

Mecanismos de resistencia y fracaso al tratamiento con maraviroc

Rafael Delgado

Laboratorio de Microbiología Molecular. Servicio de Microbiología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid. España.

Maraviroc (MVC) es un nuevo antagonista del correceptor CCR5 y es el primer compuesto antiviral disponible que tiene como diana un factor celular imprescindible para la entrada del VIH. La información disponible en estudios clínicos con MVC indica que la causa principal del fallo terapéutico es, más que el cambio de tropismo, la rápida selección de cepas preexistentes con afinidad por CXCR4 no detectadas por la prueba de referencia. Una prueba de tropismo con sensibilidad mejorada recientemente desarrollado contribuirá a detectar la presencia minoritaria, pero clínicamente significativa, de cepas que utilizan CXCR4. La resistencia a MVC se ha podido evidenciar *in vivo* en algunos pacientes. El mecanismo de esta resistencia parece estar relacionado con cambios en gp120 y, fundamentalmente, en la región V3 que permiten al virus reconocer el correceptor CCR5 unido a la molécula de MVC. Desde un punto de vista práctico, no disponemos por el momento de pruebas estandarizadas para evaluar la susceptibilidad a MVC, aunque en las pruebas fenotípicas de dosis-respuesta un porcentaje máximo de inhibición (MPI) < 95% sería indicativo de resistencia al compuesto. Igualmente, aunque se han descrito algunas mutaciones relacionadas con resistencia en V3 y otras zonas de gp120, esta información preliminar indica diferentes patrones de resistencia y desconocemos por el momento las mutaciones canónicas para poder establecer algoritmos de genotipificación.

Palabras clave: Maraviroc. CCR5. CXCR4. Resistencia. Tropismo.

Mechanisms of resistance and failure of treatment with maraviroc

Maraviroc (MVC) is a new antagonist of the CCR5 co-receptor and is the first antiviral compound available that has a cell factor essential for HIV entry as a target. The information available from clinical studies with MVC suggests that the main cause of therapeutic failure is, more than the tropism change, the rapid selection of pre-existing

strains with an affinity for CXCR4, not detected by the reference test. A recently developed tropism test with an improved sensitivity will help to detect the minority, but clinically significant, presence of strains that use CXCR4. Evidence of resistance to MVC has been shown *in vivo* in some patients. The mechanism of this resistance appears to be related to changes in gp120 and mainly in the V3 region which enables the virus to recognise the CCR5-co-receptor bound to the MVC molecule. From a practical point of view, standardised tests are currently unavailable to assess susceptibility to MVC, although in dose-response phenotype tests a maximum percentage inhibition (MPI) < 95% would be indicative of resistance to the compound. Similarly, although some mutations associated with resistance in V3, and other zones of gp120, have been described, this preliminary information suggests different resistance patterns and at the moment, we do not know the canonical mutations to be able to establish genotyping algorithms.

Key words: Maraviroc. CCR5. CXCR4. Resistance. Tropism.

Introducción

Maraviroc (MVC) es un antiviral único en el arsenal terapéutico principalmente por ser el primer producto disponible que actúa sobre una diana celular¹. Este hecho le confiere también propiedades especiales en su mecanismo de acción y en el desarrollo de resistencias^{2,3}. Todos los anti-retrovirales disponibles hasta el momento interfieren con productos del propio VIH, a diferencia de los productos que inhiben procesos enzimáticos, MVC es un antagonista no competitivo del correceptor CCR5 que presumiblemente se une a una zona relacionada con los dominios extracelulares y transmembrana de la molécula⁴, impidiendo así el reconocimiento por parte de la envuelta del virus y el proceso subsiguiente de cambio conformacional en gp120 y gp41 que conduce a la fusión y entrada de la partícula infectante⁵. La interacción de MVC con CCR5 es prolongada en el tiempo lo que contribuye a un efecto antiviral muy estable a concentraciones subnanomolares⁶.

A pesar de ser CCR5 una diana celular, y por tanto teóricamente invariable, el VIH puede escapar a la acción de MVC por 2 mecanismos principales: el cambio de tropismo para la utilización de un correceptor alternativo, CXCR4, y la modificación de la envuelta para seguir reconociendo el receptor CCR5 a pesar de estar unido a MVC. El primero de los mecanismos, como veremos, parece poco frecuente y la detección de cepas X4 en pacientes tratados

Correspondencia: Dr. R. Delgado.
Laboratorio de Microbiología Molecular. Servicio de Microbiología.
Hospital Universitario 12 de octubre.
Avda. de Córdoba s/n. 28041 Madrid. España.
Correo electrónico: rdelgado.hdoc@salud.madrid.org

con MVC está más bien relacionada con la selección de variantes preexistentes. No obstante, para interpretar el desarrollo de resistencia a MVC y sus mecanismos es preciso tener en cuenta la información disponible sobre la utilización de CCR5 por el VIH y el fenómeno de cambio de tropismo.

CCR5 como receptor del VIH

Aunque CD4 fue rápidamente identificado como un receptor necesario para la entrada del VIH en la célula humana⁷ y había evidencia de que eran necesarias moléculas alternativas para completar la infección, la caracterización de los correceptores CXCR4 y CCR5 se prolongó 12 años a pesar del esfuerzo de un buen número de laboratorios^{8,9}. Es bien conocido que CCR5, en la práctica totalidad de los casos, es el correceptor utilizado por las cepas del VIH que se transmiten e inician la infección¹⁰⁻¹². Estas cepas con tropismo por CCR5 (R5 trópicas) se mantienen detectables durante la evolución de aproximadamente la mitad de los pacientes infectados¹². En el resto, y coincidiendo con fases avanzadas de la enfermedad, se detectan variantes que utilizan el correceptor CXCR4 (X4 trópicas), y también hay cepas duales que pueden utilizar los 2 receptores¹³. Este patrón temporal en el tropismo del VIH por los dos correceptores sigue siendo un enigma y desconocemos en su mayor parte: *a)* por qué la infección comienza invariablemente por cepas R5, y *b)* cuáles son los factores determinantes del cambio de tropismo en un 50% de los pacientes infectados.

Sin embargo, las bases moleculares del tropismo están determinadas con bastante precisión. La utilización de CCR5 o CXCR4 depende fundamentalmente de la secuencia de la región variable de la envuelta V3, y dentro de ésta, de los aminoácidos en las posiciones 11 y 25^{14,15}. La incorporación de aminoácidos básicos, como R o H, determinaría el tropismo X4. Recientemente se han identificado cambios fuera de estas regiones, incluso en gp41, que podrían desempeñar algún papel, aunque menor, en la utilización de los correceptores¹⁶. Estos pequeños cambios en la determinación del tropismo, que podrían anticipar un rápido cambio en la utilización de una molécula más abundante, como es CXCR4, contrastan con la evidencia de que el cambio de tropismo se produce sólo en fases avanzadas y ni siquiera en la totalidad de los casos. La sustitución de cepas R5 por cepas X4 está claramente relacionada con progresión de la enfermedad y continúa el debate sobre la emergencia de cepas que utilizan CXCR4 como causa o más bien consecuencia o de la inmunodeficiencia¹⁷. El tropismo parece no afectar al tratamiento, aunque la existencia de cepas X4 se relaciona significativamente con menores cifras de CD4 y episodios clínicos relacionados con el sida¹⁷. Parece claro que biológicamente las cepas X4 tienen alguna limitación selectiva para transmitirse y replicarse en el contexto de un sistema inmunológico competente¹⁸. Algo de luz sobre este fenómeno puede venir de la virología comparada. Los lentivirus de primates parecen tener exclusivamente tropismo R5¹⁹ y de hecho la aparición de cepas X4 parece ser más frecuentes en el VIH de subtipos B y D que en otros subtipos^{20,21}. Se han caracterizado algunas cepas con muy baja afinidad por CD4 e incluso independientes de CD4, pero que siguen reconocien-

do CCR5²². Estas cepas independientes de CD4 parecen ser más vulnerables a la neutralización por anticuerpos, al igual que ocurre en las cepas X4, lo que podría explicar en parte su ausencia en infección primaria^{19,23}. Todo esto induce a pensar que CCR5 es el receptor principal de lentivirus en primates, incluido el VIH, y ayudaría a entender por qué el cambio de tropismo a X4 no es un fenómeno generalizado y no constituye, como veremos a continuación, el mecanismo principal de desarrollo de resistencias a antagonistas de CCR5.

Una interesante observación, que apoya la idea de que las cepas con tropismo X4 tienen alguna desventaja selectiva en relación con las R5 durante gran parte de la evolución de la enfermedad, se ha realizado en algunos pacientes en tratamiento con MVC. En estos pacientes, que presentaban inicialmente cepas mayoritariamente R5 pero durante el tratamiento seleccionaban variantes minoritarias X4 preexistentes, al suspender la administración de MVC las cepas R5 de nuevo recuperaban su presencia mayoritaria²⁴. No obstante, conviene mencionar que la emergencia de cepas X4 en el contexto del tratamiento con antagonistas de CCR5 es probablemente un fenómeno diferente de la emergencia natural de cepas X4 y podría tener diferentes consecuencias.

Resistencia natural a maraviroc

La resistencia natural a MVC parece ser rara, ya que la actividad del compuesto en una muestra de más de 200 aislamientos procedentes de pacientes *naive* y con exposición y resistencias a otros antirretrovirales demostró muy poca dispersión en la capacidad inhibitoria (CI₉₀ media, 13,7 nmol; intervalo de confianza [IC] del 95%, 12,3-15,1) y no se identificaron casos de resistencia^{2,6}. Asimismo, como veremos más adelante, las mutaciones principales relacionadas con resistencia generadas *in vitro*, A316T e I323V, parecen extraordinariamente raras en las bases de datos de secuencias del VIH disponibles (sólo 2 aislados entre más de 23.000 secuencias estudiadas en la base de Los Alamos National Laboratory)².

Test de tropismo

El tropismo de la glucoproteína de envuelta de VIH-1 por los receptores de quimiocinas, especialmente CCR5, es un acontecimiento clave en la entrada celular del virus y en la patogenia de la infección. La reciente introducción de los primeros antagonistas del receptor CCR5 ha estimulado el desarrollo de herramientas para la determinación del tropismo del VIH-1 en muestras clínicas, ya que hay evidencias que demuestran que sólo los pacientes con cepas R5 se benefician de esta nueva clase de antirretrovirales, y no serían eficaces en aquellos infectados con variantes X4 o, más frecuentemente, con mezclas R5/X4 o tropismo dual. La determinación precisa del tropismo R5/X4 es, por tanto, una clara exigencia clínica.

La mayor parte de los cambios determinantes del cambio de tropismo R5/X4 residen en la región V3 de gp120 y, en concreto, en las posiciones 11 y 25, donde la incorporación de aminoácidos con carga positiva se asocia a la utilización del correceptor CXCR4. Se dispone de un número de algoritmos y herramientas bioinformáticas para prede-

cir el tropismo, basados precisamente en la secuencia de V3 (35 aa)¹⁵. Sin embargo, esta estrategia genotípica, que ha demostrado ser útil a escala clonal, no es suficientemente precisa en muestras clínicas²⁵. Al igual que en la detección de poblaciones minoritarias resistentes a anti-retrovirales, la secuenciación poblacional carece de sensibilidad suficiente para identificar mezclas que no supongan al menos el 20-30% del total de las cepas circulantes, lo que parece ser una eventualidad relativamente frecuente. Ante las carencias de la genotipificación convencional, se ha recurrido a test fenotípicos con virus recombinantes que parecen detectar mejor los casos con tropismo mixto o dual. Estos procedimientos son costosos, lentos (semanas) y hasta el momento sólo está disponible de forma estandarizada el test Trofile, por la compañía Monogram Biosciences, en South San Francisco, CA, Estados Unidos (fig. 2)²⁶. Este procedimiento se revisa en detalle en otro capítulo de esta monografía. En su versión actual el procedimiento Trofile tiene una sensibilidad aproximada para detectar cepas X4 o duales/mixtas (DM) que se encuentren en una proporción del 5-10% de las variantes circulantes. Esta sensibilidad es la principal limitación del test, porque sabemos qué variantes por debajo de ese límite pueden ser clínicamente relevantes, como se puso de manifiesto en el estudio de uno de los 63 pacientes tratados con MVC en monoterapia y que desarrolló en 10 días un aparente cambio de tropismo a X4¹. Cuando la región correspondiente a V3 de la muestra basal, inicialmente identificada con fenotipo R5, se analizó mediante el potente método de pirosecuenciación de alto rendimiento (Secuenciación 454 o Ultra-Deep sequencing²⁷) y se detectó una variante X4 con una frecuencia del 0,02%²⁸. En el contexto de la monoterapia con MVC, la rápida selección de esta secuencia había dado lugar, en un plazo de sólo 10 días, al fracaso de la medicación por un aparente cambio de tropismo. Esta tecnología es por el momento, por su complejidad y precio, inaccesible para el diagnóstico clínico, aunque en un futuro cercano podría ser una herramienta útil en este tipo de estudios. Recientemente, la compañía Monogram ha presentado una modificación del test Trofile para aumentar la sensibilidad de detección de variantes minoritarias^{29,30}. Con la optimización del procedimiento se podrían detec-

tar secuencias con diferente tropismo presentes en proporciones de hasta el 0,1%. Esta mejora, que se introducirá en un futuro próximo para el diagnóstico clínico, es importante porque una proporción sustancial de pacientes que no logran el control virológico con antagonistas de CCR5 tienen poblaciones X4 preexistentes no detectadas por el test fenotípico convencional^{1,29-32}.

Estudios de resistencia a maraviroc in vitro

Una vez identificada una molécula con actividad anti-retroviral se comienza a estudiar las posibles vías de escape a su acción por medio de experimentos in vitro de selección de mutantes resistentes. El sistema de estos estudios consiste en forzar la replicación del VIH a concentraciones crecientes del compuesto para seleccionar los cambios causantes de la pérdida de sensibilidad. Las mutaciones identificadas se introducen, aisladamente y en combinaciones, mediante mutagénesis dirigida en cepas control para confirmar su grado de participación en la resistencia. Aunque la información de los estudios in vitro es de gran utilidad para empezar a caracterizar las vías y los mecanismos de resistencia, es importante señalar que, en gran parte de los casos, las mutaciones de resistencia identificadas en los sistemas in vitro no se corresponden con las detectadas en los pacientes durante el tratamiento, donde el virus está sometido a un conjunto de fuerzas selectivas lógicamente mucho más complejo. No obstante, desde las primeras observaciones con antagonistas de CCR5 parecía claro que el cambio de tropismo, utilización de CXCR4, no era la vía de escape en el desarrollo de resistencia^{32,33}. Más bien los ensayos in vitro identificaron una serie de cambios en V3 y otras zonas de gp120 que permitían al virus seguir reconociendo CCR5 aun con el inhibidor acoplado². Éste parece ser el principal mecanismo de resistencia a MVC in vitro y también in vivo como veremos más adelante^{31,34}. Otro de los aspectos peculiares del estudio de resistencias a MVC, y también derivado de su acción no competitiva sobre una diana celular, es la diferente cinética de la curva dosis-respuesta en los ensayos fenotípicos. Estas curvas en los compuestos antivirales inhibidores competitivos de procesos enzimáticos tienen un perfil sigmoideo, de tal forma que la estimación de la concentración de producto que inhibe el 50% de la infección (CI_{50}) es el parámetro más informativo de su potencia y nos permite comparaciones con otros compuestos y con variantes resistentes, generalmente utilizando el cociente (*fold change*) de la CI_{50} de las diferentes cepas (X) en relación con las controles o *wild type*: $CI_{50} X/CI_{50} wt^{2,3}$. El aspecto de la representación gráfica de la actividad de MVC tiene un perfil diferente (fig. 1), en el que a diferencia de una inflexión con perfil «S» coincidente con la CI_{50} , se alcanza una fase plana que se corresponde con el porcentaje máximo de inhibición (MPI). Este comportamiento probablemente refleja la concentración de saturación de todos los receptores. Todas las moléculas CCR5 estarían unidas al compuesto ya que pequeños niveles de CCR5 no bloqueado podría ser utilizado para la infección. Según Pfizer una MPI < 95% sería indicativo de resistencia³⁵. Se han utilizado hasta el momento diferentes estrategias para valorar la susceptibilidad a MVC en ensayos fenotípicos, bien mediante ensayos de replicación con virus com-

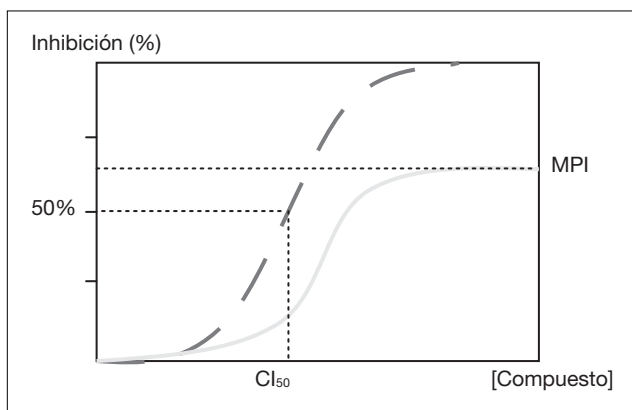


Figura 1. Curva de dosis-respuesta de compuestos antirretrovirales. Línea negra, inhibidor competitivo con nivel de inhibición del 50% de la infección (CI_{50}), y línea gris, curva representativa de MVC con un *plateau* que representa el porcentaje máximo de inhibición (MPI)

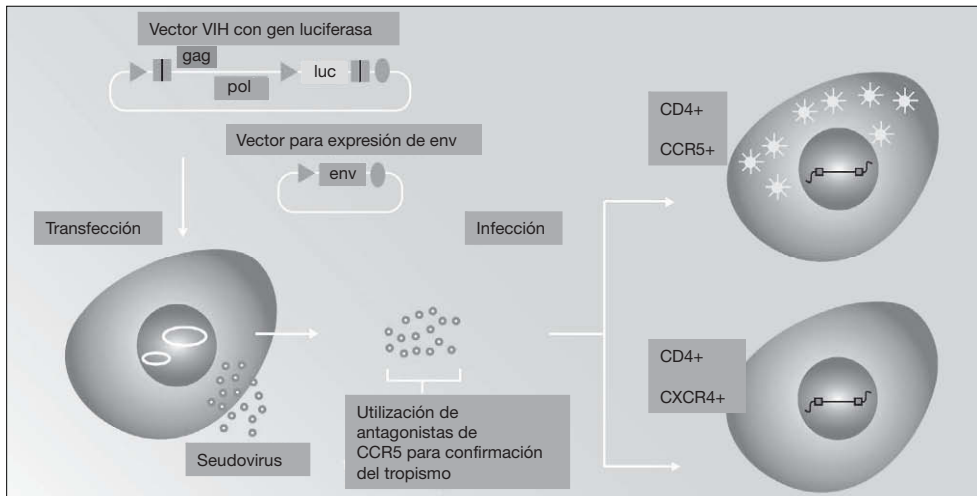


Figura 2. Esquema del procedimiento para determinación del tropismo mediante el test Trofile (Monogram Biosciences). La envuelta de la muestra problema se clona en un vector de expresión y se generan partículas recombinantes con un vector lentiviral que expresa como *reporter* el gen de la luciferasa. Posteriormente, estas partículas se utilizan para infectar 2 líneas celulares que expresan CD4 y CCR5 o CXCR4.

pleto en linfocitos primarios activados o utilizando ensayos de ciclo de infección único con virus recombinantes que expresan la envuelta de los diferentes aislados. Aunque la mayor parte de los estudios se han elaborado con el test PhenoSense para entrada de Monogram Biosciences, estas pruebas por el momento no están completamente estandarizadas para su uso clínico.

Los estudios de generación de resistencias *in vitro* a MVC por medio de pases secuenciales y mutagénesis dirigida^{2,3} han confirmado que la vía principal de resistencia consiste en cambios en V3 y en otras regiones de gp120 que permiten el reconocimiento por la envuelta de CCR5 unido al compuesto. No se produce, por tanto, un cambio de utilización de correceptor, sino que la envuelta sigue siendo R5 pero a la vez es capaz de reconocer el complejo CCR5-MVC. Similares resultados se han encontrado estudiando otros antagonistas de CCR5^{32,33,36}. Los cambios fundamentales observados se han localizado en las posiciones 19 y 26 de V3, aunque mutaciones fuera de esta región y localizadas en V2, C3 y V4 podrían igualmente jugar algún papel directamente en el mecanismo de resistencia o como cambios compensatorios². Un aspecto particularmente interesante es el estudio de las resistencias cruzadas entre antagonistas de CCR5. Los diferentes antagonistas de CCR5 descritos comparten la misma zona de unión en la molécula CCR5 y se podría esperar que la resistencia a uno de ellos afectase a los demás. Sin embargo, esto no parece confirmarse, al menos, en los resultados de experimentos *in vitro* donde los aislamientos resistentes a MVC parecen ser susceptibles a las moléculas SCH-C y aplaviroc², lo que sugiere que aunque el sitio de unión sea común, el impacto en la conformación de la superficie de CCR5, la zona que interactúa con gp120, es diferente.

Resistencia a maraviroc en estudios clínicos

Los 2 grandes estudios realizados con MVC han sido los ensayos MERIT, con pacientes *naive*, y MOTIVATE con pacientes multitratados. Heera et al³⁷ han presentado recientemente los resultados del análisis de fallo virológico en los pacientes que han participado en el ensayo MERIT. En este estudio se incluía a pacientes *naive* que recibían MVC o efavirenz asociado a zidovudina y lamivudina. En

el estudio se incluyó a 724 pacientes que habían sido confirmados por el test Trofile para tropismo R5 en la muestra de cribado. En el momento de realizar la aleatorización se repitió la prueba de tropismo y se encontró que 25 de los 724 pacientes (3,5%) inicialmente identificados como R5 presentaban tropismo DM (dual o mixto). Estos 25 sujetos se asociaron significativamente con carga viral detectable (> 50 copias/ml) a la semana 48: de los 11 aleatorizados a efavirenz, 6 (56%) tuvieron carga viral indetectable a las 48 semanas, mientras que esto sólo se consiguió en uno de los 14 (7%) aleatorizados al brazo de MVC. En 43 sujetos se interrumpió el tratamiento con MVC por falta de eficacia. Coincidiendo con el momento del fallo terapéutico, 19 de estos 43 pacientes presentaron el VIH con tropismo DM. Adicionalmente, se observaron otras mutaciones: M184V en 29/43 y otras posiciones de RT en 7/43. Estas mutaciones se asociaron significativamente al grupo de los 19 con tropismo DM. Del grupo de pacientes con fallo virológico y tropismo R5 se evidenció resistencia a MVC en 2 casos. La conclusión principal del estudio es que la presencia de cepas que utilizan CXCR4 al inicio del tratamiento es el factor predictor más importante de fallo virológico en pacientes tratados con MVC, de hecho se están reevaluando los resultados, aplicando la versión mejorada del test Trofile de Monogram, para determinar con mayor precisión la contribución de cepas X4 o DM preexistentes al fallo virológico con MVC.

Los resultados de los ensayos en pacientes con exposición a antirretrovirales que reciben MVC son similares. El análisis de los estudios de rescate MOTIVATE 1 y 2 ha demostrado que algo más de la mitad de los pacientes que fracasan con MVC tienen virus detectable con tropismo X4 o DM³⁵. De nuevo, y teniendo en cuenta las limitaciones de sensibilidad del test de tropismo, la preexistencia de estas variantes al inicio del estudio parece la causa más probable. El análisis filogenético detallado de gp120 de los aislamientos X4/DM sugiere igualmente que se trata de secuencias preexistentes y que no derivan de cambios en las envolturas R5 que condicionen cambios de tropismo inducidos por la presión selectiva de MVC. En estos estudios se ha realizado un estudio más detallado para aclarar el fallo virológico en pacientes con cepas R5. De los 36 pacientes que presentaron fallo virológico con cepas R5, en 15 (42%) se pudo evidenciar una pérdida de sus-

ceptibilidad in vitro a MVC (MPI < 95%). Llamativamente, de estos 15 pacientes con datos de resistencia a MVC, 9 (60%) no recibieron ningún fármaco plenamente activo en su tratamiento optimizado, por lo que básicamente estaban recibiendo monoterapia con MVC. De los 21 pacientes con cepas R5 sin evidencia de resistencia a MVC (MPI > 95%), 15 (71%) tuvieron valores de MVC indetectables o muy bajo lo que indicaría la baja adherencia al tratamiento como un factor obvio en la explicación del fallo virológico. Todos los 15 casos identificados con MPI a MVC < 95% presentaron cambios en gp120 y fundamentalmente en la región V3³⁵. Estos cambios corresponden a diferentes patrones y parecen estar principalmente localizados en la región distal y el tronco de V3 (fig. 3)³⁵. Será necesario seguir acumulando información sobre las mutaciones más frecuentemente detectadas en pacientes con fallo virológico y su impacto en la sensibilidad a MVC, por el momento no está completamente claro un algoritmo que pueda ser utilizado en la práctica en un estudio genotípico.

Conclusiones

La información disponible sobre resistencia a MVC sugiere que la causa principal de fallo terapéutico es la rápida selección de cepas preexistentes con afinidad por CXCR4 no detectables por la prueba de tropismo de referencia. Es posible que la probable disponibilidad inmediata de una prueba de tropismo con sensibilidad mejorada contribuya a reducir la inclusión de pacientes que no tengan exclusivamente cepas R5. La resistencia a MVC se ha podido evidenciar in vitro e in vivo en algunos pacientes. El mecanismo de esta resistencia parece estar relacionado con cambios en gp120 y fundamentalmente

en la región V3 que permiten al virus seguir reconociendo el correceptor CCR5 a pesar de estar unido a la molécula de MVC. Desde un punto de vista práctico, no disponemos de pruebas estandarizadas para evaluar la susceptibilidad a MVC. El parámetro más informativo para valorar la posible resistencia a MVC sería el MPI en los test fenotípicas de dosis-respuesta in vitro; una MPI < 95% sería indicativa de resistencia al compuesto. Finalmente, aunque se han descrito algunas mutaciones relacionadas con resistencia en V3 y otras zonas de gp120, esta información es preliminar, y probablemente representa diferentes patrones de resistencia. Desconocemos, por el momento, las mutaciones canónicas relacionadas con resistencia a MVC para poder establecer algoritmos de genotipificación.

Declaración de conflicto de intereses

El autor ha declarado no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Fatkenheuer G, Pozniak AL, Johnson MA, Plettenberg A, Staszewski S, Hoepelman AI, et al. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med*. 2005;11:1170-2.
2. Westby M, Smith-Burchnell C, Mori J, Lewis M, Mosley M, Stockdale M, et al. Reduced maximal inhibition in phenotypic susceptibility assays indicates that viral strains resistant to the CCR5 antagonist maraviroc utilize inhibitor-bound receptor for entry. *J Virol*. 2007;81:2359-71.
3. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4721-32.
4. Maeda K, Das D, Ogata-Aoki H, Nakata H, Miyakawa T, Tojo Y, et al. Structural and molecular interactions of CCR5 inhibitors with CCR5. *J Biol Chem*. 2006;281:12688-98.
5. Dimitrov DS. Cell biology of virus entry. *Cell*. 2000;101:697-702.
6. Dorr P, Westby M, Dobbs S, Griffin P, Irvine B, Macartney M, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type 1 activity. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4721-32.
7. Dalgleish AG, Beverley PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 1984;312:763-68.
8. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature*. 1996;382:833-35.
9. Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, et al. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 1996;381:661-66.
10. Long EM, Rainwater SM, Lavreys L, Mandaliya K, Overbaugh J. HIV type 1 variants transmitted to women in Kenya require the CCR5 coreceptor for entry, regardless of the genetic complexity of the infecting virus. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2002; 18:567-76.
11. Bjorndal A, Deng H, Jansson M, Fiore JR, Colognesi C, Karlsson A, et al. Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol*. 1997;71:7478-87.
12. Brumme ZL, Goodrich J, Mayer HB, Brumme CJ, Henrick BM, Wynhoven B, et al. Molecular and clinical epidemiology of CXCR4-using HIV-1 in a large population of antiretroviral-naive individuals. *J Infect Dis*. 2005;192:466-74.
13. Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*. 1996;85:1149-58.
14. Willey RL, Theodore TS, Martin MA. Amino acid substitutions in the human immunodeficiency virus type 1 gp120 V3 loop that change viral tropism also alter physical and functional properties of the virion envelope. *J Virol*. 1994;68:4409-19.
15. Jensen MA, 't Wout AB. Predicting HIV-1 coreceptor usage with sequence analysis. *AIDS Rev*. 2003;5:104-12.

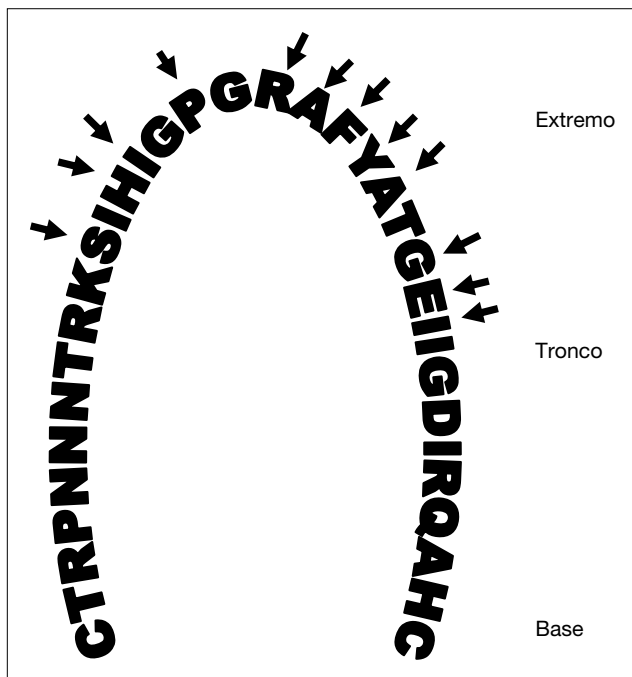


Figura 3. Residuos en V3 en los que se han detectado cambios relacionados con resistencia a MVC en los estudios MOTIVATE 1 y 2. Tomada de Lewis et al³⁴.

16. Huang W, Toma J, Fransen S, Stawiski E, Reeves JD, Whitcomb JM, et al. Coreceptor tropism can be influenced by amino acid substitutions in the gp41 transmembrane subunit of human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. *J Virol.* 2008; Online publication. PMID: 18353956.
17. Waters L, Mandalia S, Randell P, Wildfire A, Gazzard B, Moyle G. The impact of HIV tropism on decreases in CD4 cell count, clinical progression, and subsequent response to a first antiretroviral therapy regimen. *Clin Infect Dis.* 2008;46:1617-23.
18. Pastore C, Ramos A, Mosier DE. Intrinsic obstacles to human immunodeficiency virus type 1 coreceptor switching. *J Virol.* 2004;78:7565-74.
19. Chen Z, Gettie A, Ho DD, Marx PA. Primary SIVsm isolates use the CCR5 coreceptor from sooty mangabeys naturally infected in west Africa: a comparison of coreceptor usage of primary SIVsm, HIV-2, and SIVmac. *Virology.* 1998; 246:113-24.
20. Cilliers T, Nhlapo J, Coetzer M, Orlovic D, Ketas T, Olson WC, et al. The CCR5 and CXCR4 coreceptors are both used by human immunodeficiency virus type 1 primary isolates from subtype C. *J Virol.* 2003;77:4449-56.
21. Morris L, Cilliers T, Bredell H, Phoswa M, Martin DJ. CCR5 is the major co-receptor used by HIV-1 subtype C isolates from patients with active tuberculosis. *AIDS Res Hum Retroviruses.* 2001;17:697-701.
22. Bhattacharya J, Peters PJ, Clapham PR. CD4-independent infection of HIV and SIV: implications for envelope conformation and cell tropism in vivo. *AIDS.* 2003;17 Suppl 4:S35-43.
23. Cecilia D, Kleeberger C, Muñoz A, Giorgi JV, Zolla-Pazner S. A longitudinal study of neutralizing antibodies and disease progression in HIV-1-infected subjects. *J Infect Dis.* 1999;179:1365-74.
24. Westby M. In vitro and in vivo tropism and resistance evaluation; 2007. Disponible en: www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/07/slides/2007-4283s1-01-04-Pfizer_Westby.pdf
25. Low AJ, Dong W, Chan D, Sing T, Swanstrom R, Jensen M, et al. Current V3 genotyping algorithms are inadequate for predicting X4 co-receptor usage in clinical isolates. *AIDS.* 2007;21:F17-F24.
26. Whitcomb JM, Huang W, Fransen S, Limoli K, Toma J, Wrin T, et al. Development and characterization of a novel single-cycle recombinant-virus assay to determine human immunodeficiency virus type 1 coreceptor tropism. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51:566-75.
27. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature.* 2005;437:376-80.
28. Lewis M, James I, Braverman M, Desany B, Jarvie T, Penny M, et al. Evaluation of an ultra-deep sequencing method to identify minority sequence variants in the HIV-1 env gene from clinical samples. 14th CROI, Los Angeles, February 25-28; 2007.
29. Reeves J, Han D, Wilkin T, Kuritzkes D, Petropoulos C, et al. An enhanced version of the trofile HIV co-receptor tropism assay predicts emergence of CXCR4 use in ACTG5211 vicriviroc trial samples. 15th CROI, Boston, February 3-6; 2008.
30. Hunt P, Deeks S, Huang W, Coakley E, Han D, Petropoulos C, et al. Detection of viral co-receptor tropism changes with a high-sensitivity phenotypic assay among HIV-infected patients with drug-resistant viremia. 15th CROI, Boston, February 3-6; 2008.
31. Westby M, Lewis M, Whitcomb J, Youle M, Pozniak AL, James IT, et al. Emergence of CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) variants in a minority of HIV-1-infected patients following treatment with the CCR5 antagonist maraviroc is from a pretreatment CXCR4-using virus reservoir. *J Virol.* 2006;80:4909-20.
32. Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, et al. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:395-400.
33. Marozsan AJ, Kuhmann SE, Morgan T, Herrera C, Rivera-Troche E, Xu S, et al. Generation and properties of a human immunodeficiency virus type 1 isolate resistant to the small molecule CCR5 inhibitor, SCH-417690 (SCH-D). *Virology.* 2005; 338:182-99.
34. Lewis M, Mori J, Simpson P, Whitcomb J, Li X, Roberston D, et al. Changes in V3 loop sequence associated with failure of maraviroc treatment in patients enrolled in the MOTIVATE 1 and 2 trials. 15th CROI, Boston, February 3-6; 2008.
35. Mori J, Lewis M, Simpson P. Characterization of maraviroc resistance in patients failing treatment with CCR5-tropic virus in MOTIVATE 1 and MOTIVATE 2 (24 week analysis). 6th European HIV Drug Resistance Workshop. Budapest, March 26-28; 2008.
36. Maeda K, Nakata H, Koh Y, Miyakawa T, Ogata H, Takaoka Y, et al. Spirodiketopiperazine-based CCR5 inhibitor which preserves CC-chemokine/CCR5 interactions and exerts potent activity against R5 human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *J Virol.* 2004;78:8654-62.
37. Heera J, Saag M, Ive P, Whitcomb J, Lewis M, McFadyen L, et al. Virological correlates associated with treatment failure at week 48 in the phase 3 study of maraviroc in treatment-naive patients. 15th CROI, Boston, February 3-6; 2008.