, SOPHIE y
GATOT, JEAN-STÉPHANE**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 711 086 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

Reactivación de la expresión génica del VIH-1 para tratar la infección persistente por VIH

5 **Campo de la invención**

La presente invención se encuentra en el campo de médico, más particularmente en el campo del tratamiento de enfermedades infecciosas tales como el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). La invención proporciona un nuevo método para tratar infecciones (latentes) por el VIH y composiciones para su uso en ellas.

10

Antecedentes de la invención

A pesar de una politerapia antirretrovírica eficaz (cART, forma siglada de *combination antiretroviral therapy*), la persistencia de los reservorios de VIH-1, que albergan provirus VIH-1 integrados de forma estable transcripcionalmente silenciosos pero competentes para la replicación, desafía seriamente la esperanza de erradicación del VIH-1 en personas infectadas con VIH tratadas con cART. De hecho, los reservorios de VIH-1 son insensibles a la cART y pueden escapar de la respuesta inmunitaria del huésped. Por lo tanto, estos reservorios latentes son una fuente permanente para la reactivación del virus y podrían ser responsables del restablecimiento de la carga vírica plasmática observada después de la interrupción de la cART. En consecuencia, el tratamiento con cART precisa un cumplimiento terapéutico de por vida, lo que conduce a varios efectos secundarios a largo plazo y a una esperanza de vida inferior a la de los individuos no infectados. Se han propuesto varios enfoques terapéuticos dirigidos a lograr una cura esterilizante (eliminación del VIH del cuerpo humano) o - más probablemente - una cura funcional (control a largo plazo de la infección por VIH y progresión de la enfermedad en ausencia de cART). En este contexto, la reactivación de la expresión génica del VIH-1 en células infectadas de forma latente junto con una cART eficaz, podría servir como una terapia adyuvante dirigida a disminuir el conjunto de reservorios persistentes.

La inhibición transcripcional del VIH-1 es crucial para el establecimiento y mantenimiento de la latencia posintegración. La organización de la cromatina y el control epigenético del promotor del VIH-1 son elementos clave en este silenciamiento transcripcional. Por un lado, el nucleosoma represivo nuc-1, emplazado inmediatamente cadena abajo del sitio de inicio de la transcripción, se mantiene hipoacetilado por las histonas desacetilasas (las HDAC) en condiciones latentes. El laboratorio de los inventores ha informado anteriormente que el tratamiento de líneas celulares infectadas con VIH-1 de forma latente con inhibidores de las HDAC (HDACi) induce la transcripción vírica y el remodelado de nuc-1. Además, el laboratorio de los inventores demostró que la metilación de la lisina 9 de la histona H3 (H3K9) en microglóbulos y, otros, en linfocitos T o células del paciente, desempeña un papel importante en la represión mediada por cromatina de la expresión del VIH-1. Las histona metiltransferasas (las HMT) Suv39H1, que está implicada principalmente en la trimetilación de H3K9 (H3K9me3), y G9a, que es responsable de la dimetilación de H3K9 (H3K9me2), han demostrado desempeñar un papel en el silenciamiento transcripcional del VIH-1. Por otro lado, el laboratorio de los inventores y otros informaron que la metilación del ADN es otra modificación epigenética implicada en la latencia posintegración del VIH-1. La metilación del ADN, probablemente junto con las modificaciones de histonas represivas, contribuye a "bloquear" el estado silencioso del provirus y hace difícil su regreso a un estado activo. Estas observaciones sugieren que los inhibidores de la HDAC o la HMT, o de la metilación del ADN, junto con una cART eficaz, constituyen buenos candidatos a fármacos anti-latencia, destinados a reducir/eliminar el conjunto de reservorios latentes hasta un nivel tolerable por el sistema inmunitario del huésped.

En este contexto, varios estudios clínicos han probado el potencial de reactivación de un HDACi solo (ácido valproico (VPA) o de vorinostat (ácido hidroxámico suberoilánilida, SAHA), dos fármacos aprobados por la FDA), en cultivos celulares *ex vivo* aislados de sangre de pacientes VIH+. Si bien sus resultados publicados o sus resultados preliminares no publicados son alentadores, cuestionan la eficacia de estos fármacos utilizados solos para reducir el tamaño de los reservorios de VIH-1 latentes. El laboratorio de los inventores ha demostrado previamente que el uso combinado de dos fármacos (un HDACi más un inductor de NF-KappaB, prostratina) provoca una reactivación sinérgica de la producción de VIH-1, es decir, una reactivación mayor que la suma de las reactivaciones producidas por cada fármaco de forma individual en líneas celulares usadas infectadas de forma latente. Además, la misma combinación de fármacos reactiva la expresión del VIH-1 en cultivos de CMSP empobrecidos en CD8+ procedentes de pacientes tratados con cART en una proporción mayor de células que la observada con los fármacos usados solos. Por lo tanto, han demostrado la validez del planteamiento teórico para la coadministración de dos tipos distintos de inductores del VIH-1 terapéuticamente promisorios junto con una cART eficaz como una perspectiva terapéutica para disminuir el conjunto de reservorios de VIH-1 latentes. Sin embargo, en el 40 % de sus cultivos, no pudieron detectar ningún crecimiento vírico después del tratamiento con prostratina y las HDACi, de forma individual o en combinación. Esto podría ser el resultado de una represión epigenética más fuerte de algunos provirus integrados en células en reposo, que impediría una reactivación transcripcional y expresión víricas eficaces, destacando de este modo la importancia de encontrar nuevas estrategias combinatorias de reactivación.

En consecuencia, la presente divulgación utiliza el potencial de reactivación del VIH-1 de otras dos clases de compuestos, es decir, de los inhibidores de la metilación del ADN y los inhibidores de la histona metiltransferasa (los HMTI), solos o en combinación con otras clases de inductores del VIH-1.

65

En el contexto de una combinación que incluye un inhibidor de la metilación del ADN, otros documentos también han sugerido o mencionado este tipo de uso. En Colin y Van Lint, 2009 (Retrovirology Vol. 6, diciembre de 2009, ISSN:1742-4690), se sugiere añadir inhibidores de la metilación del ADN y las HDACI a las terapias antiviricas actuales. En la solicitud PCT WO2011/038224, se divulga una composición que comprende un agente inductor de virus seleccionado de inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de la metilación del ADN o combinaciones de los mismos, para su uso en el tratamiento de afecciones víricas. En la solicitud PCT WO02/085400 se divulga una composición que comprende un inhibidor de la metilación del ADN y un inhibidor de la histona desacetilasa para su uso en el tratamiento del cáncer. Zhu Wei-Guo *et al.*, 2000 (Proceedings Of the American Association for Cancer Research Annual Meeting, N.º 41, marzo de 2000, página 350) informan sobre la combinación de 5-azacitidina con tricostatina A o depsipéptido para inducir la expresión de p16. Demonte D *et al.*, 2004 (Biochem. Pharmacol. vol. 68, n.º 6, 15 de septiembre de 2004) informaron sobre la administración de inhibidores de la HDAC para reactivar la expresión del VIH-1 en reservorios celulares latentes. La solicitud PCT WO2011113013 divulga métodos y composiciones para tratar afecciones víricas que comprenden inhibidores de la HDAC.

Sin embargo, la presente divulgación abarca la administración de una combinación secuencial que incluye un inhibidor de la metilación del ADN (decitabina) y un HDACI seleccionado de hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por VIH, como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Sumario de la invención

La presente divulgación utiliza el potencial de reactivación del VIH-1 de dos clases de compuestos, es decir, inhibidores de la metilación del ADN (5-aza-2'-desoxicitidina [5-aza-CdR o decitabina]) e inhibidores de la histona metiltransferasa (quetocina y BIX-01294), solos o en combinación con otras clases de inductores del VIH-1.

La presente divulgación informa que un inhibidor de la metilación del ADN o un inhibidor de la HMT, solo o en combinación con otros inductores del VIH-1, reactiva la producción de VIH-1 de su estado latente, y en mayor grado cuando los fármacos se usan en combinación. En consecuencia, esto podría conducir, junto con la terapia antirretrovírica continua, a una estrategia terapéutica para disminuir el conjunto de reservorios latentes en pacientes infectados VIH+ tratados con cART.

Por un lado, los inventores han analizado el efecto reactivante de combinaciones que incluyen el inhibidor de la metilación del ADN 5-aza-CdR, aprobado para la terapia humana del síndrome mielodisplásico, y varios HDACI que incluyen distintas familias estructurales de HDACI usadas en terapia humana (tales como VPA, butirato de sodio (NaBut) o SAHA) o en un ensayo clínico (tal como MS-275) (Figura 5). Han demostrado que tales combinaciones indujeron una reactivación sinérgica de la producción de VIH-1 en líneas de linfocitos T del modelo de latencia posintegración (a nivel tanto del ARNm vírico como de proteínas) y que se observaron las mejores sinergias utilizando las combinaciones 5-aza-CdR+NaBut y 5-aza-CdR+SAHA (Figura 5). Estas sinergias se debieron, al menos parcialmente, a la inclusión sinérgica de células que no responden en la población celular que expresa (Figura 5b), y estuvieron acompañados por una desmetilación parcial de dinucleótidos CpG en el 5'LTR del VIH-1. Además, los datos preliminares de los inventores en cultivos de CMSP empobrecidos en CD8⁺ aislados de pacientes VIH⁺ tratados con cART con una carga vírica indetectable, han puesto en relieve que 5-aza-CdR puede aumentar el potencial de reactivación de SAHA.

En una realización preferente, el inhibidor de la metilación del ADN, tal como 5-aza-CdR, se combina con los HDACI que incluyen distintas familias estructurales de HDACI utilizadas en terapia humana, tales como VPA, butirato de sodio (NaBut) o SAHA. La combinación con butirato de sodio es particularmente preferente debido a su menor toxicidad y mayor actividad en comparación con SAHA.

Por otro lado, los inventores han evaluado el potencial terapéutico de los inhibidores de la HMT (quetocina y BIX-01294, dos inhibidores específicos de Suv39H1 o de G9a, respectivamente) por su efecto sobre la reactivación del VIH-1 de la latencia. En primer lugar, en líneas celulares infectadas de forma latente, los inventores demostraron que el HMTI quetocina solo aumentó la expresión génica y la producción del VIH-1 (Figura 1) y que funcionó de forma sinérgica con la prostratina inductora de NF-κB no tumoral (Figura 2). En segundo lugar, los inventores han medido la recuperación del VIH-1 en cultivos *ex vivo* de CMSP empobrecidos en CD8⁺ o de linfocitos T CD4⁺ en reposo aislados de 67 pacientes VIH⁺ tratados con cART con carga vírica indetectable después del tratamiento con un HMTI solo o en combinación con otros Inductores del VIH-1 (en ausencia de IL-2 y de estimulación alogénica). Han demostrado, por primera vez, que la quetocina inducía la recuperación del VIH-1 en el 50 % de los cultivos de CMSP empobrecidos en CD8⁺ (Tabla 2a) y en el 86 % de los cultivos de linfocitos T CD4⁺ en reposo (Tabla 2b) aislados de pacientes VIH-1⁺ tratados con cART, mientras que BIX-01294 reactivó la expresión de VIH-1 en el 80 % de los cultivos de linfocitos T CD4⁺ en reposo (Tabla 4) aislados de pacientes similares. Además, han demostrado que los tratamientos combinatorios que incluyen un HMTI y HDACI o SAHA, o el inductor de NF-κB no promotor de tumores prostratina tienen un mayor potencial de reactivación que los tratamientos con estos compuestos solos (Figura 3 y 4, y Tabla 3). En conclusión, los inventores han demostrado por primera vez que los HMTI utilizados solos o en combinación con otros inductores del VIH-1 provocan la recuperación del VIH-1 en los linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes tratados con cART. Estos resultados se publicaron en AIDS, en julio de 2012 (BOUCHAT *et al.*, AIDS,

26(12), 1473-1482.PMID:22555163). Aunque la quetocina y BIX-01294 no pueden administrarse de manera segura a los seres humanos, sus resultados constituyen una validez del planteamiento teórico para el uso de los HMTI en estrategias dirigidas a reducir el conjunto de reservorios latentes de VIH-1. Dado que los HMTI también representan compuestos prometedores en las terapias contra el cáncer, se deben sintetizar pronto otros HMTI más seguros, y deben evaluarse en cuanto a su potencial de reactivación en individuos VIH-1+ tratados con cART.

Estos resultados sugieren la administración de inhibidores de la metilación del ADN o de la HMT solos o en combinación con otros inductores del VIH-1, junto con el cART continuo, como posibles estrategias terapéuticas para reactivar el VIH-1 a partir de la latencia en pacientes infectados.

La presente invención está definida por las reivindicaciones adjuntas. Se divulgan adicionalmente los siguientes puntos:

1. Un método para tratar una enfermedad o afección asociada con un retrovirus en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de:

- a) un inhibidor de la metilación del ADN y
- b) un inhibidor de la histona desacetilasa.

2. El método de acuerdo con el punto 1, en donde el inhibidor de la histona desacetilasa, se administra después de haber administrado el inhibidor de la metilación del ADN.

3. El método de acuerdo con el punto 1 o 2, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN se selecciona de las dos clases de inhibidores de la metilación del ADN (agentes de desmetilación no nucleosídicos y nucleosídicos) que incluyen: 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR, decitabina), 1-β-Darabinofuranosil-5-azacitosina (fazarabina), dihidro-5-azacitidina (DHAC), 5-fluorodesoxicitidina (FdC), dúplex de oligodesoxinucleótidos que contienen 2-H pirimidinona, zebularina, oligodesoxinucleótidos antisentido (los ODN), MG98, (-)-epigalocatequina-3-galato, hidralazina, procaína y procainamida.

4. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN es 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR, decitabina).

5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa se selecciona de distintas familias de HDACI (hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas) que incluyen TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH-589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenilbutirato, butirato de sodio, ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103.

6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en donde dicha histona desacetilasa es ácido hidroxámico suberoilanolida (SAHA, Vorinostat) o butirato de sodio (NaBut).

7. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en donde se utiliza la combinación de 5-aza-2'-desoxicitidina + SAHA y 5-aza-2'-desoxicitidina + NaBut.

8. Un método para tratar una enfermedad o afección asociada con un retrovirus en un sujeto que necesita tal tratamiento, que comprende administrar a dicho sujeto una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de la histona metil-transferasa.

9. El método de acuerdo con el punto 8, en donde dicho inhibidor de la histona metiltransferasa se selecciona del grupo que comprende: quetocina, UNC0224, diazepinil-quinazolinamina, inhibidor de la HMTasa basado en análogo no SAM (S-adenosilmetionina), BIX-01294, BIX-01338 (hidrato) y 2-Ciclohexil-N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-6-metoxi-7-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi) quinazolin-4-amina.

10. El método de acuerdo con el punto 8 o 9, en donde dicha histona metiltransferasa es quetocina o BIX-01294.

11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8 a 10, que comprende adicionalmente la administración de: un inductor del VIH, tal como:

- a) un inductor de NF-kappa-B seleccionado del grupo del grupo que comprende: PMA, prostratina, briostatina y TNF-alfa, y/o
- b) un inhibidor de la histona desacetilasa seleccionado de distintas familias (hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas) que incluyen: TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos,

- 5 bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH-589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenilbutirato, butirato de sodio, ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103, y/o
- 10 c) un inhibidor de la metilación del ADN seleccionado de dos clases (agentes de desmetilación no nucleosídicos y nucleosídicos) que incluyen: 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR, decitabina), 1-β-Darabino-furanosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC), 5-fluorodesoxicitidina (FdC), dúplex de oligodesoxinucleótidos que contienen 2-H pirimidinona, zebularina, oligodesoxinucleótidos antisentido (los ODN), MG98, (-)-epigalocatequina-3-galato, hidralazina, procaína y procainamida.
- 15 12. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8 a 11, en donde se utiliza la combinación de quetocina + prostratina y quetocina + SAHA.
13. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 8 a 11, en donde se utiliza la combinación de BIX-01294 + SAHA.
- 20 14. El método de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 1 a 13, en donde dicho retrovirus se selecciona del grupo que consiste en: VIH-1, VIH-2, el VTLH -1 y el VTLH -2.
15. Una composición o formulación farmacéutica que comprende:
- 25 a) un inhibidor de la metilación del ADN,
- b) un inhibidor de la histona desacetilasa, y
- 30 c) uno o más componentes adicionales, como, pero sin limitación, uno o más disolventes y/o uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, opcionalmente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un retrovirus en un sujeto que necesita tal tratamiento, dicha composición farmacéutica.
- 35 16. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN se selecciona de dos clases (agentes de desmetilación del ADN no nucleosídicos y nucleosídicos) que comprenden: 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR, decitabina), 1-β-Darabinofuranosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC), 5-fluorodesoxicitidina (FdC), dúplex de oligodesoxinucleótidos que contienen 2-H pirimidinona, zebularina, oligodesoxinucleótidos antisentido (los ODN), MG98, (-)-epigalocatequina-3-galato, hidralazina, procaína y procainamida.
- 40 17. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 15, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN es 5-aza-2'-desoxicitidina.
- 45 18. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 15 a 17, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa se selecciona de distintas familias (hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas) que incluyen: TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH-589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenilbutirato, butirato de sodio, ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103.
- 50 19. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 15 a 18, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa es SAHA o NaBut.
- 55 20. La composición farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 15 a 19, en donde dicho inhibidor de la metilación del ADN es 5-aza-2'-desoxicitidina y dicho inhibidor de la histona desacetilasa es SAHA o NaBut.
- 60 21. Una composición o formulación farmacéutica que comprende:
- a) un inhibidor de la histona metiltransferasa, y
- 65 b) uno o más componentes adicionales, como, pero sin limitación, uno o más disolventes y/o uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, opcionalmente para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un retrovirus en un sujeto que necesita tal tratamiento.

22. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 21, en donde dicho inhibidor de la histona metiltransferasa se selecciona del grupo que comprende: quetocina, UNC0224, diazepinil-quinazolinamina, inhibidor de la HMTasa basado en análogo no SAM (S-adenosilmetionina), BIX-01294, BIX-01338 (hidrato) y 2-Ciclohexil-N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-6-metoxi-7-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)quinazolin-4-amina.

23. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 21 o 22, que comprende adicionalmente: un inductor del VIH, tal como:

a) un inductor de NF-kappa-B seleccionado del grupo del grupo que comprende: PMA, prostratina, briostatina y TNF-alfa, y/o

b) un inhibidor de la histona desacetilasa seleccionado de distintas familias (hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas) que incluyen: TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH-589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenil butirato, butirato de sodio, ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103, y/o

c) un inhibidor de la metilación del ADN seleccionado de dos clases (agentes de desmetilación no nucleosídicos y nucleosídicos) que comprenden: 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (5-aza-CdR, decitabina), 1-β-Darabino-furanosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC), 5-fluorodesoxicitidina (FdC), dúplex de oligodesoxinucleótidos que contienen 2-H pirimidinona, zebularina, oligodesoxinucleótidos antisentido (los ODN), MG98, (-)-epigallocatequina-3-galato, hidralazina, procaína y procainamida.

24. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 23, que comprende la combinación de quetocina + prostratina o quetocina + SAHA.

25. La composición farmacéutica de acuerdo con el punto 23, que comprende la combinación de BIX-01294 y SAHA.

26. Un método para producir las composiciones o la formulación de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores, que comprende combinar los distintos componentes en una composición o formulación.

27. La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 15 a 25, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un retrovirus, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en: VIH-1, VIH-2, VTLH -1 y VTLH -2, preferentemente de infecciones latentes.

28. La composición de acuerdo con uno cualquiera de los puntos 15 a 25, para uso en la erradicación de infecciones retrovíricas latentes y/o en la destrucción de reservorios retrovíricos.

29. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 25, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con un retrovirus, seleccionado preferentemente del grupo que consiste en: VIH-1, VIH-2, VTLH -1 y VTLH -2, más preferentemente de infecciones latentes, en donde el inhibidor de la histona desacetilasa se administra después de dicho inhibidor de la metilación del ADN.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se ilustra mediante las siguientes figuras, que deben considerarse solo con fines ilustrativos y de ninguna manera limitan la invención a las realizaciones divulgadas en ella:

A. Resultados para los HMTI solos o en combinación con inductores de VIH-1

Figura 1. La quetocina induce la recuperación del VIH-1 de una manera dependiente de la dosis, (a, b) La quetocina aumenta la actividad transcripcional del 5'LTR del VIH-1 en células T linfoides transfectadas. Se transfectaron de forma transitoria las líneas celulares Jurkat o SupT1 con la construcción indicadora episómica PLTR_{HI-V-1}-luc. A las 24 h posttransfección, las células se trataron de forma simulada o se trataron con quetocina como se indica. A las 24 h posinducción, las células se lisaron y se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad luciferasa. Las actividades de la luciferasa se normalizaron con respecto a las concentraciones de proteína. El resultado obtenido con las células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1. **(c, d) La quetocina aumenta la producción de VIH-1 en la línea celular infectada de forma latente J-Lat 15.4.** La línea celular J-Lat 15.4 se trató de forma simulada o se trató con quetocina como se indica. Se midió la producción de p24 en los sobrenadantes celulares (c) o la viabilidad celular (d). El resultado obtenido con células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1 o del 100 %, respectivamente.

Tabla 1. La quetocina induce la recuperación del VIH-1 de una manera dependiente de la dosis en CMSP

empobrecidas en CD8⁺ aisladas de pacientes tratados con cART infectados con VIH-1 con una carga vírica indetectable. Los cultivos de CMSP empobrecidas en CD8⁺ se trataron de forma simulada o se trataron con quetocina (30, 60 o 90 nmol/l) o con el control positivo. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo (en copias/ml; 'l' indica por debajo del umbral).

5

Tabla 1: CMSP empobrecidas en CD8⁺

Pacientes	simulado	quetocina 30 nM	quetocina 60 nM	quetocina 90 nM	C+
H1	l	l	l	l	467
H2	l	l	222	1825	241
H3	l	1139	452	354	6665
H4	l	l	1924	2057	15394
H5	l	l	l	l	219
H6	l	l	l	2371	5053
Pacientes reactivados		1	3	4	6

Figura 2: El tratamiento combinado de quetocina+prostratina aumenta de forma sinérgica la transcripción del VIH-1 en la línea celular infectada de forma latente J-Lat 15.4.

La línea celular J-Lat 15.4 se trató de forma simulada o se trató con quetocina, prostratina o una combinación de ambos fármacos. Se extrajo el ARN total de estas células y se transcribió de forma inversa utilizando cebadores aleatorios. Después, los cADN se usaron en una reacción de PCR con parejas de cebadores que hibridaban con TAR, para cuantificar los transcritos iniciados o en Tat para cuantificar los transcritos extendidos. Los resultados se normalizaron usando β actina y se presentan como histogramas que indican la inducción en veces, en comparación con las condiciones de tratamiento de forma simulada.

10

15

Tabla 2: La quetocina induce la recuperación del VIH-1 en CMSP empobrecidas en CD8⁺ y en linfocitos T HLA DR⁻ CD4⁺ procedentes de pacientes infectados con VIH-1 tratados con cART con carga vírica indetectable. (a) Los cultivos de CMSP empobrecidos en CD8⁺ se trataron de forma simulada o se trataron con quetocina (90 nmol/l). Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en sobrenadantes de cultivo. El ADN total de VIH-1 se expresa como copias de ADN de VIH-1/10⁶ células o como el log de copias de ADN de VIH-1/10⁶ células ('/' indica condición no analizada). (b) Se trataron cultivos de dilución limitante de linfocitos T HLA DR⁻ CD4⁺ de forma simulada o se trataron con quetocina (45 o 90 nmol/l). Se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo. El último cultivo de dilución positivo indica la presencia de al menos una célula que porta virus competente para la replicación y sensible a la quetocina.

20

25

Tabla 2A: CMSP empobrecidas en CD8⁺

Pacientes	simulado	quetocina	C+	ADN de VIH (copias / 10 ⁶ células)	Log de ADN de VIH
H1	l	l	467	/	/
H2	l	1825	241	/	/
H3	l	354	6665	/	/
H4	l	2057	15394	/	/
H5	l	l	219	/	/
H6	l	2371	5053	/	/
H7	l	l	306	1230	3,09
H8	l	l	1480	2373	3,38
H9	l	1566	1920	1366	3,14
H10	l	l	8405	1527	3,18
H11	l	797	19958	1110	3,05
H12	l	477	4132	3309	3,52
H13	l	l	272	2111	3,32
H14	l	2388	387	2424	3,38
H15	l	l	2691	995	3,00
H16	l	467	7458	3465	3,54
H17	l	l	2562	187	2,27
H18	l	l	3695	3796	3,58
Pacientes reactivados	0	9	18		

Pacientes	simulado	quetocina	C ⁺	ADN de VIH (copias / 10 ⁶ células)	Log de ADN de VIH
% de reactivación	0	50	100		

Tabla 2B: Linfocitos T CD4⁺ HLA DR⁻

Pacientes	simulado	Dosis de quetocina	1,5x10 ⁶ células	10 ⁶ células	5x10 ⁵ células	10 ⁵ células	5x10 ⁴ células	C ⁺
P1	I	45 nM	/	284	179	I	/	308
		90 nM	/	I	147	I	/	
P2	I	45 nM	/	/	245	83	I	111
		90 nM	/	/	I	I	I	
P3	I	45 nM	/	I	I	I	/	210
		90 nM	/	I	I	I	/	
P4	I	45 nM	/	I	89	I	/	120
		90 nM	/	/	118	51	I	
P5	I	45 nM	/	94	I	I	/	880
		90 nM	/	178	68	50	76	
P6	I	45 nM	288	292	97	I	/	1451309
		90 nM	377	131	52	47	I	
P7	I	45 nM	831	702	769	238	I	1021
		90 nM	1050	791	1043	359	I	

Tabla 3: Características del paciente y estado de reactivación de cultivos ex vivo de células de pacientes.

Tipos celulares	Pacientes	Edad	recuento de T CD4+	Último tratamiento	Avrémico durante (años)	simulado	quetocina	SAHA	quetocina+ SAHA	prostrina	quetocina+ prostrina	BIX-01294	BIX-01294+ SAHA	C*	copias de ADN de VIH/ 10 ⁶ células	
CMSP empobrecidas en CD8*	H1	38	962	RTV + FAPV + AZT + 3TC	4	I	I	/	/	/	/	/	/	467	/	
	H2	42	558	AZT + ABC + 3TC	9	I	1825	/	/	/	/	/	/	241	/	
	H3	53	786	TDF + FTC + EFV	5	I	354	/	/	/	/	/	/	6665	/	
	H4	46	680	RTV + NVP + FAPV + ABC + 3TC	7	I	2057	/	/	/	/	/	/	15394	/	
	H5	41	1239	TDF + NVP + 3TC	4	I	I	/	/	/	/	/	/	219	/	
	H6	69	1073	TDF + RTV + ATV + 3TC	5	I	2371	/	/	/	/	/	/	5053	/	
	H7	70	698	TZV	9	I	I	/	/	/	/	/	/	306	1230	
	H8	21	457	3TC, TDF, RTV, ATV	3	I	I	/	/	/	/	/	/	1480	2373	
	H9	50	883	TZV, LPV	3	I	1566	/	/	/	/	/	/	1920	1366	
	H10	53	556	3TC + TDF + NVP	4	I	I	/	/	/	/	/	/	8405	1527	
	H11	66	816	TDF + KXV + NVP	5	I	797	/	/	/	/	/	/	19958	1110	
	H12	61	536	CBV + RTV + SQV	5	I	477	/	/	/	/	/	/	4132	3309	
	H13	31	641	3TC + TDF + RTV + FAPV	5	I	I	/	/	/	/	/	/	272	2111	
	H14	33	573	3TC + TDF + RTV + FAPV	6	I	2388	/	/	/	/	/	/	387	2424	
	H15	58	557	TRU + RTV + FAPV	2	I	I	/	/	/	/	/	/	2691	995	
	H16	39	906	KVX + NVP	6	I	467	/	/	/	/	/	/	7458	3465	
	H17	48	690	DDI + KVX + LPV	4	I	I	/	/	/	/	/	/	2562	187	
	H18	69	570	TRU + NVP	2	I	I	/	/	/	/	/	/	3695	3796	
	H19	36	693	ATR	1	I	I	624	444	/	/	/	/	256	1737	
	H20	44	481	TRU + RTV + FAPV	2	I	832	520	1204	612	564	/	/	4 136	3037	
	H21	56	694	ATR	1	I	180	252	1428	/	/	/	665	/	524	/
	H22	46	404	TDF + FTC + NVP	3	I	2 780	2 248	1868	/	/	/	1624	/	573 312	4857
	H23	45	481	ATR	2	I	1244	908	2796	1380	1440	1385	/	/	3 208	/
	H24	33	595	ATR	2	I	1616	952	1660	1064	1520	250	/	/	20 436	/
	H25	41	553	KVX + ATV	3	I	2000	336	3368	/	/	/	4292	/	968	/
	H26	53	505	TRU + RTV + FAPV	2	I	680	540	904	2 508	1628	412	1520	408	4047	/

Tipos celulares	Pacientes	Edad	recuento de T CD4 ⁺	Ultimo tratamiento	Avirémico durante (años)	simulado	quetocina	SAHA	quetocina+ SAHA	prostratina	quetocina+ prostratina	BIX-01294	BIX- 01294+ SAHA	C ⁺	copias de ADN de VIH/ 10 ⁶ células
	H27	63	805	TRU + NVP	2	I	I	I	I	I	I	I	I	2040	670
	H28	61	818	KVX + EFV	4	I	4944	1480	3632	2 540	1392	I	6312	632	4643
	H29	45	564	TRU + RTV + FAPV	2	I	300	I	200	3 532	424	/	/	957 136	1193
	H30	55	401	TRU + NVP	1	I	328	I	668	/	/	/	/	2 112	1373
	H31	48	952	TZV	8	I	I	420	I	704	I	/	/	10 180	1780
	H32	53	424	ATR	1	I	2456	416	2668	/	/	/	/	105 944	8197
	H33	37	616	TRU + KLT	2	I	1000	412	872	420	1108	1780	1132	2 308	2533
	H34	48	821	TRU + RTV + ATV	1	I	I	I	I	I	892	1360	I	400	1363

Además de la Tabla 3: Los cultivos de células de pacientes se trataron de forma simulada o se trataron con los compuestos indicados. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo (en copias/ml; I significa por debajo del umbral y / indica una condición no analizada). El ADN total de VIH-1 se expresa como copias de ADN de VIH-1/10⁶ células o como el log de copias de ADN de VIH-1/10⁶ células. Los cultivos indicados en gris mostraron una mayor producción vírica con la combinación de fármacos que con los fármacos solos, mientras que los cultivos indicados en negro se reactivaron solo mediante el tratamiento combinado y no mediante los fármacos de forma individual.

Figura 3. Los tratamientos combinatorios que incluyen quetocina inducen una mayor producción vírica en algunos cultivos ex vivo de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART. Los cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo se trataron de forma simulada o se trataron como se indica. Seis días después del tratamiento, se midió la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo (en copias/ml). **(a) La combinación de quetocina + prostratina induce la recuperación del VIH-1 en linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART.** Los cultivos de pacientes reactivados se clasificaron en las categorías relevantes, donde la recuperación del VIH-1 después del tratamiento combinado presentó una mayor producción vírica que después del tratamiento individual. **(b) La combinación de quetocina + SAHA induce la recuperación del VIH-1 en linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART con carga vírica indetectable.** Los cultivos de pacientes reactivados se subdividieron en dos categorías relevantes: (b1) cultivos en los que la recuperación del VIH-1 después del tratamiento combinado fue mayor que después de los tratamientos individuales, (b2) y cultivos en los que se observó una reactivación sinérgica de la producción de ARN vírico después de los tratamientos combinados.

Tabla 4. BIX-01294 solo induce la recuperación del VIH-1 en linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART con carga vírica indetectable. Los cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo se trataron de forma simulada o se trataron con BIX-01294. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo en copias/ml (I indica por debajo del umbral).

Tabla 4: Linfocitos T HLA DR⁻ CD25⁻ CD69⁻ CD4⁺

Pacientes	simulado	BIX-01294	C ⁺
H21	I	665	524
H22	I	1624	573 312
H23	I	1385	3 2028 25
H24	I	250	20 436
H25	I	4292	968
H26	I	412	408
H27	I	I	2 040
H28	I	I	632
H33	I	1 780	2 308
H34	I	1 360	400 30
Pacientes reactivados	0	8	10
% de reactivación	0	80	100

Figura 4. BIX-01294 en combinación con SAHA induce la recuperación del VIH-1 en linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART, con carga vírica indetectable. Los cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo se trataron de forma simulada o se trataron con BIX-01294 solo, con SAHA solo o con la combinación SAHA+BIX- 01294. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo en copias/ml (I indica por debajo del umbral). Se muestra una categoría relevante de cultivos de células de pacientes en los que los inventores observaron un aumento sinérgico del número de copias de ARN vírico por mililitro, después del tratamiento combinado.

B. Resultados para los inhibidores de la metilación del ADN en combinación con HDACI

Figura 5. Activación sinérgica de la expresión del VIH-1 por 5-aza-CdR y HDACI en la línea celular J-Lat 8.4. La línea celular J-Lat 8.4, que alberga un provirus de VIH-1 latente de longitud completa que contiene el gen que codifica la proteína verde fluorescente GFP en lugar de nef, se trató de forma simulada o se trató con 5-aza-CdR durante 48 horas. Después, se añadieron los HDACI durante 24 h. Se indican las medias y los errores típicos de las medias de las muestras por duplicado. Se representa un experimento representativo de tres. A. A las 72 h postratamiento con 5-aza-CdR, se midió la producción de p24 en el sobrenadante celular. El resultado obtenido con células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1. B. A las 72 h postratamiento con 5-aza-CdR, análisis por FACS y representación del porcentaje de células GFP⁺ en histogramas. C. Se extrajo el ARN total de estas células y se transcribió de forma inversa utilizando cebadores aleatorios. Después, los ADNc se usaron en una reacción de PCR con parejas de cebadores que hibridaban con TAR, para cuantificar los transcritos iniciados y en el gen Tat para cuantificar los transcritos extendidos. Los resultados se normalizaron utilizando los cebadores del gen de la β-actina. Se presentan como histogramas que representan la inducción en veces en comparación con las condiciones de tratamiento de forma simulada.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en singular y plural a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

5 Los términos "que comprende", "comprende" y "compuesto de" como se usan en el presente documento son sinónimos de "que incluye", "que incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o abiertos y no excluyen componentes, elementos o etapas de método adicionales no enumerados.

10 La enumeración de intervalos numéricos por valores extremos incluye todos los números y fracciones abarcados dentro de los intervalos respectivos, así como los valores extremos enumerados.

15 El término "aproximadamente", como se usa en el presente documento, se refiere a un valor medible como un parámetro, una cantidad, una duración temporal y similares, pretende abarcar variaciones de y desde el valor especificado, en particular variaciones del +/-10 % o menos, preferentemente del +/- 5 % o menos, más preferentemente del +/- 1 % o menos, y aún más preferentemente del +/- 0,1 % o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que tales variaciones son apropiadas para realizar la divulgación. Debe entenderse que el valor al que se refiere el modificador "aproximadamente" también se divulga de forma específica y preferente.

20 Salvo que se defina de otro modo, todos los términos utilizados en la divulgación, incluidos los términos técnicos y científicos, tienen el significado que el que entiende comúnmente un experto en la materia a la cual pertenece la presente divulgación. Mediante una guía adicional, se pueden incluir definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente divulgación.

25 Para los métodos generales relacionados con la divulgación, se hace referencia, entre otros, a libros de texto muy conocidos, incluyendo, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed." (Sambrook *et al.*, 1989), Animal Cell Culture (R. I. Freshney, ed., 1987), la serie Methods in Enzymology (Academic Press), Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, ed., 1987); "Current Protocols in 10 Molecular Biology and Short Protocols in Molecular Biology, 3ª Ed." (F. M. Ausubel *et al.*, eds., 1987 y 1995); Recombinant DNA Methodology II (R. Wu ed., Academic Press 1995). Las técnicas generales en cultivos celulares y usos de medios se describen, entre otros, en Large Scale Mammalian Cell Culture (Hu *et al.* 1997. Curr Opin Biotechnol 8: 148); en Serum-free Media (K. Kitano. 1991. Biotechnology 17: 73); o en Large Scale Mammalian Cell Culture (Curr Opin Biotechnol 2: 375, 1991).

35 El término "retrovirus" se usa en el presente documento en su significado convencional y generalmente abarca una clase de virus en los que el material genético es ARN monocatenario y que emplea transcriptasa inversa para transcribir el ARN vírico en ADN en un hospedador. Los retrovirus previstos en el presente documento pueden pertenecer particularmente a la familia de vírica *Retroviridae*, más particularmente a la subfamilia *Lentivirinae*. Los retrovirus previstos en el presente documento pueden ser patógenos (es decir, provocar un fenotipo de enfermedad demostrable en un hospedador infectado) o pueden no ser patógenos (es decir, en donde la afección de un hospedador infectado no manifiesta un fenotipo demostrable de enfermedad). Particularmente previstos en el presente documento son los retrovirus que infectan animales, más preferentemente retrovirus de animales de sangre caliente, incluso más preferentemente de animales vertebrados, aún más preferentemente de mamíferos, todavía más preferentemente de primates, y muy preferentemente de seres humanos. Son particularmente preferentes en el presente documento los retrovirus humanos que incluyen, pero sin limitación, el VIH-1, VIH-2, el VTLH -1 y el VTLH -2.

45 La referencia a "enfermedades o afecciones asociadas con un retrovirus" abarca, generalmente, a todos y cada uno de los estados de un hospedador que son el resultado de que el hospedador se haya infectado con el retrovirus. Sin limitación, tales estados pueden tipificarse por la presencia de material biológico vírico en el hospedador infectado, por ejemplo, la presencia de provirus en el genoma de una o más células del hospedador infectado y/o la presencia de ácidos nucleicos víricos, de proteínas víricas o de partículas víricas en el hospedador infectado. Sin limitación, tales estados pueden comprender fases en que el provirus está inactivo o latente, etapas preclínicas en que el virus se produce en el hospedador infectado pero sin síntomas de enfermedad demostrables, así como fases clínicas que implican síntomas de enfermedad demostrables, tales como, por ejemplo, el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) provocado por el VIH-1 y el VIH-2, o la leucemia/linfoma de linfocitos T adultos (LLLA) o la paraparesia espástica tropical (PET) provocada por el VTLH -1.

60 El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un Lentivirus, parte de la familia *Retroviridae*. Es virus de ARN monocatenario, de hebra positiva, diploide y con envoltura. Una vez que ha entrado en la célula diana, el genoma de ARN vírico del virus se transcribe de forma inversa en ADN bicatenario. Esto se hace a través de una transcriptasa inversa codificada por el virus que se transporta junto con el genoma vírico en la partícula del virus. Después de eso, el ADN vírico transcrito se importa al núcleo de la célula y se integra en el ADN celular mediante una integrasa (también codificada por el virus). La latencia del VIH y de otros lentivirus se debe a su capacidad para integrarse en el genoma de la célula hospedadora y de permanecer allí de forma latente, es decir, sin replicación. Debido a esto, el virus evita la detección por el sistema inmunitario y puede permanecer ahí durante años, dando como resultado el denominado "reservorio" de VIH en el sujeto infectado. Una vez que el virus se reactiva, el ADN vírico se transcribirá, produciendo nuevos genomas de ARN y proteínas víricas que se empaquetan y liberan de la célula como nuevas partículas de

virus, las cuales pueden infectar nuevas células. El VIH infecta principalmente las células del sistema inmunitario, debilitando de este modo la respuesta inmunitaria del sujeto infectado, lo que conduce a su nombre "virus de inmunodeficiencia". Un sujeto positivo para el VIH puede desarrollar SIDA, o síndrome de inmunodeficiencia adquirida, cuando el virus tiene la capacidad de reproducirse. Esencialmente, el VIH se unirá y destruirá a los linfocitos T CD4⁺, los macrófagos y los microglíocitos. La destrucción de linfocitos T y de macrófagos hará que el sujeto sea propenso a todo tipo de infecciones que normalmente son fáciles de evitar. Cuando los números de linfocitos T CD4⁺ caen por debajo del nivel de 200 células/μl, se pierde la inmunidad mediada por células, y aparecen infecciones por una diversidad de microbios oportunistas y las infecciones y tumores comunes oportunistas, la mayoría de los cuales se controlan normalmente mediante una inmunidad mediada por linfocitos T CD4⁺ robusta, comienzan entonces a afectar al paciente. Cuando un sujeto con infección por VIH o con SIDA no es tratado, finalmente puede morir por infecciones que de otra manera serían fáciles de curar, debido a la deficiencia del sistema inmunitario.

Debido al carácter latente del VIH, los reservorios de ADN de VIH pueden continuar existiendo durante toda la vida del sujeto infectado, sin ningún signo significativo, por ejemplo, controlado mediante un tratamiento antivirico constante. Sin embargo, detener el tratamiento a la larga dará como resultado la reactivación del virus. Por lo tanto, el sujeto infectado nunca puede liberarse completamente de la infección por VIH.

Se han caracterizado dos tipos de VIH: el VIH-1 y el VIH-2. El VIH-1 es el virus que se descubrió inicialmente y es el tipo más virulento, siendo más infeccioso, y la causa de la mayoría de las infecciones por VIH a nivel mundial. El VIH-2 es menos infeccioso e implica que menos de las personas expuestas al VIH-2 se infectarán por exposición. El VIH-2 se restringe en gran medida a África occidental.

Como se usa en el presente documento, el término "agente" se refiere en líneas generales a cualquier sustancia química (por ejemplo, inorgánica u orgánica), bioquímica o biológica, molécula o macromolécula (por ejemplo, macromolécula biológica), una combinación o mezcla de las mismas, una muestra de composición indeterminada o un extracto hecho de materiales biológicos tales como bacterias, plantas, hongos, o células o tejidos animales. Los "agentes" preferentes, aunque sin limitación, incluyen ácidos nucleicos, oligonucleótidos, ribozimas, polipéptidos o proteínas, péptidos, peptidomiméticos, anticuerpos y fragmentos y derivados de los mismos, aptámeros, sustancias químicas, preferentemente moléculas orgánicas, más preferentemente moléculas orgánicas pequeñas, lípidos, hidratos de carbono, polisacáridos, etc., y cualquier combinación de los mismos.

El término "modular" generalmente denota una alteración, cambio o variación cualitativa o cuantitativa que abarca específicamente tanto el aumento (por ejemplo, la activación), como la disminución (por ejemplo, la inhibición), de lo que se está modulando. El término abarca cualquier grado de tal modulación. Por ejemplo, cuando la modulación efectúa una variable determinable o medible, entonces la modulación puede abarcar un aumento en el valor de dicha variable en al menos aproximadamente el 10 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 20 %, preferentemente en al menos aproximadamente el 30 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 40 %, más preferentemente en al menos aproximadamente el 50 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 75 %, incluso más preferentemente en al menos aproximadamente el 100 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 150 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 % o en al menos aproximadamente el 500 %, en comparación con una situación de referencia sin dicha modulación; o la modulación puede abarcar una disminución o reducción en el valor de dicha variable en al menos aproximadamente el 10 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 20 %, en al menos aproximadamente el 30 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 40 %, en al menos aproximadamente el 50 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 60 %, en al menos aproximadamente el 70 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 80 %, en al menos aproximadamente el 90 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente el 95 %, tal como en al menos aproximadamente el 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso en el 100 %, en comparación con una situación de referencia sin dicha modulación. Preferentemente, la modulación de la actividad y/o el nivel de la diana (o dianas) prevista, es decir, los inhibidores de la metilación del ADN y los inhibidores de las histona metiltransferasas, como se describen en el presente documento, pueden ser específicos o selectivos, es decir, la actividad y/o el nivel de la diana (o dianas) prevista pueden modularse sin alterar sustancialmente la actividad y/o el nivel de dianas aleatorias no relacionadas.

La referencia a la "actividad" de una diana, tal como un complejo o proteína, generalmente puede abarcar uno o más aspectos de la actividad biológica de la diana, tal como, pero sin limitación, uno o más aspectos de su actividad bioquímica, actividad enzimática, actividad de señalización y/o actividad estructural, por ejemplo, dentro de una célula, tejido, órgano o un organismo. Preferentemente, dicha actividad es una actividad de metilación.

En una realización, la actividad de una diana, tal como un complejo o proteína, puede modularse y, en particular, reducirse introduciendo o expresando en una célula, tejido, órgano o un organismo, una variante negativa dominante de dicha diana, por ejemplo, una variante negativa dominante de uno o más constituyentes del complejo, o una variante negativa dominante de la proteína.

La referencia al "nivel" de una diana, tal como un complejo o proteína, puede abarcar preferentemente la cantidad y/o la disponibilidad (por ejemplo, la disponibilidad para realizar su actividad biológica) de la diana, por ejemplo, dentro de una célula, tejido, órgano o un organismo. Por ejemplo, el nivel de una diana puede modularse modulando la expresión de la diana y/o modulando la diana expresada. La modulación de la expresión de la diana se puede lograr u observar,

por ejemplo, a nivel de ARN heterogéneo nuclear (ARNhn), de ARNm precursor (pre-ARNm), de ARNm o de ADNc que codifican la diana. A modo de ejemplo y no de limitación, la disminución de la expresión de una diana puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante transfección (por ejemplo, mediante electroporación, lipofección, etc.) o transduciendo (por ejemplo, usando un vector vírico) una célula, tejido, órgano u organismo con un agente antisentido, tales como, por ejemplo, un oligonucleótido de ADN o ARN antisentido, una construcción que codifica el agente antisentido, o un agente de interferencia de ARN, tal como ARNip o ARNhc, o una ribozima o vectores que los codifican, etc. A modo de ejemplo y no de limitación, el aumento de la expresión de una diana puede lograrse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, mediante transfección (por ejemplo, mediante electroporación, lipofección, etc.) o transduciendo (por ejemplo, usando un vector vírico) una célula, tejido, órgano u organismo con un ácido nucleico recombinante que codifica dicha diana bajo el control de secuencias reguladoras que efectúan un nivel de expresión adecuado en dicha célula, tejido, órgano u organismo. A modo de ejemplo y no de limitación, el nivel de la diana se puede modular a través de la alteración de la formación de la diana (tal como, por ejemplo, del plegamiento, o de interacciones que conducen a la formación de un complejo), y/o la estabilidad (por ejemplo, la propensión de los constituyentes de complejos a asociarse a un complejo o disociarse de un complejo), la degradación o el emplazamiento celular, etc. de la diana.

La expresión "inhibidor de la metilación del ADN" abarca cualquier compuesto o agente conocido o aún desconocido que reduce, impide o elimina la metilación del ADN. Hay varios tipos conocidos de inhibidores de la metilación del ADN: 1) los "inhibidores de la ADN metiltransferasa" o "DNMTi" (forma siglada de *DNA methyltransferase inhibitors*), que abarcan compuestos o agentes que reducen la actividad enzimática de la metiltransferasa de cualquier manera, 2) los "agentes de desmetilación del ADN", que eliminan los grupos metilo del ADN metilado, y 3) los "inhibidores de la metilación del ADN", que impiden la introducción de grupos metilo en el ADN. Los inhibidores de la metilación del ADN se han analizado extensamente para el tratamiento del cáncer y la mayoría son análogos del nucleósido desoxicitidina. Se han desarrollado varias variaciones moleculares de la desoxicitidina, cada una modificada en la posición 5 del anillo de pirimidina, según se revisa, por ejemplo, en "DNA methyltransferase inhibitors - state of the art", por J. Goffin y E. Eisenhauer (*Annals of Oncology* 13: 1699-1716, 2002). Esta característica distintiva es responsable de la inhibición de la DNMT (forma siglada de *DNA methyltransferase*, ADN metiltransferasa). Análogos tales como ara-C y gemcitabina, que no poseen este cambio en el anillo de pirimidina, no inhiben la metilación. Los oligodesoxinucleótidos ejemplares son los que contienen 5-azadesoxicitidina (AzadC), por ejemplo, 5-azacitidina (azacitidina), 5-aza-2'-desoxicitidina (decitabina), 1-β-Darabinofuranosil-5-azacitosina (fazarabina) y dihidro-5-azacitidina (DHAC); los que contienen 5-fluoro desoxicitidina (FdC); o aquellos con dúplex de oligodesoxinucleótidos que contienen 2-H pirimidinona, tales como zebularina. Un mecanismo alternativo para la inhibición de la DNMT es el uso de oligodesoxinucleótidos antisentido (los ODN, forma siglada de *oligodeoxynucleotides*). Estos son ácidos nucleicos sintéticos relativamente cortos diseñados para hibridar con una secuencia de ARNm específica. La hibridación puede bloquear la traducción del ARNm y provocar la degradación del ARNm. Dichos ODN antisentido se han dirigido contra el ARNm de la DNMT y han provocado una disminución del ARNm y la proteína DNMT. MG98, por ejemplo, es un oligodesoxinucleótido antisentido dirigido contra la región 3' no traducida del ARNm de DNMT1. Este agente ha demostrado una capacidad para inhibir la expresión de la DNMT1 sin afectar a la DNMT3. Los efectos pueden ser sinérgicos en combinación con decitabina. Como alternativa, se podrían utilizar agentes desmetilantes no nucleósidos, tales como, pero sin limitación: (-)-epigallocatequina-3-galato, hidralazina, procaina y procainamida.

La expresión "inhibidor de la histona metiltransferasa" o "HMTi" abarca cualquier compuesto o agente conocido o aún desconocido que reduce la actividad de la histona metiltransferasa de cualquier manera. Los ejemplos son: quetocina, UNC0224 de Cayman Chemical; BIX-01294 de Tocris Bioscience; diazepinil-quinazolinamina, inhibidor de la HMTasa (histona metiltransferasa) basado en análogo no SAM (S-adenosilmetionina) de EMD Millipore; BIX 01294 de Enzo Life Sciences, Inc.; BIX-01338 (hidrato) de Sigma-Aldrich; UNC0638 (hidrato) 2-Ciclohexil-N-(1-isopropilpiperidin-4-il)-6-metoxi-7-(3-(pirrolidin-1-il)propoxi)quinazolin-4-amina de Sigma-Aldrich, o cualquier otro compuesto.

La expresión "inhibidor de la histona desacetilasa" o "HDACi" abarca cualquier compuesto o agente conocido o aún desconocido que reduce la actividad de las histonas desacetilasas (las HDAC). Ejemplos son, por ejemplo, los compuestos revisados en Dokmanovic *et al.*, 2007 (*Mol Cancer Res* octubre de 2007 5; 981). Los HDACi en varias familias estructurales, incluyendo los hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas. Los ejemplos preferentes son TSA, Vorinostat (SAHA), ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico y los derivados que se incluyen LAQ- 824, LBH-589 y un derivado de sulfonamida, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589; Novartis AG) un ácido cinámico hidroxámico análogo del ácido M-carboxicinámico bishidroxamato, IF2357 (Italfarmaco SpA) es un HDACi que contiene una fracción de ácido hidroxámico unida a un anillo aromático, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico; péptidos cíclicos tales como el producto natural depsipéptido.(Romidepsina, FK-228, Gloucester Pharmaceutical Inc.), apicidina y el grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228 es un profármaco de un agente activo, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, ácidos alifáticos, tales como butirato, fenilbutirato, butirato de sodio y ácido valproico, AN-9 (butirato de pivaloiloximetilo de Titan Pharmaceutical, Inc.) es un profármaco del ácido butírico, 5 NOX- 275 (MS-275; Syndax Pharmaceutical Inc.) es un derivado de benzamida sintético, MGCD0103 (Methylgene Inc. Pharmion Corp.) es la sal dibromhidrato de una 2-aminofenilbenzamida sustituida. Un ejemplo preferente es ácido hidroxámico de suberoilanolida (SAHA o vorinostat).

La expresión "inductores de NF-kappa-B" abarca todos los compuestos o agentes conocidos o aún desconocidos que

pueden inducir o activar la actividad de NF-kappa-B. Los ejemplos preferentes son Prostratina (12-desoxiforbol 13-acetato), forbol miristato acetato (PMA) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa).

5 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención de ningún modo.

10 Las diversas sustancias o agentes activos de la presente divulgación, tales como los inhibidores de la histona metiltransferasa, los inhibidores de histona desacetilasa y/o los inhibidores de la metilación del ADN, o los inductores de NF-kappa-B, entre otros complejos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores, células y agentes, como se enseñan en el presente documento, o los derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos, pueden formularse en composiciones farmacéuticas o formulaciones con uno o más transportadores/excipientes farmacéuticamente aceptables.

15 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, concuerda con la técnica y significa compatible con los otros ingredientes de una composición farmacéutica y no es nocivo para el receptor del mismo.

20 Como se usa en el presente documento, "transportador" o "excipiente" incluye cualquiera y todos los disolventes, diluyentes, tampones (tales como, por ejemplo, solución salina tamponada neutra o solución salina tamponada con fosfato), solubilizantes, coloides, medios de dispersión, vehículos, cargas, agentes quelantes (tales como, por ejemplo, EDTA o glutatión), aminoácidos (tales como, por ejemplo, glicina), proteínas, disgregantes, aglutinantes, lubricantes, agentes humectantes, emulsionantes, edulcorantes, colorantes, saporíferos, aromatizantes, espesantes, agentes para conseguir un efecto prolongado, recubrimientos, agentes antifúngicos, conservantes, antioxidantes, agentes controladores de la tonicidad, agentes retardantes de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la sustancia activa, se puede contemplar su uso en composiciones terapéuticas.

30 Los vehículos ilustrativos, no limitantes, para su uso en la formulación de composiciones farmacéuticas incluyen, por ejemplo, emulsiones de aceite en agua o de agua en aceite, composiciones acuosas con o sin inclusión de codisolventes orgánicos adecuados para uso intravenoso (IV), liposomas o vesículas que contienen tensioactivo, microesferas, microperlas o microsomas, polvos, comprimidos, cápsulas, supositorios, suspensiones acuosas, aerosoles y otros transportadores obvios para un experto en la materia.

35 Las composiciones pueden formularse para esencialmente cualquier vía de administración, tales como, pero sin limitación, administración oral (tal como, por ejemplo, ingestión o inhalación), administración intranasal (tal como, por ejemplo, inhalación intranasal o aplicación intranasal en las mucosas), administración parenteral (tal como, por ejemplo, inyección o infusión subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o intraesternal), administración transdérmica o transmucosal (tal como, por ejemplo, oral, sublingual, intranasal), administración tópica, rectal, vaginal o instilación intratraqueal, y similares. De este modo, los efectos terapéuticos que se pueden obtener mediante los métodos y composiciones desvelados en el presente documento pueden ser, por ejemplo, sistémicos, locales, específicos de tejido, etc., dependiendo de las necesidades específicas de una aplicación dada divulgadas en el presente documento.

45 Por ejemplo, para la administración oral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en forma de píldoras, comprimidos, comprimidos laqueados, comprimidos recubiertos (por ejemplo, recubiertos con azúcar), gránulos, cápsulas duras y blandas de gelatina, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas, jarabes, emulsiones o suspensiones. En un ejemplo, pero sin limitación, la preparación de las formas farmacéuticas orales se puede lograr adecuadamente mezclando de manera uniforme y a fondo una cantidad adecuada del compuesto activo en forma de polvo, opcionalmente también incluyendo uno o más transportadores sólidos finamente divididos, y formulando la mezcla en una píldora, comprimido o cápsula. Los transportadores sólidos ejemplares pero no limitantes incluyen fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, azúcares (tales como, por ejemplo, glucosa, manosa, lactosa o sacarosa), alcoholes de azúcar (tales como, por ejemplo, manitol), dextrina, almidón, gelatina, celulosa, polivinilpirrolidina, ceras de bajo punto de fusión y resinas de intercambio iónico. Los comprimidos compactados que contienen la composición farmacéutica se pueden preparar mezclando de manera uniforme y a fondo el principio activo con un transportador sólido tal como el descrito anteriormente, para proporcionar una mezcla que tenga las propiedades de compresión necesarias, y después compactando la mezcla en una máquina adecuada para la forma y el tamaño deseados. Los comprimidos moldeados pueden fabricarse moldeando en una máquina adecuada, una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte. Los transportadores adecuados para cápsulas de gelatina blanda y supositorios son, por ejemplo, las grasas, las ceras, los polioles semisólidos y líquidos, los aceites naturales o endurecidos, etc.

65 Por ejemplo, para la administración oral o aerosol nasal o inhalación, las composiciones farmacéuticas pueden formularse con transportadores ilustrativos, tales como, por ejemplo, en solución con solución salina, polietilenglicol o glicoles, DPPC, metilcelulosa, o en mezcla con agentes de dispersión en polvo, empleando adicionalmente alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de la absorción para potenciar la biodisponibilidad,

fluorocarburos y/u otros agentes solubilizantes o de dispersión conocidos en la materia. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración en forma de aerosoles o pulverizadores son, por ejemplo, soluciones, suspensiones o emulsiones de los compuestos desvelados en el presente documento o sus sales fisiológicamente tolerables en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como etanol o agua, o una mezcla de tales disolventes.

5 Si es necesario, la formulación también puede contener, además, otros auxiliares farmacéuticos, tales como tensioactivos, emulsionantes y estabilizantes, así como un propulsor. De manera ilustrativa, el suministro puede ser mediante el uso de un dispositivo de suministro de único uso, un nebulizador para nebulización, un inhalador de polvo activado por la respiración, un inhalador de dosis medida por aerosol (IDM) o cualquier otro de los numerosos dispositivos de suministro nebulizadores disponibles en la técnica. Adicionalmente, también se pueden utilizar tiendas

10 de nebulización o la administración directa a través de tubos endotraqueales.

Los ejemplos de transportadores para la administración a través de las superficies de las mucosas dependen de la vía particular, por ejemplo, oral, sublingual, intranasal, etc. Cuando se administran por vía oral, los ejemplos ilustrativos incluyen manitol, almidón, lactosa, estearato de magnesio, sacárido de sodio, celulosa, carbonato de magnesio y similares, de calidad farmacéutica, siendo preferente el manitol. Cuando se administran de forma simultánea, los

15 ejemplos ilustrativos incluyen polietilenglicol, fosfolípidos, glicoles y glucolípidos, sacarosa y/o metilcelulosa, suspensiones en polvo con o sin agentes formadores de volumen tales como lactosa y conservantes tales como cloruro de benzalconio, EDTA. En una realización particularmente ilustrativa, el fosfolípido 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DPPC) se usa como un transportador acuoso isotónico a aproximadamente el 0,01-0,2 % para la administración intranasal del compuesto de la divulgación materia objeto.

Por ejemplo, para administración parenteral, las composiciones farmacéuticas pueden formularse de forma ventajosa como soluciones, suspensiones o emulsiones con disolventes, diluyentes, solubilizantes o emulsionantes adecuados, etc. Los disolventes adecuados son, pero sin limitación, el agua, la solución salina fisiológica o alcoholes, por ejemplo, etanol, propanol, glicerol, además también soluciones de azúcar tales como la glucosa, azúcar invertida, soluciones de sacarosa o manitol, o alternativamente mezclas de los diversos disolventes mencionados. Las soluciones o suspensiones inyectables pueden formularse de acuerdo con la técnica conocida, utilizando diluyentes o disolventes adecuados, no tóxicos parenteralmente aceptables, tales como manitol, 1,3-butanodiol, el agua, solución de Ringer o una solución isotónica de cloruro sódico, u otros agentes dispersantes o humectantes, y agentes de suspensión, tales como aceites estériles, blandos no volátiles, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos y ácidos grasos, incluido el ácido oleico. Los compuestos divulgados en el presente documento y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos también pueden estar liofilizados y los liofilizados obtenidos se pueden usar, por ejemplo, para la producción de preparaciones para inyecciones o infusiones. Por ejemplo, un ejemplo ilustrativo de un transportador para uso intravenoso incluye una mezcla de etanol USP (forma siglada de *United States Pharmacopea*, farmacopea de los Estados Unidos) al 10 %, propilenglicol o polietilenglicol 600 USP al 40 % y el resto, agua para inyección USP (API). Otros transportadores ilustrativos para uso intravenoso incluyen etanol USP al 10 % y API USP; trietanolamina al 0,01-0,1 % en API USP; o dipalmitoil difosfatidilcolina al 0,01-0,2 % en API USP; y escualeno al 1-10 % o emulsión parenteral de aceite vegetal en agua. Los ejemplos ilustrativos de transportadores para uso subcutáneo o intramuscular incluyen solución salina tamponada con fosfato (PBS), dextrosa al 5 % en API y trietanolamina al 0,01-0,1 % en dextrosa al 5 % o cloruro de sodio al 0,9 % en API USP, o una mezcla 1 a 2 o 1 a 4 de etanol USP al 10 %, propilenglicol al 40 % y el resto una solución isotónica aceptable tal como dextrosa al 5 % o cloruro de sodio al 0,9 %; o dipalmitoil difosfatidilcolina en API USP al 0,01-0,2 % y escualeno del 1 al 10 % o emulsiones parenterales de aceite vegetal en agua.

45 Cuando se prefieren formulaciones acuosas, tales pueden comprender uno o más tensioactivos. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de una dispersión micelar que comprende al menos un tensioactivo adecuado, por ejemplo, un tensioactivo fosfolípido. Los ejemplos ilustrativos de fosfolípidos incluyen diacil fosfatidilgliceroles, tales como dimiristoil fosfatidilglicerol (DPMG), dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG), y diestearoil fosfatidilglicerol (DSPG), diacil fosfatidil colinas, tales como dimiristoil fosfatidilcolina (DPMC), dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) y diestearoil fosfatidilcolina (DSPC); ácidos diacil fosfatídicos, tales como ácido dimiristoil fosfatídico (DPMG), ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA), y ácido diestearoil fosfatídico (DSPA); y diacil fosfatidil etanolaminas tales como dimiristoil fosfatidil etanolamina (DPME), dipalmitoil fosfatidil etanolamina (DPPG), y diestearoil fosfatidil etanolamina (DSPG). Normalmente, una relación molar de tensioactivo:sustancia activa en una formulación acuosa será de aproximadamente 10:1 a aproximadamente 15 1:10, más normalmente de aproximadamente 5:1 a aproximadamente

55 1:5, sin embargo, se puede usar en una formulación acuosa cualquier cantidad eficaz de tensioactivo para adaptarse mejor a los objetivos específicos de interés.

Cuando se administra por vía rectal en forma de supositorios, estas formulaciones se pueden preparar mezclando los compuestos divulgados en el presente documento con un excipiente no irritante adecuado, tal como manteca de cacao, ésteres de glicérido sintéticos o polietilenglicoles, que son sólidos a temperaturas normales, pero que se licuan y/o se disuelven en la cavidad rectal para liberar el fármaco.

60

Los transportadores adecuados para microcápsulas, implantes o varillas, por ejemplo, los copolímeros de ácido glicólico y ácido láctico.

65

Un experto en la materia reconocerá que la descripción anterior es ilustrativa en lugar de exhaustiva.

De hecho, muchas técnicas de formulación adicionales y los excipientes y soluciones transportadoras farmacéuticamente aceptables son muy conocidos por los expertos en la materia, como lo es el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para utilizar las composiciones concretas descritas en el presente documento en una diversidad de regímenes de tratamiento.

5 Las presentes sustancias activas se pueden usar solas o en combinación con cualquier terapia antirretrovírica (cART)

conocida en la técnica ("terapia de combinación"). Las terapias de combinación como se contemplan en el presente documento pueden comprender la administración de al menos una sustancia activa divulgada en el presente documento y al menos otro principio farmacéuticamente o biológicamente activo. Dicha sustancia activa (o sustancias activas) presente y dicho principio activo (o principios activos) farmacéuticamente o biológicamente activos pueden administrarse en la misma o en distinta formulación farmacéutica (o formulaciones farmacéuticas), de forma simultánea o secuencial en cualquier orden. Los fármacos antirretrovíricos ejemplares en la terapia de combinación con los cuales se pueden emplear las presentes sustancias activas incluyen, pero sin limitación, inhibidores nucleosídicos y nucleotídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, inhibidores de la proteasa, inhibidores de la integrasa, inhibidores de la entrada, inhibidores de la maduración y un amplio espectro de inhibidores. La dosificación o cantidad de las presentes sustancias activas utilizadas, opcionalmente en combinación con uno o más de otros compuestos activos a administrar, depende del caso individual y, como es habitual, debe adaptarse a las circunstancias individuales para lograr un efecto óptimo. Por lo tanto, depende de la naturaleza y la gravedad del trastorno a tratar, y también del sexo, la edad, el peso corporal, el estado de salud general, la dieta, el modo y el tiempo de administración, y la respuesta individual del ser humano o animal a tratar, de la vía de administración, la eficacia, la estabilidad metabólica y la duración de la acción del compuesto utilizado, de si la terapia es aguda o crónica, o profiláctica, o de si se administran otros compuestos activos además del agente (o agentes) divulgado en el presente documento.

25 Sin limitación, dependiendo del tipo y de la gravedad de la enfermedad, una dosificación diaria típica podría variar de aproximadamente 1 µg/kg a 100 mg/kg de peso corporal, o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. Para administraciones repetidas a lo largo de varios días o un periodo mayor, dependiendo de la afección, se continuará el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de enfermedad. Una dosificación preferente de la sustancia activa divulgada en el presente documento puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg de 20 de peso corporal. Por lo tanto, pueden administrarse al paciente una o más dosis de aproximadamente 0,5 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg o 10 mg/kg (o cualquier combinación de las mismas). Dichas dosis pueden administrarse de manera intermitente, por ejemplo, cada semana o cada dos semanas.

35 A menos que se indique otra cosa, "sujeto" o "paciente" se utilizan indistintamente y se refieren a animales, preferentemente animales de sangre caliente, más preferentemente vertebrados, incluso más preferentemente mamíferos, aún más preferentemente primates y, en concreto, incluyen a pacientes humanos y a mamíferos y primates no humanos. Los pacientes preferentes son sujetos humanos.

40 Como se usa en el presente documento, una frase tal como "un sujeto que necesita tratamiento" incluye sujetos que se beneficiarían del tratamiento de una afección dada, en particular de una infección retrovírica. Dichos sujetos pueden incluir, pero sin limitación, los que han sido diagnosticados de dicha afección, los propensos a contraer o desarrollar dicha afección y/o aquellos en quienes se debe prevenir dicha afección.

45 Los términos "tratar" o "tratamiento" abarcan tanto el tratamiento terapéutico de una enfermedad o afección ya desarrollada, tal como la terapia de una infección retrovírica ya desarrollada, así como las medidas profilácticas o preventivas, en donde el objetivo es prevenir o disminuir la posibilidades de incidencia de una afección no deseada, tal como para prevenir las posibilidades de contracción y progresión de una infección retrovírica. Los resultados beneficiosos o deseados pueden incluir, pero sin limitación, el alivio de uno o más síntomas o uno o más marcadores biológicos, la disminución del alcance de la enfermedad, el estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la enfermedad, el retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, la mejora o alivio de la patología y similares. "Tratamiento" también puede significar prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. En una realización preferente, "tratamiento" implica la erradicación de los "reservorios" latentes de infectados con VIH, con el objetivo de liberar al paciente de la infección por VIH.

55 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un compuesto activo o agente farmacéutico que inhibe o retrasa en un sujeto la aparición de un trastorno, como lo busca un investigador, veterinario, médico u otro facultativo.

60 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de compuesto activo o agente farmacéutico que suscita la respuesta biológica o médica en sujeto un sistema tejido, que está siendo buscada por un investigador, veterinario, médico u otro facultativo, que puede incluir, entre otros, el alivio de los síntomas de la enfermedad o trastorno que se está tratando. Se conocen los métodos en la técnica para determinar las dosis terapéutica y profilácticamente eficaces para los presentes compuestos.

65

Ejemplos

Métodos:

los ensayos de ELISA de p24, de RT-qPCR y de FACS se realizaron utilizando las metodologías habituales. Las pruebas de reactivación se llevaron a cabo en cultivos de CMSP empobrecidas en CD8⁺ o cultivos de HLA DR aislados de la sangre de individuos tratados con cART VIH-1+ con carga vírica indetectable (el crecimiento del VIH-1 se evaluó con el kit Roche Amplicor y Abbott HIV-1 Realtime).

Ejemplo 1: Efecto del inhibidor de la histona metiltransferasa quetocina sobre la expresión génica del VIH-1.

En este experimento, los inventores muestran que la quetocina, un inhibidor de la histona metiltransferasa, aumenta la actividad transcripcional del 5'LTR del VIH-1 en líneas de células T linfoides transfectadas. Se transfectaron de forma transitoria las líneas celulares Jurkat y SupT1 con la construcción indicadora episómica de vector pLTR_{HIV-1}-luc. A las 24 h postransfección, las células transfectadas se trataron de forma simulada o se trataron con quetocina. Las células se lisaron y se sometieron a ensayo en cuanto a la actividad luciferasa. Las actividades de la luciferasa se normalizaron con respecto a la concentración de proteína. El resultado obtenido con células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1. Los resultados se representan en la Figura 1(A y B), mostrando un claro aumento de la actividad luciferasa en las células tratadas con quetocina frente a las células tratadas de forma simulada.

Además, los inventores analizaron el efecto de la quetocina en la línea de células T linfoides J-Lat 15.4 infectadas de forma latente y demostraron que la quetocina aumenta la producción de VIH-1. La línea celular J-Lat 15.4 se trató de forma simulada o se trató con quetocina. Se midió la producción de la proteína p24 del VIH-1 en los sobrenadantes celulares. El resultado obtenido con células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1. Los resultados se representan en la Figura 1(C) y muestran claramente un aumento en la formación de p24 cuando las células T linfoides infectadas de forma latente se tratan con quetocina.

La Figura 2 muestra la transcripción aumentada del VIH-1 en la línea celular infectada de forma latente J-Lat 15.4, cuando se trata con quetocina. La línea celular J-Lat 15.4 se trató de forma simulada o se trató con quetocina. El tratamiento con quetocina activa claramente la transcripción de ARN del VIH-1. El ARN de VIH-1 se cuantificó de la siguiente manera: Se extrajo el ARN total de estas células y se transcribió de forma inversa utilizando cebadores aleatorios. Después, los ADNc se usaron en una reacción de PCR con parejas de cebadores que hibridaban con TAR (DIR, 5'-GTTAGACCAGATCTGAGCCT-3' e INV, 5'-GTGGGTTCCCTAGTTAGCCA-3') para cuantificar los transcritos iniciados o con Tat (DIR, 5'-ACTCGACAGAGGAGAGCAAG-3' e INV, 5'-GAGAATCTGACTGTCTGATGA-3') para cuantificar los transcritos extendidos. Los resultados se normalizaron utilizando cebadores del gen de actina β (DIR, 5'-GTCGACAACGGCTCCGGC-3' e INV, 5'-GGTGTGGTGCCAGATTTTCT-3') y se presentan como histogramas que indican la inducción en veces en comparación con las condiciones de tratamiento de forma simulada.

Ejemplo 2: La quetocina induce la recuperación del VIH-1 en CMSP empobrecidas en CD8⁺ y en linfocitos T HLA DR⁻ CD4⁺ procedentes de individuos positivos para VIH-1 tratados con cART con carga vírica indetectable.

Se trataron cultivos que comprendían 6,10⁶ CMSP empobrecidas en CD8⁺ de forma simulada o con quetocina. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo mediante el método Amplicor (Roche Diagnostics). Los resultados se representan en la Tabla 1 y en la 2A. Se calculó el porcentaje de reactivación en todos los pacientes reactivados. Nueve de los dieciocho cultivos de CMSP analizados reactivaron la expresión de VIH-1 en respuesta al tratamiento con quetocina, mientras que ninguno de ellos lo hizo cuando se trató de forma simulada. Posteriormente, se realizaron cultivos de dilución limitante de linfocitos T HLA DR⁻ CD4⁺ y estos cultivos se trataron de forma simulada o se trataron con quetocina. El último cultivo de dilución positivo indica la presencia de al menos una célula que porta virus VIH-1 competente para la replicación. Se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo mediante el método Amplicor (Roche Diagnostics). Los valores se expresan en copias de ARN de VIH-1/ml. Los resultados muestran que la quetocina induce la recuperación del VIH-1 (reactivación) en 6 de 7 cultivos de pacientes (Tabla 2B). Además, BIX-01294 induce la recuperación del VIH-1 en linfocitos T HLA DR⁻ CD25⁻ CD69⁻ CD4⁺ de individuos positivos para VIH-1 tratados con ART con carga vírica indetectable. Cultivos de 2,5x10⁵ linfocitos T HLA DR⁻ CD 25⁻ CD69⁻ CD4⁺ se trataron de forma simulada o se trataron con BIX-01294. Seis días después del tratamiento, se determinó la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo (Tabla 4).

Ejemplo 3: El tratamiento combinado de quetocina+prostratina aumenta de forma sinérgica la transcripción y la producción de VIH-1 en las células infectadas de forma latente y en células de pacientes.

La Figura 2 muestra que el tratamiento combinado de quetocina+prostratina aumenta de forma sinérgica la transcripción del VIH-1 en la línea celular infectada de forma latente J-Lat 15.4. La línea celular J-Lat 15.4 se trató de forma simulada o se trató con quetocina, prostratina o una combinación de ambos fármacos. Se extrajo el ARN total de estas células y se transcribió de forma inversa utilizando cebadores aleatorios. Después, los cADN se usaron en una reacción de PCR con parejas de cebadores que hibridaban con TAR, para cuantificar los transcritos iniciados o en Tat para cuantificar los transcritos extendidos. Los resultados se normalizaron usando β actina y se presentan como histogramas que indican la inducción en veces, en comparación con las condiciones de tratamiento de forma simulada.

Además, el tratamiento combinatorio que incluyen quetocina y prostratina induce una mayor producción vírica en algunos cultivos *ex vivo* de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo de pacientes infectados con VIH-1, tratados con cART. Los cultivos de linfocitos T CD4⁺ de memoria en reposo se trataron de forma simulada o se trataron como se indica. Seis días después del tratamiento, se midió la concentración de ARN vírico en los sobrenadantes de cultivo (en copias/ml). Los cultivos de pacientes reactivados se clasificaron en las categorías relevantes, donde la recuperación del VIH-1 después del tratamiento combinado presentó una mayor producción vírica que después del tratamiento individual (Figura 3a).

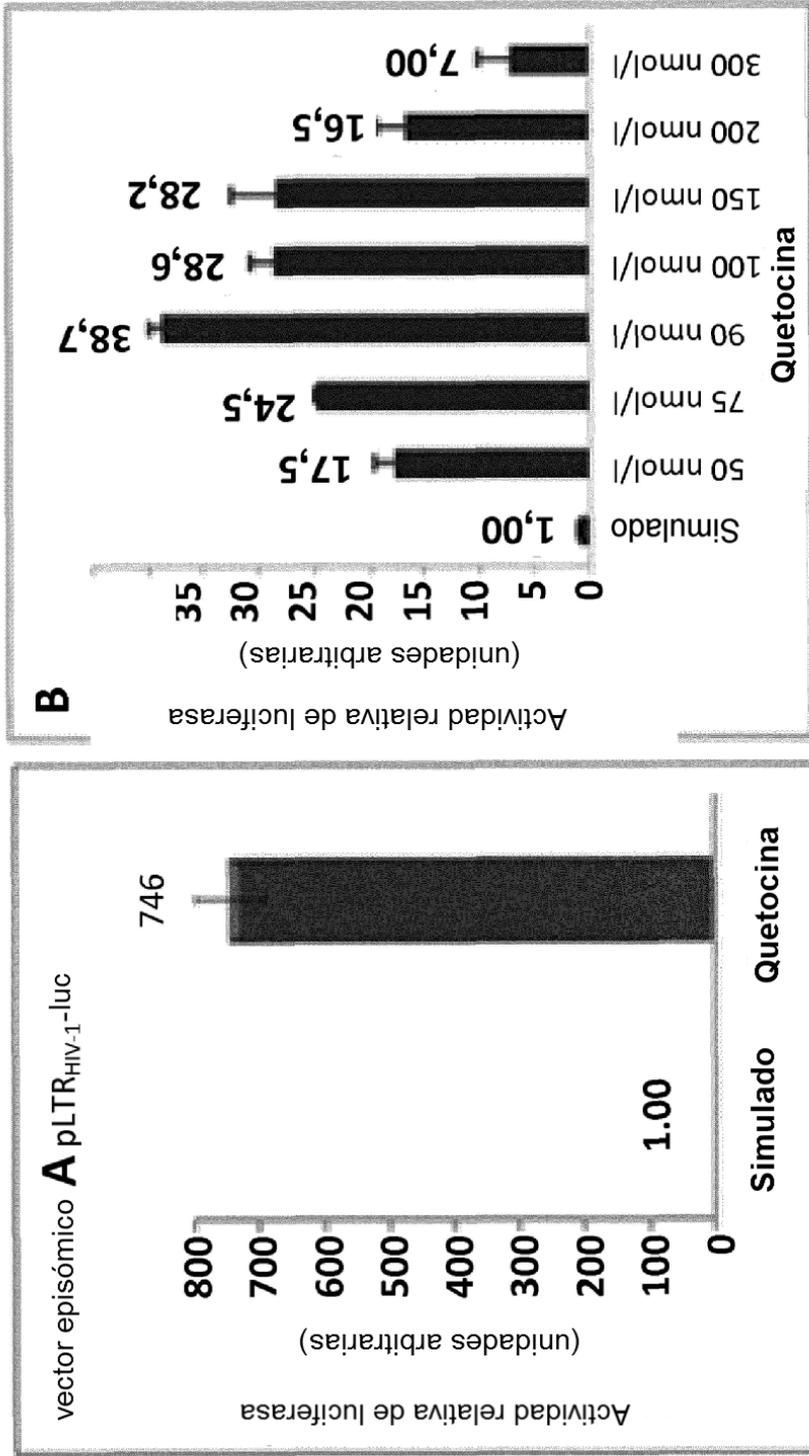
10 **Ejemplo 4: Efecto del tratamiento combinado con el inhibidor de la metilación del ADN 5-aza-CdR y el inhibidor de la HDAC sobre la expresión génica del VIH-1**

La Figura 5 muestra que el cotratamiento con 5-aza-CdR+HDACI aumenta de forma sinérgica la producción de VIH-1 e induce la expresión de VIH-1 en una mayor proporción de células que los fármacos solos en la línea celular infectada de forma latente J-Lat 8.4. La línea celular J-Lat alberga un provirus de VIH-1 latente de longitud completa que contiene GFP (proteína verde fluorescente) en lugar de nef. La línea celular J-Lat 8.4 se trató de forma simulada o se trató con 5-aza-CdR solo o en combinación con los HDACI. A. Se midió la producción de p24 en los sobrenadantes celulares. El resultado obtenido con células tratadas de forma simulada se estableció de forma arbitraria en un valor de 1. B. Las células se fijaron con paraformaldehído y se analizaron mediante citometría de flujo para cuantificar la proporción de células que expresaban GFP. Los resultados (% de células GFP+) se presentan como histogramas. C. El tratamiento combinado de 5-aza-CdR+SAHA o 5-aza-CdR+NaBut induce de forma sinérgica la transcripción a partir del 5'LTR del VIH-1. La línea celular J-Lat 8.4 se trató de forma simulada o se trató con 5-aza-CdR solo o en combinación con SAHA o NABut. Se extrajo el ARN total de estas células y se transcribió de forma inversa utilizando cebadores aleatorios. Después, los cADN se usaron en una reacción de PCR con parejas de cebadores que hibridaban con TAR, para cuantificar los transcritos iniciados o en Tat para cuantificar los transcritos extendidos. Los resultados se normalizaron usando cebadores para el gen de β actina y se presentan como histogramas que indican la inducción en veces, en comparación con las condiciones de tratamiento de forma simulada.

REIVINDICACIONES

1. Una decitabina inhibidora de la metilación del ADN para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por VIH en un sujeto que necesita tal tratamiento, en donde se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de dicho inhibidor de la metilación del ADN a dicho sujeto y en donde una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un inhibidor de la histona desacetilasa seleccionado del grupo que comprende: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas, se administra a dicho sujeto después de haber administrado dicho inhibidor de la metilación del ADN.
2. Un inhibidor de la histona desacetilasa seleccionado del grupo que comprende: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por VIH en un sujeto que necesita tal tratamiento, en donde se administra una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de dicho inhibidor de la histona desacetilasa a dicho sujeto después de haber administrado una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de una decitabina inhibidora de la metilación del ADN a dicho sujeto.
3. La decitabina inhibidora de la metilación del ADN para su uso o el inhibidor de la histona desacetilasa para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa se selecciona de: TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH-589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH- 589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228 (romidepsina), FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenilbutirato, butirato de sodio (NaBut), ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103.
4. La decitabina inhibidora de la metilación del ADN para su uso o el inhibidor de la histona desacetilasa para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa es panobinostat, belinostat, romidepsina, ácido valproico, entinostat, apicidina, SAHA o NaBut.
5. La decitabina inhibidora de la metilación del ADN para su uso o el inhibidor de la histona desacetilasa para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicha infección por VIH está provocada por un retrovirus seleccionado del grupo que consiste en: el VIH-1 y el VIH-2.
6. Una composición o formulación farmacéutica que comprende:
- a) una decitabina inhibidora de la metilación del ADN,
 - b) un inhibidor de la histona desacetilasa seleccionado del grupo que comprende: hidroxamatos, péptidos cíclicos, ácidos alifáticos y benzamidas, y
 - c) uno o más componentes adicionales, como, pero sin limitación, uno o más disolventes y/o uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la infección por VIH en un sujeto que necesita tal tratamiento, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa se administra después de dicho inhibidor de la metilación del ADN.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa se selecciona de: TSA, SAHA, MS-275, ácidos aminosuberoil hidroxámicos, bishidroxamato de ácido M-Carboxicinámico, LAQ-824, LBH- 589, belinostat (PXD-101), Panobinostat (LBH-589), un análogo de ácido cinámico hidroxámico de bishidroxamato de ácido M-carboxicinámico, IF2357, hidroxamidas del ácido ariloxialcanoico, depsipéptido, apicidina, grupo de moléculas peptídicas cíclicas que contienen ácido hidroxámico, FK-228, FK rojo, un peptidomimético cíclico unido por una cadena alifática a un ácido hidroxámico, butirato, fenilbutirato, butirato de sodio (NaBut), ácido valproico, butirato de pivaloiloximetilo, 5 NOX-275 y MGCD0103.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicho inhibidor de la histona desacetilasa es panobinostat, belinostat, romidepsina, ácido valproico, entinostat, apicidina, SAHA o NaBut.
9. Un método para producir las composiciones o la formulación para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende combinar los distintos componentes en una composición o formulación.

Figura 1



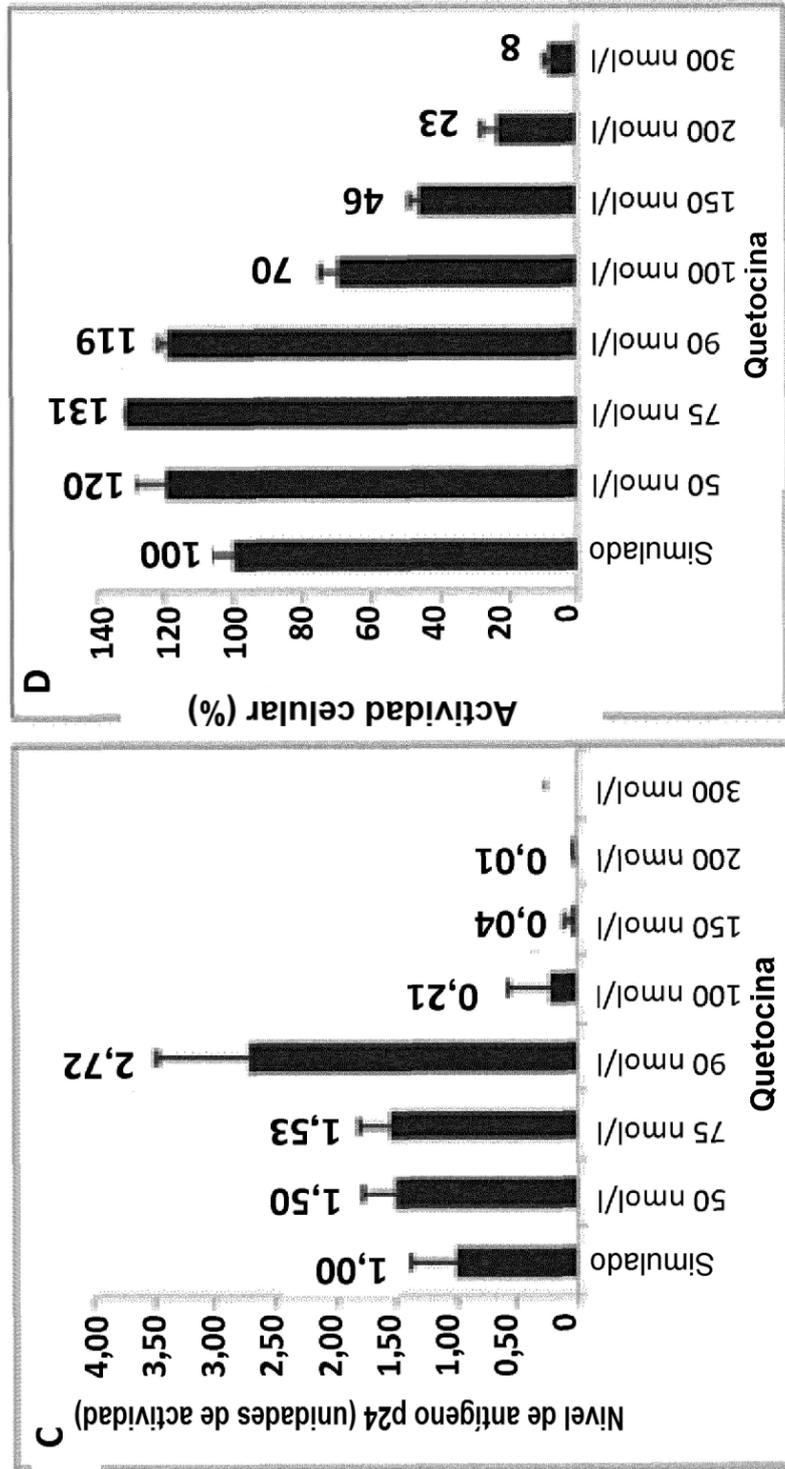


Figura 1

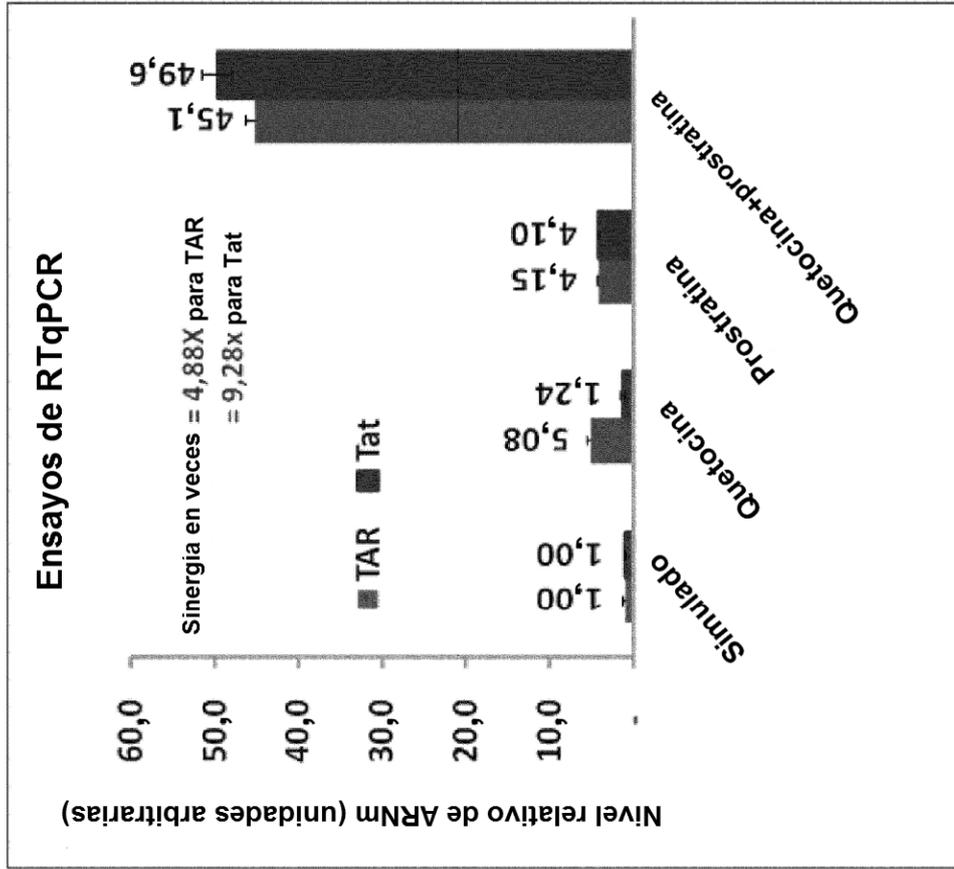
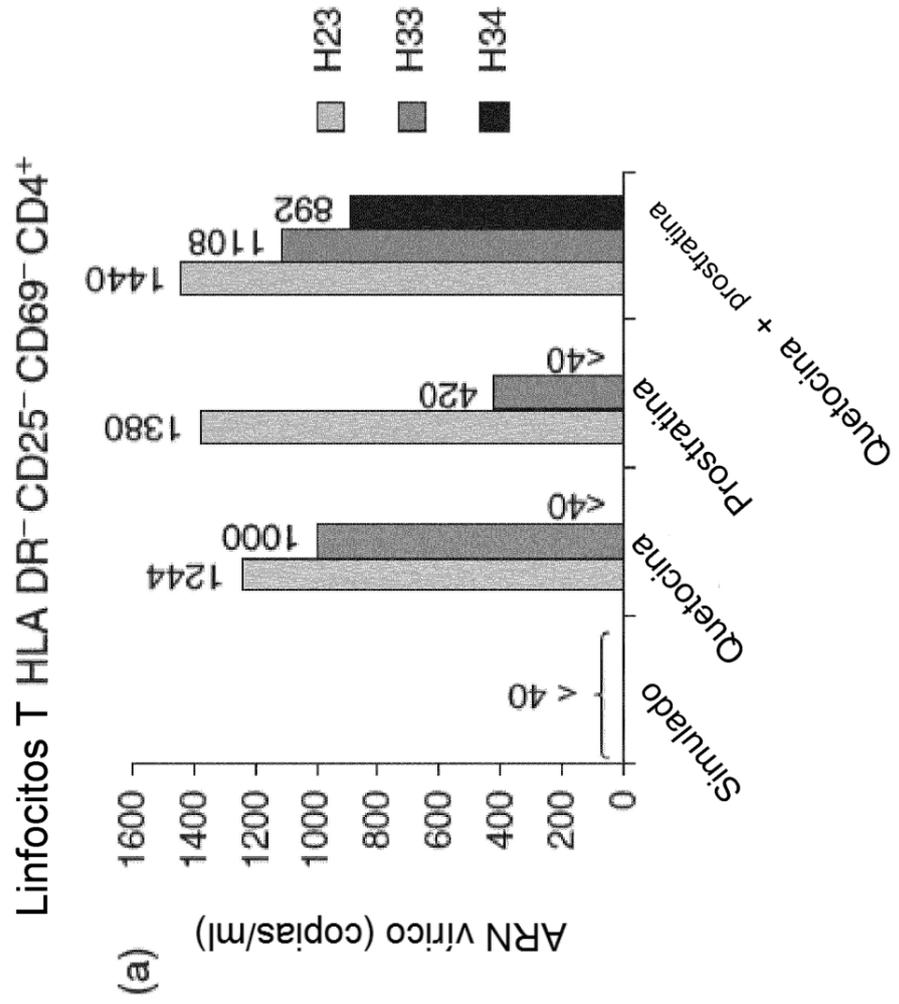


Figura 2

Figura 3



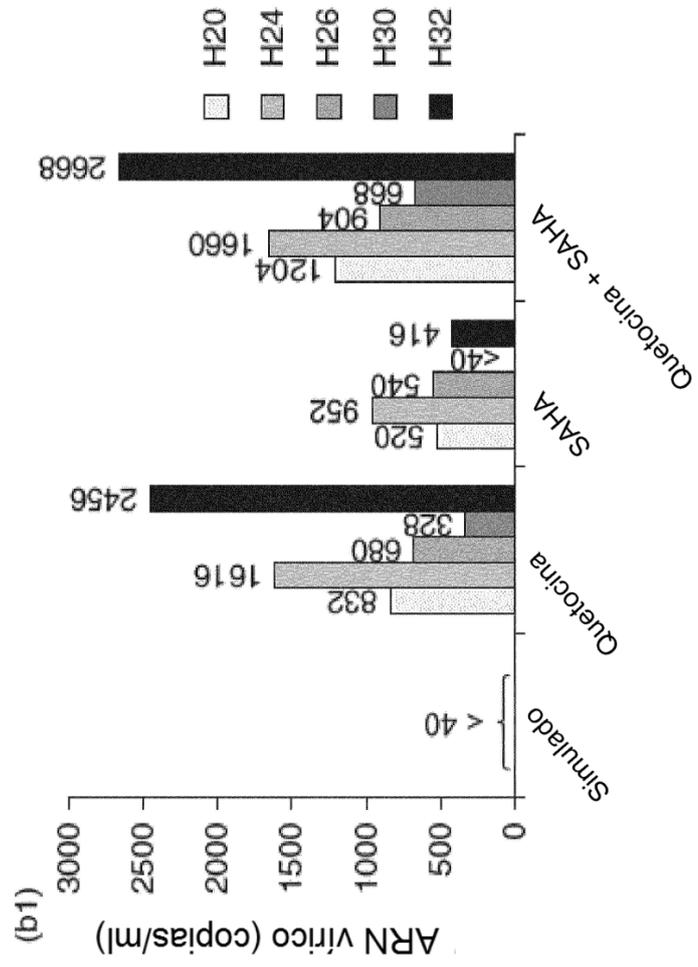


Figura 3

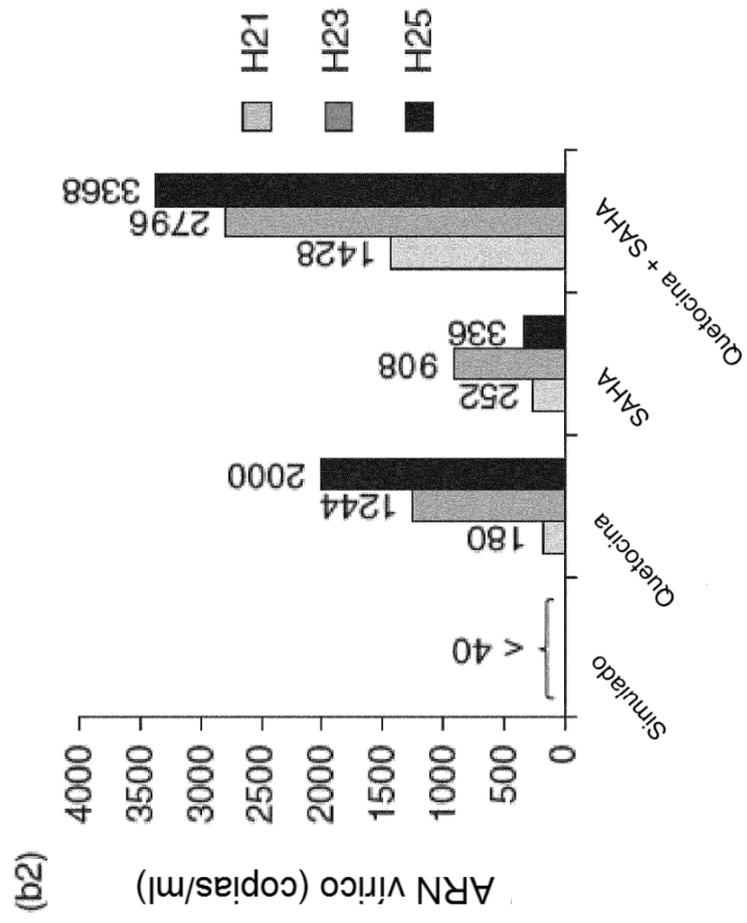


Figura 3

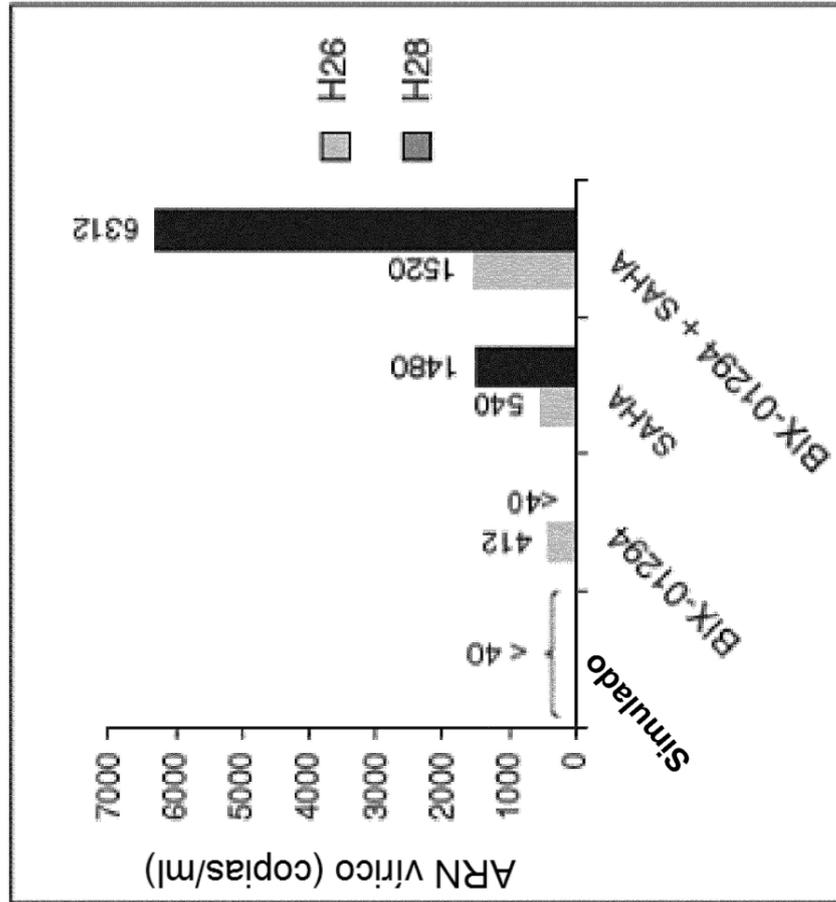


Figura 4

Figura 5

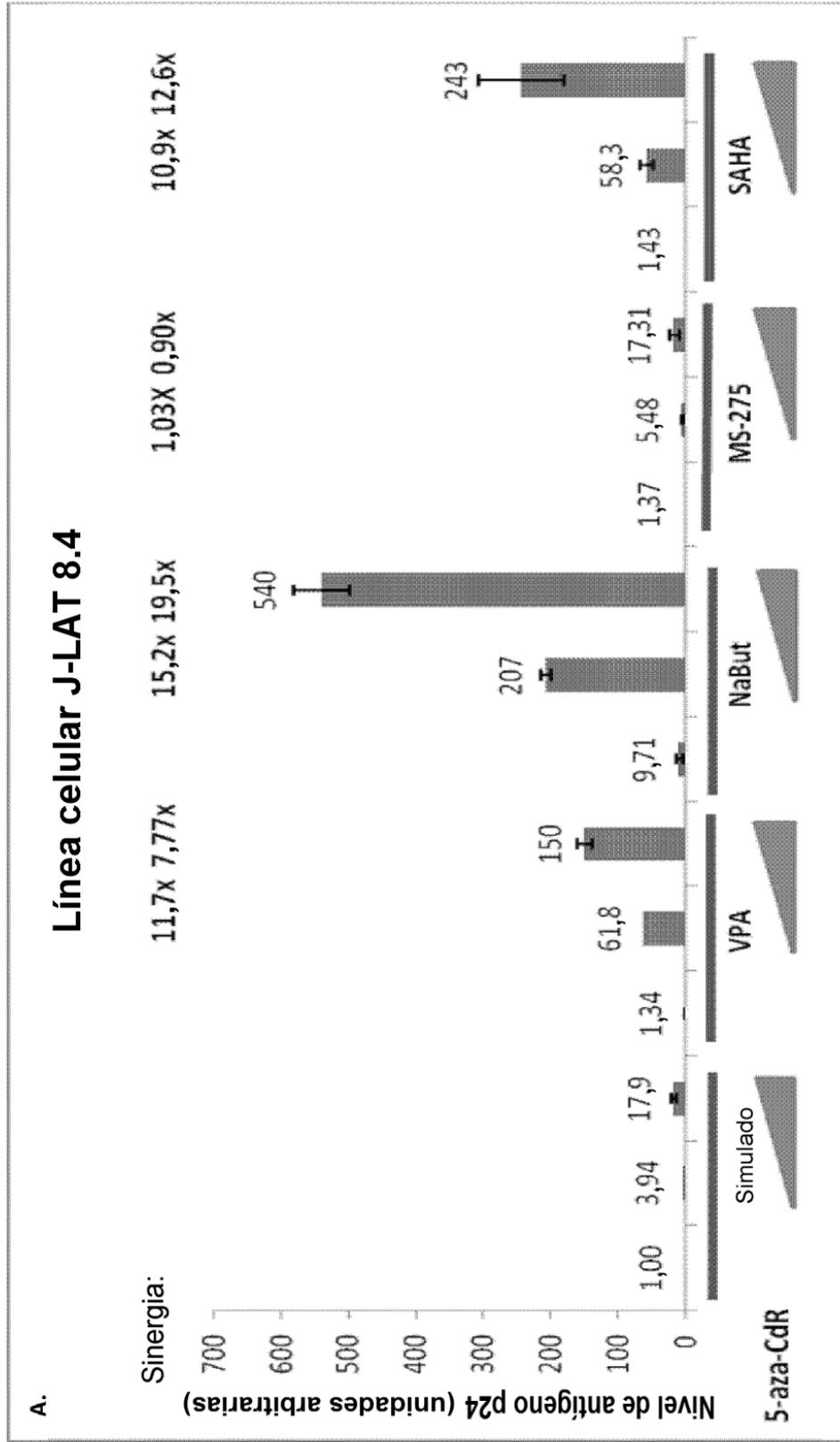


Figura 5

