Caleidoscopio

Rajnikant M. Amin,
Keith H. Wells*
Bernard J. Poiesz **

Terapia antiretrovirale

Laboratory Service, V.A. Medical Center and
Department of Pathology
*Division of Hematology/Oncology,
State University of New York Health Science Center at
Syracuse, NY, USA
**Biological Technical Services,
Merck Manufacturing Division,
West Point, PA, USA

Traduzione:
Isabella Besio

80

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

MEDICAL
SYSTEMS S.P.A.

Via Rio Torbido, 40 - Genova (Italy) Tel. 010 83.401
Stampato a Genova 1993

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI

INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Endocrinologia, di Patologia Clinica o di particolare interesse in altri campi della Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'*International Committee of Medical Journal Editors*. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile in base alla loro esperienza e competenza. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, purché redatte secondo le regole editoriali e conformi allo spirito della Rivista.
TESTO. In considerazione del carattere didattico, la monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi ed allo stesso tempo chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati, è opportuno evitare di riportare contrastanti o solo proprie personali opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte, in rapporto anche al numero di tabelle e figure. Si prega di dattilografare su una sola facciata del foglio. Tutte le pagine del testo devono essere scritte a spaziatura 2, con sufficienti margini e numerate consecutivamente.
TABELLE E LE FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica esplicativa (in bianco e nero eccetto in casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di comparsa nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento. Le figure devono essere realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, quando pubblicati, risultino ancora leggibili. Si consiglia la realizzazione di disegni e figure con una larghezza non superiore ai 9 cm. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le illustrazioni. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro ed in particolare dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro.
FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, l'eventuale Clinica o Istituto di lavoro, l'indirizzo compreso il numero di telefono e fax.
BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:
1) Bjorklund B., Bjorklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. J. Nucl. Med. Allied. Sci 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.
2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): The Endocrine Hypothalamus. London. Academic Press, 1978.
La Redazione è collegata on-line con le più importanti Banche Dati europee e statunitensi (per esempio: Medline, Cancerlit, AIDS etc) e fornisce ogni eventuale assistenza agli Autori.
ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.
PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre le fotografie e le diapositive in busta separata, una copia del testo archiviata su un dischetto da 3.5 pollici preferibilmente Macintosh, se MS-DOS il testo dovrà essere in formato RTF ed i grafici in formato PC.TIF o PC.Paintbrush.
E' inoltre necessario accompagnare il lavoro da copie di ogni permesso di riprodurre materiale pubblicato o di usare illustrazioni che possono far riconoscere soggetti umani.
Il dattiloscritto originale, le figure e le tabelle devono essere spedite al Direttore Responsabile in duplice copia. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.
L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cento copie della monografia.
L'Autore della monografia cede i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera alla Rivista *Caleidoscopio* con diritto di stampare, pubblicare, dare licenza a tradurre in altre lingue in Nazioni diverse rinunciando ai diritti d'Autore.
Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al Direttore Responsabile al seguente indirizzo:

Dott. Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Editoriale

Sinora, non esiste una terapia che possa eradicare nell'uomo l'infezione causata dal virus dell'immunodeficenza umana acquisita (HIV-1). Questo significa che il virus si inserisce nel DNA della cellula permanentemente.

Questo significa anche che la terapia antivirale può oggi indurre solamente uno stato di infezione silente e che, poiché l'infezione da parte dell'HIV 1 dura tutta la vita, il trattamento dell'AIDS deve durare anch'esso tutta la vita.

Nonostante questi problemi la ricerca nel campo della terapia antiretrovirale è molto attiva e la lentezza dei progressi è dovuta solamente alla lentezza con la quale progredisce la sindrome da immunodeficienza cosicché sono necessari molti anni per poter dimostrare che un farmaco può prolungare la vita o prevenire l'insorgenza di malattie gravi in pazienti infetti e asintomatici.

Questa monografia fornisce una panoramica delle nostre conoscenze sulla terapia antivirale per l'infezione da HIV 1 e la completezza e la lucidità del volume offre la possibilità di capire i principi della ricerca, i meccanismi di azione dei farmaci ed anticipare così gli sviluppi futuri.

Gli autori come al solito sono degli specialisti del settore.

Il dottor Keith Henry Wells, baccelliere in Arte (con lode) in Microbiologia, Ph.D. in Microbiologia e Immunologia, è membro della American Chemical Society e della American Association for Microbiology. Ha maturato una grossa esperienza sulla terapia antivirale, sulla diagnostica clinica e sulla microbiologia.

Esperto in virologia, colture cellulari, trattamento di materiali biologici pericolosi, in fluorescenza e radioimmunologia, ha recentemente approfondito gli studi sulla tecnologia della reazione polimerasica a catena e sulla biologia molecolare.

Dotato di una grossa capacità di affrontare, risolvere ed impiantare nuove tecnologie a differenti problemi ha lavorato all'inizio

all'Helena Laboratory, quindi nell'Università del Texas nel Dipartimento di Microbiologia, è passato alla Kallestad Laboratories e alla Syracuse Univerisity. Attualmente è Senior Project Microbiologist presso la Merk Company.

Il dottor Rajnikant M. Amin, dopo aver conseguito la M.B.B.S. presso la Barola Medical College, M.S. University, Bardoda, India ha maturato importati esperienze presso il Dipartimento di Laboratorio, Lich, Brooklyn, NY.

E' quindi passato al Magee Women's Hospital, University of Pittsburgh-PA, diventando Chief Fellow, nel Dipartimento di Anatomia Patologica. Ricopre prestigiose posizioni quali Direttore presso la Banca del Sangue, Syracuse, e Direttore della sezione Microbiologica e ancora come Professore Associato di Anatomia Patologica presso il Suny HSC - College of Medicina, Syracuse, NY.

Il Professor Poiesz M.D. all'Università della Pensilvania, è stato ricercatore presso l'Albert Einstein Medical Center, Philadelphia, quindi presso l'Istituto per la ricerca sul cancro Fox Chase, Pennsylvania per poi passare alla Suny Ustate Medical Center, Syracuse, NY e, come Professore Associato, Medical Branch, National Cancer Institute al NIH, Bethesda, MD.

Attualmente è Direttore della Divisione di Ematolgia/Oncologia presso il centro sanitario, Syracuse, NY ed è direttore del CNY centro di oncologia regionale e professore di medicina e microbiologia/immmunologia.

Gli interessi attuali nel settore della ricerca del Prof. Poiesz sono rappresentati dai fattori di crescita delle cellule staminali ematologiche in colture tissutali, lo screening di cellule normali e maligne in base alla presenza di informazioni di virus tumorali ad RNA.

Il Professor Poiesz è autore di 142 pubblicazioni in importanti riviste Mediche.

Sergio Rassu

Introduzione

La Sindrome da Immunodeficienza Acquisita (AIDS) è causata dal virus umano dell'immunodeficienza (HIV). E' una malattia letale multi sistemica, caratterizzata da una serie di infezioni opportunistiche e di neoplasie, che insorgono come risultato di un deficit del sistema immunitario. Il crescente deficit immunologico, le neoplasie maligne e le malattie del sistema nervoso centrale comportano in quasi tutti i casi la morte degli individui infetti dal HIV-1.

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) il numero di individui infetti da HIV-1 nel mondo si aggira intorno agli 8/10 milioni ed è previsto un aumento dall'8 al 10% nel corso del XXI secolo.

Una tale diffusione riguarderebbe in particolare i paesi in via di sviluppo, mentre negli Stati Uniti e nell'Europa Occidentale è previsto un calo del numero dei nuovi casi della malattia entro la metà degli anni '90.

L'HIV si trasmette durante il rapporto sessuale, con il sangue e i derivati, per trasmissione parenterale e dalla madre infetta al figlio.

L'HIV-1 è stato classificato come un lentivirus, un retrovirus associato ad infezione che dura per tutta la vita. Altri virus appartenenti a questo gruppo sono: il virus visna/maedi, che causa la polmonite e disordini neurologici nella pecora, il virus dell'artrite/encefalite delle capre, il virus dell'anemia infettiva equina, il virus dell'immunodeficienza dei bovini, delle scimmie e dei felini.

Successivamente, nel 1985, è stato scoperto un secondo virus umano dell'immunodeficienza (HIV-2), che causa una malattia progressiva soprattutto nell'Africa Occidentale.

Dalla scoperta dell'HIV-1, nel 1983, soltanto la Azidotimidina (3'-azido-2, 3'-dideossitimidina, AZT, Zidovudina) si è rivelata in grado di rallentare l'evoluzione della malattia, di diminuire l'insorgenza di infezioni opportunistiche, di prolungare la sopravvivenza e di migliorare la qualità della vita degli individui infetti da HIV.

Purtroppo una tale terapia provoca alcuni effetti collaterali come anemia e neutropenia e la comparsa di ceppi di HIV-1 resistenti al farmaco negli individui trattati con l'AZT.

Scopo di questa pubblicazione è la trattazione di vari agenti anti-HIV e del loro meccanismo di azione in relazione al ciclo vitale del'HIV.

Caratteristiche fisiche dell'HIV

L'HIV è un virus diploide ad RNA a singola elica circondato da un involucro, la cui struttura è simile a quella di altri lentivirus. (Figura 1).

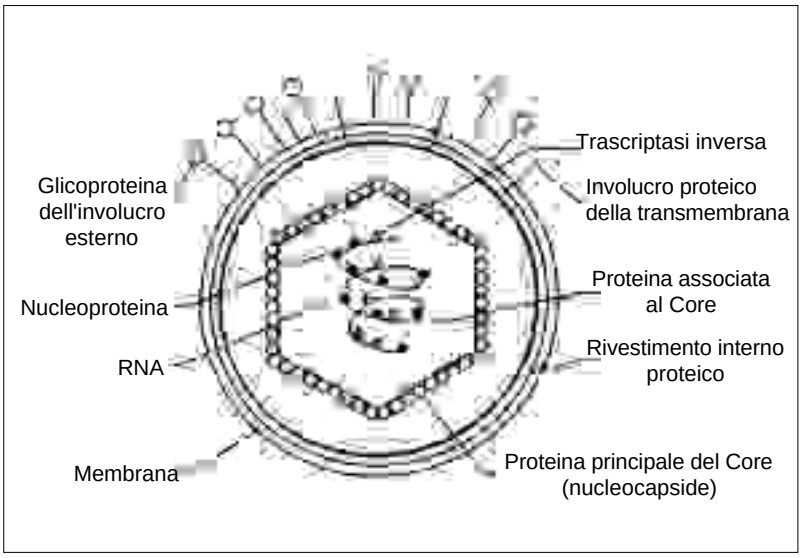


Figura 1. Struttura di un tipico retrovirus.

Il virione, una struttura sferica del diametro approssimativamente, maggiore a 100 nm, ha 72 proiezioni, che contengono glicoproteine, codificate dal virus, nell'envelope (gp 120) legate alla proteina della transmembrana (gp41), con interazioni non covalenti e proteine derivate dalla cellula ospite.

All'interno di questa è presente un envelope lipidico di forma icosadeltaedrica, composto da una proteina miristilata codificata dal gag p17. Il prodotto dal gag (p24) forma un core assottigliato, conico con un nucleoide in posizione eccentrica. Quest'ultimo contiene un RNA a elica 70S (+), proteine *gag* p9 e p7 e la transcriptasi inversa codificata dal gene pol.

Il genoma dell'HIV

Il genoma provirale dell'HIV (9.5 kilobasi in lunghezza), contiene le sequenze *gag*, *pol* ed *env*, che codificano rispettivamente le proteine strutturali, gli enzimi e le proteine dell'envelope. L'HIV possiede almeno nove geni noti (Figura 2) che possiedono alle estremità lunghe sequenze terminali ripetute (LTR, Long Terminal Repeats) contenenti tre regioni, U5, R e U3. La 5' LTR ha un ruolo importante nell'integrazione del provirus nel genoma della cellula ospite e nel processo di trascrizione attraverso elementi agenti sullo stesso lato. I diversi elementi regolatori del LTR comprendono una regione localizzata dai nucleotidi -137 al -17 alla quale i fattori di trascrizione cellulare come l'Sp1 e l'NF-kB si legano e attivano la trascrizione dell'HIV. Comprendono inoltre un elemento regolatore negativo (NRE) nelle basi -340 sino alla -185, ed una sequenza e responsiva trans-attiva (TAR) nella regione +19 fino alla +80. Altri elementi regolatori all'interno del LTR comprendono la sequenza TATA per la funzione promotrice del core e la sequenza del segnale di poliadenilazione. Le funzioni dettagliate dei vari geni e dei loro prodotti verranno descritte più avanti.

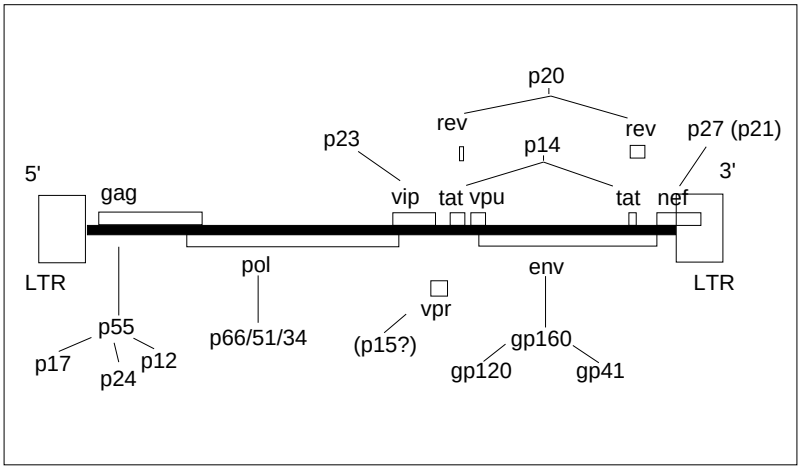


Figura 2. HIV-1 Genomi provirali del DNA e i loro prodotti proteici noti.

Cellule infettabili dall'HIV

Diverse cellule contenenti i recettori CD4 sono infettabili dal virus dell'HIV-1. Fra queste i linfociti T helper/inducer, i linfociti B (EBV +o -), le culture primarie di monociti/macrofagi, le cellule follicolari dendritiche, le cellule dendritiche del sangue periferico e le cellule di Langherans. Inoltre diverse cellule del sistema nervoso centrale come gli astrociti, gli oligodendrociti, e le cellule dell'endotelio capillare sono anch'esse infettabili. Altri tipi di cellule infettate dal virus, come le cellule di Küpffer, le cellule epiteliali dei sinusoidi epatici, le cellule epiteliali dell'intestino, le linee cellulari del carcinoma del colon e le cellule non umane come i linfociti T delle scimmie rhesus CD8 positive e CD4 negative, le cellule T del coniglio, e le linee cellulari macrofagiche del coniglio. Alcune cellule che non hanno una quantità determinabile di CD4 possono essere infettate dall'HIV-I. Queste cellule comprendono le cellule progenitrici del midollo osseo del midollo, le cellule gliali, le cellule neurali del feto e le linee cellulari fibromastoidi. E' possibile che la penetrazione del virus in queste cellule sia dovuto alla sua interazione con altri recettori piuttosto che con i CD4.

Ciclo vitale dell'HIV come guida ad un potenziale bersaglio per una terapia antiretrovirale

Il ciclo vitale dell'HIV è illustrato nella figura 3. L'HIV possiede molte proprietà in comune con altri retrovirus. Le particelle del virus o le cellule producenti il virus infettano le cellule quando vengono a contatto con le cellule sia attraverso un recettore con elevata affinità, il CD4 o, nei casi di cellule mancanti del CD4, con una reazione di fusione a bassa efficienza. Dopo la penetrazione del virus nelle cellule, avviene la perdita dell'envelope da parte del virus, seguito da

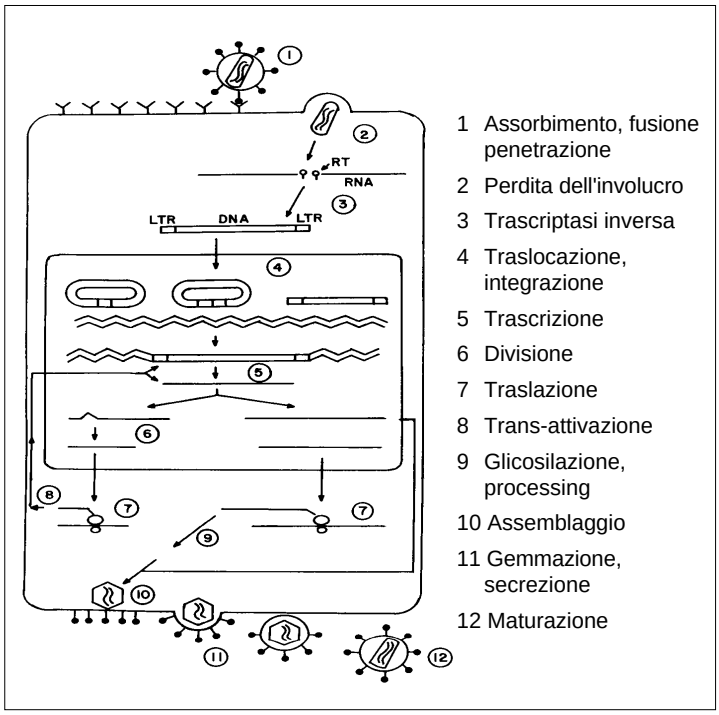


Figura 3. Ciclo vitale del virus dell'immunodeficienza umana.

una trascrizione dell'RNA virale in DNA attraverso un'azione concertata della DNA-polimerasi RNA-dipendente e della ribonucleasi, nel citoplasma della cellula. Questo DNA virale a doppia elica singolo appena prodotto, viene integrato nel DNA genomico ospite per azione dell'enzima integrasi a livello del nucleo delle cellule. Dopo l'integrazione del DNA, il DNA provirale rimane permanentemente come DNA nucleare ospite fino alla morte della cellula. Più tardi il DNA provirale, grazie all'aiuto del suo sito di iniziazione-trascrizione situato nell'LTR, sintetizza una copia completa di RNA sul DNA provirale. Questa azione è regolata dalle proteine cellulari ospiti, dai tipi di cellule e dall'attivazione cellulare.

Nel nucleo e nel nucleolo delle cellule infette da HIV si trova una proteina regolatrice chiamata transattivattrice virale (tat protein). Essa si lega ad una struttura in corrispondenza dell'estremità 5' dell'RNA nascente per accrescere la stabilità delle polimerasi, che

trascrivono i geni virali, e permette una trascrizione completa. Gli mRNA virali vengono trasportati nel citoplasma dal nucleo per la traduzione in proteine come la *tat*, la *nef* e la *rev*.

La proteina di regolazione dell'espressione delle proteine del virus, (*rev)*, si trova soprattutto nei nuclei e nel nucleolo delle cellule infette. Ciò è importante per la replicazione dell'HIV-1. L'RNA virale completo viene utilizzato come stampo per sintetizzare le proteine capsidiche e gli enzimi virali. Le proteine capsidiche vengono traslate come poliproteine lunghe che subiscono successivamente un clivaggio in proteine funzionali più piccole per azione delle proteasi virali. La traduzione viene effettuata utilizzando meccanismi cellulari. La traslazione viene attuata grazie a dei meccanismi cellulari. La glicosilazione e altre modificazioni post translazionali delle poliproteine vengono effettuate da enzimi cellulari. Le proteine del capside e dell'enzima virale si raggruppano sulla superficie interna della membrana cellulare e si inseriscono nella membrana cellulare per azione dell'acido grasso miristico localizzato all'estremità amino-terminale della proteina precursore del capside. Le particelle progenitrici del virus si legano attraverso le membrane cellulari acquisendo le proteine della membrana ospite e le glicoproteine codificate con il gene env. Un ulteriore maturazione del virione avviene attraverso la proteasi virale.

Oltre ai sopra citati geni regolatori, l'HIV contiene altri geni che contribuiscono alla maturazione di questo virus. Il gene *vif* contribuisce a facilitare la liberazione del virus e ad aumentarne l'infettività. Inoltre il gene *vpu* determina *in vitro* un incremento della maturazione e della fuoriuscita del virus dalla cellula. La proteina *vpr* accelera la replicazione del virus. Il ruolo del gene non è stato ancora chiarito completamente.

Individuazione ed isolamento dei retrovirus

Una valutazione ideale dei composti anti-HIV *in vitro* viene generalmente effettuata attraverso due approcci: misurazione dell'inibizione dell'effetto citopatico indotta per HIV e misurazione dell'inibizione della produzione proteica virale.

La valutazione della citopatogenicità nelle cellule mononucleari del sangue periferico stimolate in pHA e in diverse linee cellulari può essere operata utilizzando l'esclusione del colore vitale (per es. blu tripan), la captazione del colore vitale (per es. rosso neutro) o l'incorporazione di radionucleotidi marcati. ([^{3}H] - timidina). Inoltre esso può anche essere misurato grazie a dosaggi della placca. Inoltre è stata utilizzata per programmi di screening del farmaco anche la quantizzazione delle cellule giganti multinucleate (i sincizi) indotte dall'infezione. Un dosaggio basato sulla modificazione dei sali di tetrazolio attraverso enzimi mitocondriali presenti solo sulle cellule vive viene anche utilizzato per lo screening dell'attività anti-HIV.

Gli effetti sul legame possono essere valutati mediante o la misurazione dell'inibizione della combinazione di virioni radiomarcati o in fluorescenza con le cellule bersaglio.

Il nostro laboratorio ha descritto un eccellente dosaggio di legame. Un composto che inibisce la formazione di DNA provirale, ma non ha effetto sul legame o sulla trascriptasi inversa (RT) può essere studiato con il microscopio elettronico per individuare le particelle nucleocapsidiche del core o attraverso il banding dei lisati cellulari su gradienti di saccarosio continuo seguiti dal dosaggio dell'antigene p24 o RT come illustrato in fig. 4, o dell'RNA virale. Gli effetti sugli acidi nucleici in campioni freschi o in cultura possono essere misurati attraverso l'analisi southern (DNA), northern (RNA) e con l'ibridizzazione in situ dell'RNA e del DNA retrovirale. Queste tecniche richiedono un lavoro molto intenso, sono costose e poco sensibili; perciò il loro uso su larga scala è molto limitato. Per superare questo problema, la reazione polimerasica a catena (PCR) (Fig. 5) ha dimostrato di essere estremamente utile nell'individuazione di acidi nucleici retrovirali in test *in vivo* o in vitro (Fig. 6). La specificità per questo processo può essere ottenuta selezionando "primer" e sonde specifiche per i retrovirus in questione.

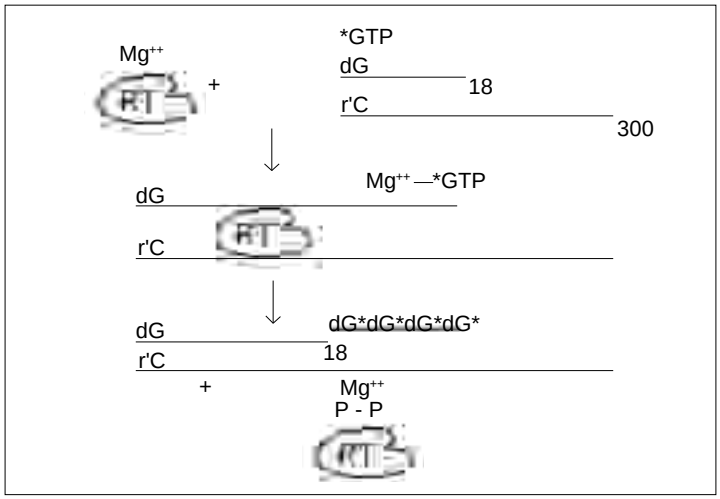


Figura 4. Schema del dosaggio della transcrittasi inversa facente uso dello stampo artificiale. Primer poli rC: oligo dG. Le 18 basi del DNA dG servono come primer per la sintesi del DNA delle 300 basi di poli rC RNA in presenza di Mg^{2+} e di guanosina trifosfato radiomarcata. Questo sistema è specifico per la transcrittasi inversa, in particolar modo la transcrittasi inversa retrovirale umana. Uso dello stampo artificiale: il sistema primer determina maggiori livelli di incorporazione del nucleotide marcato rispetto ai dosaggi che utilizzano lo stampo derivato del virione endogeno: primer.

Effetti sulla produzione di mRNA virale possono essere causati dall'RT-PCR. In questo metodo l'mRNA, dalle cellule trattate con i farmaci, viene trascritto nel DNA con l'uso della transcriptasi inversa e di un primer complementare ad un segmento della sequenza d'interesse. Il cDNA, in questo modo prodotto viene poi amplificato attraverso la PCR.

Vari sono gli immunodosaggi disponibili per il dosaggio della RT e di altre proteine retrovirali. Questi comprendono l'immunofluorescenza o la tecnica dell'immunoperossidasi con cellule fisse o non fisse sia con microscopio a fluorescenza sia con citofluorimetro. In ogni modo questi metodi non sono quantitativi, richiedono un lavoro intenso, risulta in qualche modo soggettivo e costoso valutare l'efficacia dei composti antivirali negli studi *in vitro* e *in vivo*. Attualmente sono disponibili sul mercato i dosaggi ELISA, per individuare l'antigene p24 dell'HIV-1 e il gp120. Questi dosaggi sono molto sensibili e

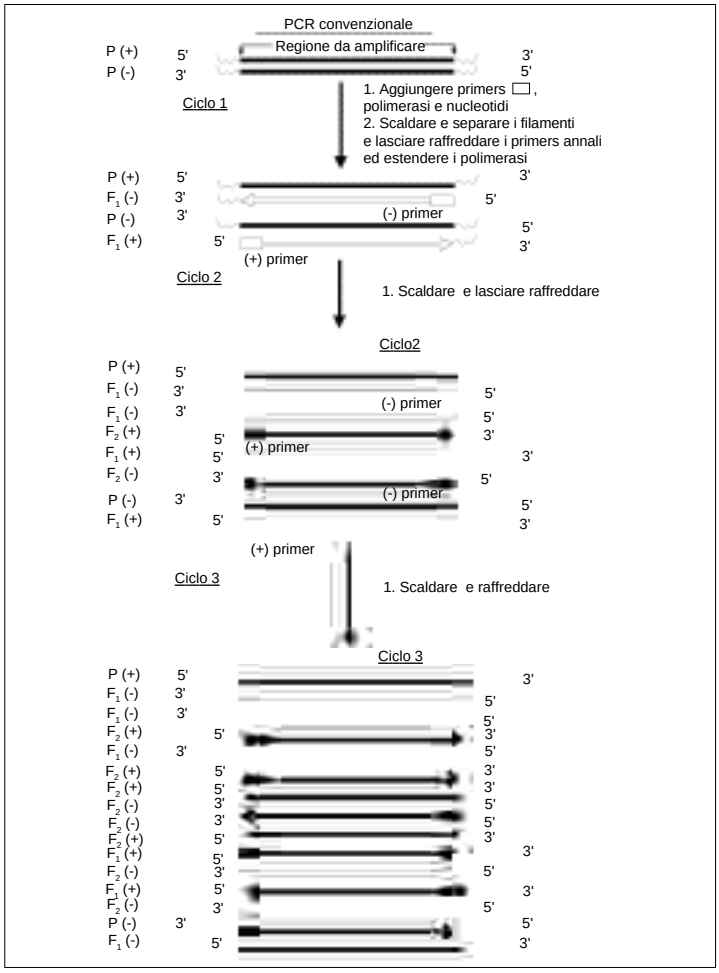


Figura 5. Schema della reazione polimerasica a catena attraverso tre cicli di amplificazione. Il DNA a doppia elica che si presume contenente il DNA retrovirale è denaturato per produrre due singole eliche di DNA. Coppie primer, piccoli oligonucleotidi complementari al 5° capo delle eliche opposte, quando la temperatura si abbassa. Più tardi la DNA polimerasi stabile al calore mescolata con tampone, cationi e nucleotidi, produce due copie del DNA a singola elica usando gli oligonucleotidi corti come primer e il DNA a singola elica DNA come stampo. Come la reazione continua, avviene un'amplificazione geometrica della sequenza rara bersaglio.

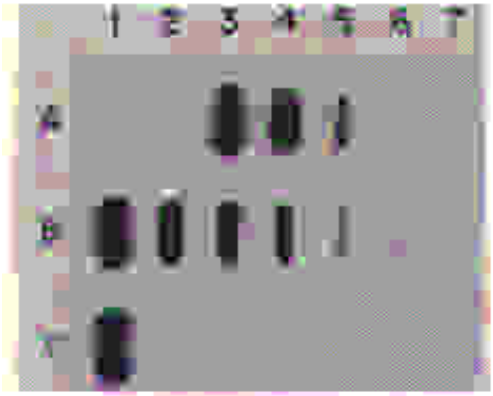


Figura 6. Titolazione dell'input dell'HIV-1 misurato sul contenuto del DNA provirale dell'HIV-1 nelle cellule bersaglio 6 ore dopo l'infezione. La PCR viene utilizzata per individuare il DNA provirale dell'HIV-1 6 ore dopo l'infezione. L'esame dei DNA dalle cellule bersaglio amplificate per le sequenze del gene gag dell'HIV-1 rivelano che il livello del contenuto del DNA provirale dell'HIV-1 decresce parallelamente alla diminuzione del livello dell'input del virus. Le zone A1 e A2 sono i controlli negativi, il primer, rispettivamente. I settori A3 sino ad A7 mostrano serie di controllo di DNA positivo di 10 ng/ml (+) DNA. I settori B1-B7, diluizioni seriate 1:2, di HIV-I trattato con DNAse utilizzato per infettare cellule bersaglio HIV 78. I settori C1 e C2 mostrano la necessità di trattare il preparato virale con DNAse I prima dell'uso nel dosaggio. Il settore C1 mostra che il virus non trattato contiene quantità significative di DNA dell'HIV-1 amplificabile che può essere digerito dal trattamento con DNAse I (C2). Il trattamento con DNAse I non ha alcun effetto sull'infettività dell'HIV-1. Il settore C3 dimostra un HUT 78 non infettato.

specifici per quantificare gli antigeni virali per test *in vivo* e *in vitro* di vari farmaci retrovirali o di anticorpi retrovirali neutralizzanti. Malgrado l'eccellente quantizzazione di antigeni virali, questi dosaggi si basano sul numero di cellule infette che esprimono gli antigeni virali che potrebbe essere basso e sul grado di antigenemia che può variare nel tempo in un dato individuo. Studi sulla produzione di proteine virali possono essere realizzati attraverso dosaggi di radioimmunoprecipitazione (RIPA) o western immunoblot.

Gli effetti sulla maturazione virale dei vari composti possono essere valutati con il microscopio elettronico. L'esame attraverso il microscopio elettronico dei virioni prodotti dalle cellule in presenza di inibitori della maturazione rivelerà una predominanza di particelle immature recanti i classici nucleocapsidi a forma di anello o a forma semilunare rispetto alle particelle mature.

Inibitori del ciclo di replicazione dell'HIV

Inibitori del virus libero

I virioni maturi dell'HIV sono abbastanza labili e la trasmissione di questo virus da individui infetti a non infetti richiede un contatto diretto di fluidi dell'organismo contaminati. I diversi metodi per sterilizzare o per disinfettare materiali a rischio biologico comprendono: la sterilizzazione in autoclave, l'incenerimento e soluzioni disinfettanti. Disinfettanti chimici come l'alcol etilico, l'alcol isopropilico, il perossido di idrogeno, la glutaraldeide, l'ipoclorito di sodio, il lisolo o fenolico, la paraformaldeide, il Nonidet P-40, il cloruro di ammonio quaternario, la miscela di alcool ed acetone, e il pH estremamente alto o basso sono in grado di distruggere l'HIV. Inoltre anche un metodo fisico, come il riscaldamento a 56°C per almeno 30 minuti è in grado di disattivare parzialmente o completamente l'HIV. Dati pubblicati recentemente dal nostro laboratorio hanno dimostrato che le modalità di disinfezione delle lenti più testati, se propriamente seguite, sono in grado di decontaminare in modo sicuro le lenti a contatto da una concentrazione di HIV maggiore alla 10 log. In questo modo verrebbe completamente eliminato il rischio che la lente diventi vettore dell'HIV. Inoltre i risultati di un nostro studio dove si è usato l'ozono a 1200 ppm per due ore hanno evidenziato che esso è in grado di inattivare l'HIV *in vitro* nel plasma senza modificare l'attività del Fattore VIII Gli effetti antivirali dell'ozono comprendono sia la distruzione delle particelle virali e/o l'inattivazione della trascriptasi inversa. Il trattamento con ozono dei liquidi biologici o dei derivati del sangue potrebbe essere un'interessante via da esplorare.

Inibitori della penetrazione del virus

La reazione di legame ad elevata affinità specifica tra la glicoproteina dell'envelope del virus e la glicoproteina della superficie della cellula, CD4 è di enorme importanza per l'inizio e la diffusione dell'infezione. Inoltre esiste anche una via alternativa per la penetrazione del virus nelle cellule CD4- attraverso una reazione di fusione a bassa efficienza. Una forma solubile di CD4 ricombinante (rCD4) ha inibito la

Stadio del ciclo vitale del virus	Farmaci noti o potenziali
1) Virus libero	Disinfettanti, AL- 721, amfotericina B metile-estere, ozono, calore
2) Assorbimento del virus	CD4 solubile o il suo modificato, Destrano solfato, anticorpo anti gp120, composti o anticorpo anti gp41, bloccanti del canale del calcio nelle cellule neuronali
3) Composti interferenti con la penetrazione e la liberazione nel citoplasma	Ipericina, pseudoipercina, analogo dell'amantidina.
4) gene pol: funzione della DNA-polimerasi RNA-dipendente (trascrittasi inversa)	Nucleosidi analoghi, composti TIBO, analoghi diidro diazepinone, rifabutina, suramina, HPA 23, fosfonoformato, tannini, flavanoidi, glicirrizina, fagaronina cloruro
5) gene pol : degradazione dell'RNA per attività dell'RNAse H.	Inibitori dell'RNAse H (AZT).
6) gene pol : funzione di integrasi	Inibitori non noti.
7) Transcrizione e translazione della processazione del DNA provirale dell'mRNA virale.	Oligonucleotidi antisenso, distruzione dell'mRNA specifico dell'HIV-1 con i ribozimi.
8) Geni regolatori del virus: *tat, rev, vif, vpu, vpr*	Oligonucleotidi antisenso, inibitore della funzione Tat e Rev, mole cole del TAR, decoys del TAR, inibitori della proteina Rev
9) Mutazione ribosomiale	Inibitori non noti
10) Clivaggio poliproteina Gag-pol	Composto XVII, composto U-75875, simmetrico aloperidolo, cerulenina, inibitori del C2
11) Miristoilazione	Analoghi di acido miristico come il 12-metossidodecanoate
12) Glicosilazione delle proteine virali	Castanospermina, 1-deossinoirimicina, N-butildeossinoirimicina, tunicamicina.
13) Gemmazione/maturazione dei virioni	Interferon alfa, mutanti difettivi in vif,

Tabella 1. Stadi del ciclo vitale dell'HIV e inibitori potenziali o noti.

replicazione dell'HIV-1 e la fusione cellulare indotta da HIV-1 e *in vitro*. Il rCD4 ha anche inibito il virus dell'immunodeficienza della scimmia dei macachi (SIV_{MAC}) nelle scimmie rhesus infette. Nonostante l'rCD4 abbia inibito alcuni ceppi dell'HIV-1 *in vitro*, è stato molto meno efficace nell'inibizione dei virus monocitotropici dell'HIV-1 e dell'HIV-2 rispetto a quello del prototipo $HTLV\text{-}III_B$. Test clinici con rCD4 hanno riportato o una diminuzione o nessun cambiamento nella p24. Si può prevedere che non si verifichi alcun effetto dell'antigene p24, nel siero sia per la breve emivita dell'rCD4, sia per la minore affinità degli isolati dell'HIV-1 naturale con i recettori CD4 paragonati a quello dei ceppi dell'HIV-1 di laboratorio. Inoltre l'interazione CD4-gp120 può anche essere bloccata più efficacemente dal CD4 fuso alla catena pesante appartenente all'immunoglobulina più che dal solo CD4 solubile come descritto negli studi in *vitro*.

Inoltre cellule transdotte di vettori retrovirali producenti CD4 solubile sono anche in grado di proteggere cellule sensibili all'HIV dall'infezione da HIV e una tale terapia genetica costituisce un potenziale approccio per il trattamento dell'AIDS. Un recente studio *in vitro* ha dimostrato che l'attività anti-HIV dei globuli rossi portatori di CD4, costruiti dopo che la proteina CD4 si è cross-legata ai globuli rossi con un agente bifunzionale, si è rivelata essere almeno 20 volte maggiore di quella del CD4 libero. In ogni caso sono necessari altri studi per valutare tali effetti benefici. Un approccio di questo tipo può accrescere l'emivita e la valenza della terapia basata sul CD4 per un più lungo tempo vitale del globulo rosso

Numerosi composti polianionici come il destrano solfato, il pentosano polisolfato, l'eparina, l'acido aurintricarbossilico (ATA), la suramina e il blu di evans, si sono rivelati in grado di prevenire l'assorbimento di particelle di HIV nelle cellule CD4+, attraverso l'inibizione del legame dell'anticorpo monoclonale anti-gp 120 con le cellule HUT-78 cronicamente infette da HIV, in maniera dose-dipendente e irreversibile. Inoltre tutti questi composti, esclusa l'eparina, inibiscono la formazione dei sincizi. L'ATA interferisce anche con il recettore CD4. Per l'attività anti-HIV dei solfato polisaccaridi come il destrano solfato o il pentosano polisolfato, la presenza di gruppi solfati è essenziale, mentre la componente dei carboidrati non lo è. L'ultimo gruppo di composti può essere esemplificato dall'alcool polivinilico solfato (PVAS) o dall'alcool polivinilico solfato di acido acrilico (PAVAS). Oltre all'attività anti-HIV1, i polisaccaridi solfati e i

PVAS sono anche in grado di inibire le replicazioni dell'HIV2. Questi composti proteggono inoltre le cellule CD4+ dall'azione distruttiva delle cellule portratrici di gp120. Recentemente è stato provato che il solfato schizofillano (SPG) I, una forma di solfato omopolisaccaride, ha una potente attività anti-HIV. Il destrano di solfato, un polisaccaride solfato prototipo è stato somministrato per via orale nella I e II fase di test clinici evidenziando un leggero miglioramento clinico e una minor tossicità.

Comunque, in un altro studio, questo composto ha mostrato un basso assorbimento del tratto gastrointestinale e una degradazione significativa del tratto gastrointestinale dei ratti. Per ovviare a questo problema, è stato condotto uno studio recente con la somministrazione endovenosa di destranosolfato che ha evidenziato come non ha alcun effetto anti-HIV.

Diversi composti di lipidi composti di gliceridi neutri di fosfati dilcolina, un'etanolamina fosfatidilica (AL721) possono inibire l'infezione da HIV dei PBLs. E' stato proposto che agiscono estraendo il colesterolo dalle membrane cellulari. Similmente anche il fosfonoformato palmitil disodico inibisce anche l'HIV-1. Comunque occorre una maggiore ricerca preclinica prima che essi possano essere utilizzati

Penetrazione e liberazione

La fase successiva del ciclo vitale del virus è costituita dalla penetrazione della membrana della cellula ospite. Questo processo coinvolge una fusione diretta delle membrane cellulari e virali, dell'endocitosi mediata dal recettore o forse di entrambe. La fusione della membrana sembra essere mediata dalle proteine transmembrana gp41. Porzioni della parte amino-terminale della molecola gp41 mostrano somiglianze di sequenza con le proteine di fusione del paramixovirus. Mutazioni in entrambe le estremità amino-terminali della gp120 o della gp41 possono alterare il legame gp120 - gp41. Ciò può essere utilizzato come potenziale obiettivo per un intervento chemioterapeutico.

La penetrazione del virus nella cellula è seguita dalla liberazione del nucleocapside e dal rilascio del complesso genomico RNA/RT nel citoplasma della cellula. Composti analoghi all'amantidine nel sistema influenzale o agenti che inibiscono la liberazione dei virus picorna possono essere testati per inibire la liberazione dell'HIV soprattutto per le somiglianze strutturali tra la proteina capsidica p24

dell'HIV-1 e il capside dei virus picorna. Dioni policiclici aromatici come l'ipercina e la pseudoipercina possono prevenire la liberazione perché producono una stabilità della struttura capsidica del virus insolitamente alta.

La morte cellulare neuronale causata dalla proteina dell'envelope gp120 dell'HIV-1 è dovuta ad un aumento nel calcio libero intracellulare più che all'infezione da parte dell'HIV1. Sebbene questa reazione possa essere fermata da un antagonista dei canali del calcio come la nimopidina e si può perciò prevenire un danno neuronale, si rendono necessarie ulteriori ricerche prima che si possano affermare i benefici di un tale farmaco contro i danni al sistema nervoso centrale provocati dall'HIV-1.

Trascrizione inversa

Dopo la liberazione, la sintesi di una copia del DNA provirale del genoma dell'RNA virale è mediata dall'RT, un enzima eterodimero contenente subunità di 66 e 51 kDa codificate dal gene pol. Si tratta di un enzima polifunzionale richiesto per la sintesi di una copia del DNA del genoma dell'RNA provirale dopo l'entrata del virus nel citoplasma delle cellule. L'RT ha due attività' enzimatiche: 1) l'attività polimerasica del DNA e 2) un'attività ribonucleasica, RNAse H, specifica per RNA in DNA: RNA forma ibrida. L'RT dell'HIV ha una bassa fedeltà sia nel copiare l'RNA che nei "templates" di DNA. Questa bassa fedeltà dell'enzima si riflette quasi sicuramente nell'alto tasso di mutazione del virus *in vivo*. Queste mutazioni rimarranno la grossa sfida maggiore alla terapia anti-HIV.

Gli Analoghi dei Nucleosidi

Gli analoghi dei nucleosidi (figure 7 e 8), mostranti attività anti-HIV nei linfociti e nei monociti, si dividono in tre maggiori tipi strutturali.

Questi analoghi strutturali delle purine e pirimidine comprendono: (1) i nucleosidi 3'- sostituti come l'AZT, la 3'-azido-2',3 dideossiuridina (AZU), 3'-azido-2',3' dideossiguanosina (AZG), e 3'-fluoro-3'-deositimidina (3'-FddT); (2) nucleosidi dideossi saturati come la 2',3'-dideossiadenosina (ddA), la 2','3-dideossiinosina (ddI), la 2',3'-dideossicitidina (ddC); e (3) i 2',3'- nucleosidi non saturi come la 1-(2,3-dideossi-β-D-glicero-pent-2-enofuranosile) timidina (d4T) o la 1- (2,3- dideossi-β-glicero-pent-2-enofuranosile) citosina (d4C). Il

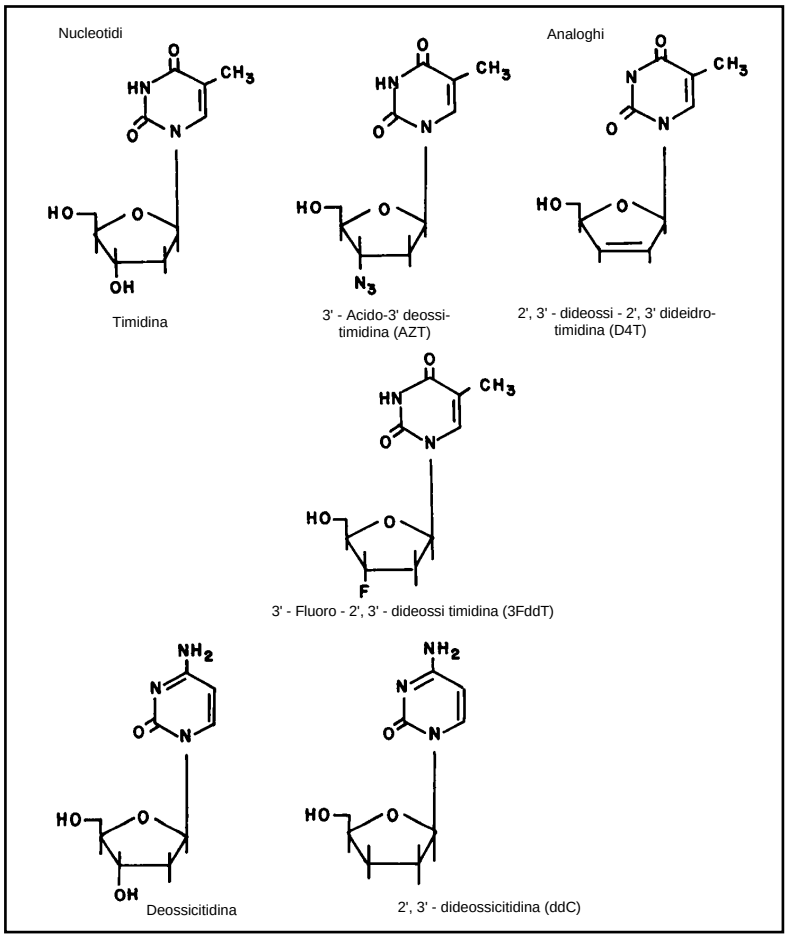


Figura 7. Nucleosidi Pirimidinici e loro analoghi.

meccanismo di azione di tutti questi composti si considera simile a quello dell'AZT (figura 9).Questi composti sono dapprima metabolizzati nel loro mono-, di-, e quindi le loro forme attive vengono trifosforilate attraverso specifici enzimi cellulari. Il nucleoside trifosfato può quindi fungere sia da inibitore competitivo della RT sia come terminatore dell'allungamento della catena del DNA attraverso la sua incorporazione nel DNA o entrambi.

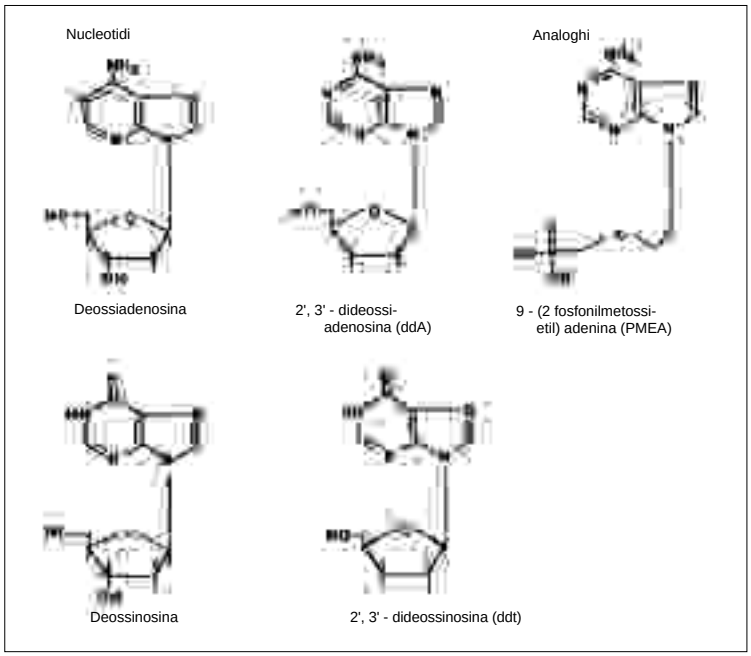


Figura 8. Nucleosidi purinici e loro analoghi. Questi composti inibiscono l'HIV RT attraverso lo stesso meccanismo degli analoghi della pirimidina.

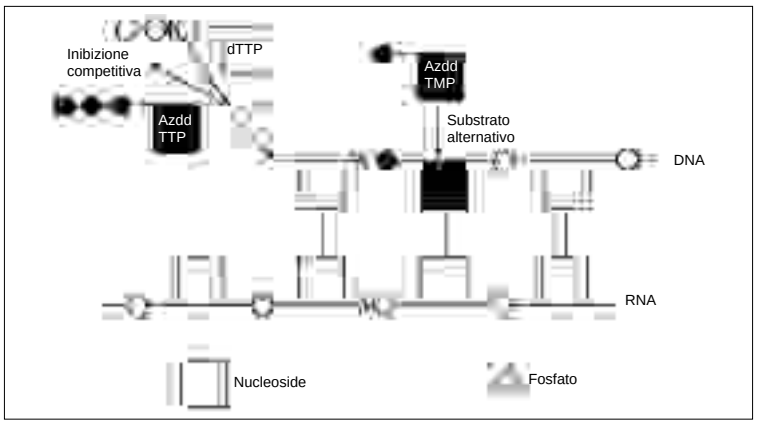


Figura 9. Rappresentazione schematica del meccanismo di azione anti-HIV dell'Azidotimidina (AZT). Dopo la fosforilazione intracellulare dell'AZT, attraverso specifici enzimi cellulari, la sua forma 5' trifosfata (AzddTTP) può inibire in maniera competitiva il substrato naturale (dTTP) o può incorporarsi come AzddTMP nel DNA portando alla terminazione della catena.

L'AZT ha dimostrato chiari benefici clinici nei pazienti affetti da AIDS o da gravi malattie legate a questa infezione. In questi individui, l'AZT ha portato ad una significativa diminuzione della mortalità, della frequenza, e della gravità delle infezioni opportunistiche. Inoltre, diversi test clinici con l'AZT in gruppi simili di pazienti hanno dimostrato un miglioramento immunologico e clinico. La terapia con l'AZT è inoltre in grado di migliorare o ritardare i sintomi neurologici sia in adulti che in bambini affetti dalla sindrome dell'AIDS.

Nonostante i sopracitati benefici clinici, l'AZT ha gravi effetti collaterali, compresa la soppressione dell'attività del midollo osseo, la macrocitosi, l'anemia, la neutropenia, conseguenti alla sua somministrazione a lungo termine. Altri effetti collaterali associati alla somministrazione di AZT sono: nausea, vomito, cefalea, mialgie, stati confusionali e aumento dell'aminotransferasi del siero. Per evitare gli effetti tossici dell'AZT senza compromettere l'attività retrovirale, i test clinici utilizzano basse dosi di AZT.

Un recente test clinico con eritropoietina umana ricombinante in pazienti con AIDS trattati con l'AZT ha mostrato un miglioramento dell'anemia in quei pazienti che avevano ricevuto l'eritropoietina rispetto ad un gruppo di controllo. Inoltre recenti dati suggeriscono che c'è stato un aumento nell'alto grado del linfoma non Hodgkin's delle cellule B ad elevata malignità nei pazienti affetti da AIDS grave o da ARC quando sopravvivono fino a tre anni per la terapia con AZT.

Gli analoghi dei nucleosidi	**Effetti collaterali conosciuti**
AZT	Nausea, vomito, cefalea, mialgia, miosite, stato confusionale, crisi epilettiche, macrocitosi, anemia, neutropenia, trombocitopenia, encefalopatia di Wernick, sindrome di Steven- Johnson, pigmentazione bluastra delle unghie, reazioni lichenoidi del cavo orale, funzionalità del fegato anormale, emergenza di isolati resistenti all'AZT.
ddC	Eruzioni cutanee maculo-vescicolari, ulcere aftose della bocca, febbre, malessere, neuropatia periferica, edema, trombocitopenia, leucopenia, perdita dell'udito dovuta a danneggiamento del nervo VIII, ipotensione posturale.
ddI	Nevralgia, insonnia, diarrea, bocca secca, eruzione cutanea, alterata funzionalità epatica, valori elevati di amilasi e trigliceridi nel siero, aumento dell'acido urico, atrofia retinica periferica asintomatica, crisi epilettiche, diabete insipido, diabete mellito, sindrome di Raynaud, neuropatia periferica, pancreatite acuta
d4T	Neuropatia periferica, anemia, alterata funzionalità epatica.

Tavola II. Vari analoghi dei nucleosidi analoghi e i loro effetti collaterali noti.

Si ritiene che i linfomi osservati in un tale situazione siano in relazione con il prolungamento della sopravvivenza in presenza di un sistema immune gravemente compromesso. Comunque occorrono ancora ulteriori ricerche in questo campo per approfondire la patogenesi. Negli individui a cui è stato somministrato l'AZT per un periodo superiore a 6 mesi si è osservato l'emergere di ceppi di HIV resistenti all'AZT. Lo sviluppo di una tale resistenza è legato alle sostituzioni amino-acide in una regione codificante per la transcrittasi inversa in isolati resistenti. Sinora non è emersa resistenza crociata di ceppi dell'HIV resistenti all'AZT verso altri nucleosidi analoghi come il ddC, il ddI, la d4T e l'analogo fosfonoformato.

Dopo la terapia con AZT , il 2', 3' - dideossicitidina (ddC), che è stato il secondo analogo di nucleoside a essere testato clinicamente, ha prodotto un miglioramento immunologico e virologico in alcuni pazienti affetti da AIDS e la sua tossicità non si sovrappone all'AZT. In indagini cliniche a breve termine facenti uso del DDC da solo, o in alternanza con l'AZT, bambini affetti da AIDS o da ARC hanno riportato un miglioramento immunologico e virologico. Sebbene la capacità del ddC attraverso la barriera ematoencefalica sembri essere bassa, nelle scimmie i livelli di farmaco che inibiscono la replicazione *in vitro* dell'HIV possono essere raggiunti nel fluido cerebrospinale dopo somministrazione endovenosa Gli effetti tossici transitori autolimitanti del ddC comprendono eruzioni cutanee, ulcere aftose della bocca, febbre e malessere. Inoltre un effetto tossico collaterale del ddC legato alla dose comprende la neuropatia periferica sensitivo-motoria.

Il 2',3' - dideossiininosina (ddI), un analogo del nucleoside purinico, è un potente inibitore dell'HIV-1. A causa della più lunga emivita intracellulare (12-24 ore) della sua forma trifosforilata rispetto all'AZT e al ddC, richiede dosaggi meno frequenti. Le prima e seconda fase dei test clinici con DDI, sia negli adulti che nei bambini, hanno mostrato miglioramenti clinici, immunologici della carica del virus. Benché abbia mostrato effetti virostatici in pazienti affetti da AIDS refrattari all'AZT, non c'è stato alcun miglioramento nella conta delle cellule CD4 nei pazienti sottoposti a trattamento prolungato con l'AZT. Il ddI è stato associato a gravi tossicità come una dolorosa neuropatia periferica e la pancreatite acuta.

Il D4T, nella fase I del test, ha mostrato alcune evidenze preliminari come un miglioramento delle cellule CD4+ e dei sintomi costituzionali così come una diminuzione del livello sierico della p24. Causa neuropatia periferica.

Malgrado il più ampio indice di selettività dell'AZddU per l'attività anti-HIV, rispetto all'AZT, alcuni ceppi HIV, resistenti all'AZT, hanno una resistenza crociata a questo farmaco *in vitro*. Questo dato potrebbe limitare il suo uso clinico.

Oltre agli analoghi dei nucleosidi precedentemente trattati, anche gli analoghi dei nucleosidi aciclici e carbociclici sono in grado di inibire la replicazione dell'HIV. Tra questi composti vi sono la 9-(2-fosfonilmetossietile) adenina (PMEA), la 9-(2-fosfonilmetossietile)-2,6-diaminopurina (PMEDAP), la adenalene, l'isoddado, carbovir, ciclobuta G e la cicliobuta A. Gli ultimi due composti appartengono ad analoghi dicarbociclici della ossetanocina. Sia gli analoghi dei nucleosidi aciclici che carbociclici richiedono una fosforilazione intracellulare per trasformarsi nella loro forma di trifosfato attiva sulla trascrittasi inversa .

Oltre all'attività anti-HIV -1 e anti-HIV-2, il ciclobut-A agisce contro il citomegalovirus umano (CMV) e il ciclobut G agisce contro l'Herpes simplex virus (HSV) 1 e 2, CMV, il virus della varicella-zoster e il virus Epstein-Barr (EBV). In questo modo tali composti possono essere di interesse clinico per il loro vasto range di attività antivirale dal momento che questi virus si sono rivelati come cofattori dell'HIV nell'AIDS. Il Cicliobut A e G hanno una tossicità per il midollo osseo che ne limita l'uso.

Il carbovir (fig. 10) è un inibitore altamente selettivo della trascrittasi inversa con modesto effetto sugli enzimi cellulari. Questo effetto inibitorio è più selettivo di quello mostrato dai trifosfati degli AZT, ddT e ddG.

Sebbene il PMEA e il PMEDAP siano meno potenti e meno selettivi dell'AZT nell'inibire la replicazione dell'HIV i*n vitro*, sono più efficaci dell'AZT *in vivo*. Sia il PMEA che il PMEDAP hanno anche un vasto range di attività antivirale contro cofattori come l'HSV, il CMV, e l'EBV. Quindi questi farmaci possono essere utilizzati sia per il trattamento dell'AIDS che per le infezioni opportunistiche. Inoltre il PMEA è un potente inibitore del virus dell'immunodeficienza della scimmia, del virus del sarcoma murino e del virus dell'immunodeficienza felina. Questi composti hanno un'attività antivirale molto prolungata che perdura per diversi giorni dopo la somministrazione di una singola dose. Il PMEA è anche un potente inibitore della RT e agisce anche come "terminator" della catena del DNA come altri analoghi nucleosidi. Il PMEA ha una emi-vita intracellulare relativamente lunga (16-18 ore). Sono necessari ulteriori studi pre-clinici prima che questi composti possano affrontare test clinici.

Inoltre due classi di composti appartenenti a derivati 6- sostituti di acicluridina come il 1-(2-idrossietossimetile)-6-feniltiotimine (HEPT) e alla benzodiazepina (R-78305) con composti derivati modificato tetraidroimidazo benzodiazepinone 1(TIBO), (ad es. R-82150) come illustrato nel figura 11, sono potenti, selettivi e inibitori specifici unicamente dell'HIV-1 e non del HIV-2 o di altri retrovirus o di virus RNA o DNA. Sebbene questi composti inibiscano la RT, la loro specificità anti-HIV-1 li rende abbastanza diversi dagli analoghi dei nucleosidi. Recentemente, il composto R-82150 ha dimostrato di inibire la trascrizione inversa quando poli (rA). L'Oligo(dT) 12-18, poli(rl) oligo(dC) 12-18 e il poli(rC) oligo(dG) 12-18 sono stati usati come stampi e primers.

Il preciso meccanismo d'azione da parte dell'HEPTsull'RT non è ancora ben conosciuto. Inoltre un derivato del TIBO come i composti R82913 hanno dimostrato simili effetti anti-HIVl.

Il BI-RG-587, dipiridodiazepinone (figura 12), è un potente inibitore dell'RT HIV-1 e non dell'HIV-2 . Agisce come un inibitore allosterico legandosi ad un sito separato dallo stampo, dal primer e dai siti leganti del nucleoside trisfofato . Recentemente, l'1 - benzilossimetil-5-etil-6-feniltiouracile, simile all'HEPT, ha dimostrato di essere il più potente agente anti-HIV specifico, a concentrazione nM nei linfociti del sangue periferico. Questo composto, come l'HEPT, inibisce anche la replicazione dei mutanti dell'HIV-1 resistenti all'AZT.

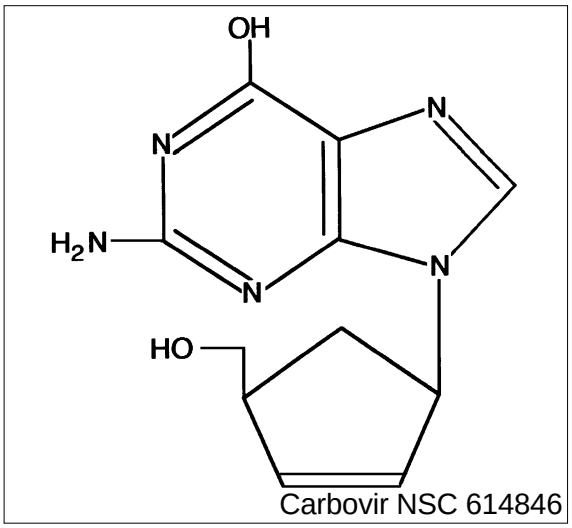


Figura 10. Struttura del (+)-g-[4-L-(idrossimetile)-ciclopentano-2-ene-1α-yl] guanina; carbovir, NSC 614846.

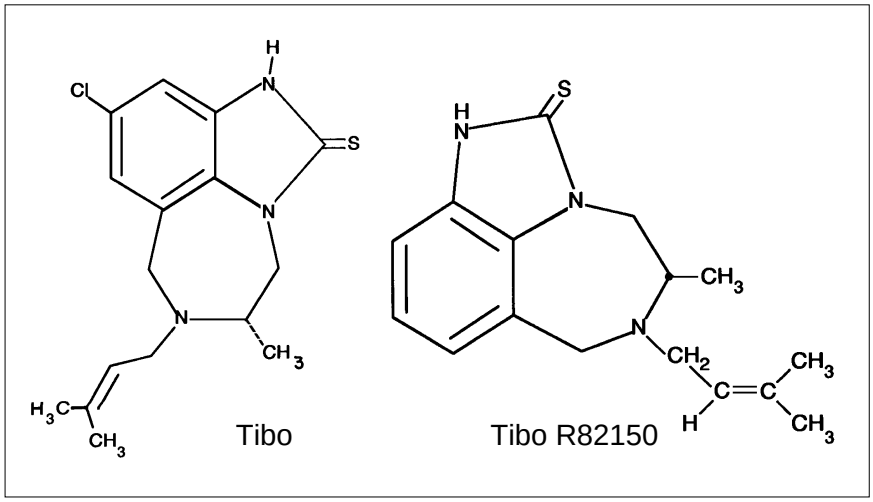


Figura 11. Strutture del -(+)-(s)-4,5,6,7- tetraido-9-cloro-5-metil-6-(3-metil-2butenile)imidazo[4,5,1-jk][1,4] benzodiazepina-2(1H)-tione (TIBO); e -(+)-(s)-4,5,6,7-tetraido-5-metile-6-(3-metile-2-butenile)imidazo[4,5,1-jk][1,4]- benzodiazepine-2(1H)-tione (TIBO R82150).

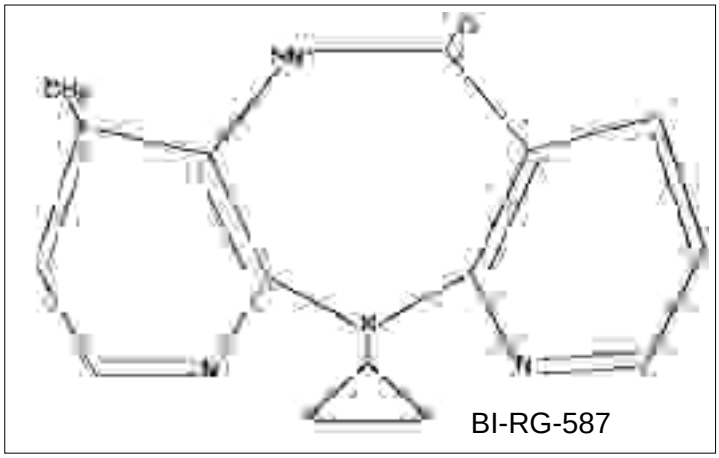


Figura 12. Struttura del 6,11 diidro-11-ciclopropil-4-metildipirido (2,3-6:2',3' -e)-(1,4) diazepina-6-uno (BI-RG-587), un derivato del dipiridodiazepinone.

Integrazione del DNA provirale dell'HIV

Dopo che il DNA a doppia-elica del provirus HIV contenente un LTR ad ogni estremo è stato sintetizzato per azione della Transcriptasi Inversa, la molecola lineare del DNA viene trasportata nel nucleo da un meccanismo ancora non ben definito. Può rimanere anche nel citoplasma in forma lineare non integrata. Studi recenti condotti *in vitro* suggeriscono che il DNA dell'HIV non integrato può accumularsi in cellule CEM notevolmente infettate dall'HIV-1 e portarle così alla morte. E' necessaria la comprensione del meccanismo preciso di necrosi cellulare per poter bloccare tale citopatogenicità dell'HIV.

Con il trasporto della molecola lineare del DNA all'interno del nucleo, si ha la formazione di molecole di DNA a spirale contenenti uno o due LTR. Il DNA provirale viene quindi integrato nel genoma dell'ospite per azione delle integrasi virali. Durante questo processo, l'integrasi taglia le estremità del DNA provirale, taglia il DNA ospite e unisce con legame covalentemente le estremità del DNA virale e di quello dell'ospite. Sinora non è chiaro quale sia realmente il precursore della forma integrata: se la forma lineare o la forma circolare del DNA a doppia-elica. Per il momento non esistono inibitori noti del processo di integrazione.

Una volta integrato come DNA provirale, può rimanere latente a lungo. Sia i fattori cellulari che gli elementi regolari codificati dal genoma virale giocano un ruolo nell'attivazione e regolazione dell'HIV.

Regolazione genetica dell'HIV

L'HIV-1, un retrovirus complesso, codifica vari prodotti genetici derivati dai geni *gag, env, pol, tat, rev,* e *nef*, per regolare la loro espressione e quella di altri geni virali in trans; cosi come la maturazione e la diffusione di virus infettivi.

Il gene tat, un gene regolatore, codifica una proteina da 14 kilodalton con domini funzionali multipli. Questa proteina, un regolatore positivo, transattiva l'espressione genetica diretta dell'LTR dell'HIV-1 e determina livelli elevati di RNA specifico dell'HIV-1 e della sintesi proteica. Nella estremità COOH-terminale della proteina, si trova un'area conservata ricca di lisina ed arginina necessaria per la localizzazione nucleare e nucleolare del Tat.

Mutazioni all'interno di questa sequenza hanno mostrato una

ridotta localizzazione nucleare delle proteine mutate ed hanno ridotto, le proprietà di trans-attivazione del Tat a livelli variabili. Quest'ultima proprietà è stata dimostrata come iperproduzione della proteina mutante che ha portato livelli di transattivazione simili a quelli rilevati con livelli normali di proteina di tipo selvaggio.

Quest'estremità serve anche come dominio dei legami delle sequenze dell'RNA specifico. L'estremità N-terminale della proteina, ricca in cistina e conservata immodificata è responsabile del legame degli ioni metallici e della proteina di mediazione: interazione proteica per la replicazione virale.

Sono stati proposti diversi meccanismi possibili e controversi attraverso i quali il Tat intensifica la velocità di trascrizione. Questi meccanismi comprendono: 1) aumentata velocità di inizio di trascrizione 2) processività aumentata piuttosto che termine prematuro delle trascrizioni iniziate all'interno dell'LTR dell'HIV-1 come può essere rilevato sotto forma di allungamento del Tat attraverso gli stampi del DNA; 3) complessi di trascrizione che ne modificano l'inizio verso una forma di terminazione resistente attraverso interazioni con il nascente stem-loop RNA del TAR. Non si sa se il Tat modula l'esportazione dal nucleo delle specie di RNA che contengono il TAR; tuttavia, è stato ipotizzato che il Tat sia in grado di interessare la suddivisione citoplasmatica in comparti e quindi, l'utilizzo della traduzione sulle trascrizioni contenenti TAR.

La sequenza di nucleotidi del genoma virale, designata come regione di *trans*-attivazione della risposta (TAR) localizzata nella regione 5'R delle trascrizioni dell'HIV-1, è essenziale per la trans-attivazione mediata dal Tat. Si tratta di una struttura a spirale formata da 59 nucleotidi dell'RNA. Le analisi mutazionali hanno mostrato che i segmenti a doppia-elica dell'RNA presenti nel TAR critiche verso le informazioni della sequenza primaria sono situati nella spirale terminale dei nucleotidi e nella protuberanza dei tre nucleotidi del TAR. Il Tat possiede la capacità di legare in maniera specifica queste regioni. Tuttavia, studi recenti hanno suggerito che l'interazione tra il Tat ed il TAR si verifica esclusivamente nella regione della protuberanza dei tre nucleotidi. Inoltre, la *trans*-attivazione del Tat del LTR dell'HIV-1 richiede legame cooperativo sia del Tat che di una proteina nucleare di circa 68kD a strutture a spirale differenti ma adiacenti del TAR RNA. Proteine cellulari possono anche ritrovarsi nella mediazione della *trans*-attivazione mediata dal Tat.

La seconda proteina regolatoria , Rev, è un prodotto di traduzione di 19 kD di un messaggio multiplo diviso da un gene *rev* che ha due

exoni di codificazione. Questa proteina è fosforilata in due residui di serina ed è localizzata nel nucleo, in modo predominante, a livello nucleolare. I domini funzionali della proteina Rev sono stati definiti chiaramente. Il primo dominio, approssimativamente 40 aminoacidi nella sequenza terminale NH_2 ricco di arginina, è essenziale per la localizzazione nucleolare e media l'interazione delle sequenze specifiche del Rev con elementi responsivi del Rev (RRE). Inoltre gli aminoacidi che fiancheggiano la regione ricca di arginina sono necessari per la multimerizzazione del Rev sulla sequenza bersaglio dell'RRE.

Il secondo dominio funzionale, localizzato vicino alla regione COOH-terminale, rappresenta un dominio di "attivazione" del *Rev*. Si ritiene che la proteina Rev funzioni da attivatore dell'esportazione dal nucleo di vari tipi di RNA virale sequestrato. Ciò avviene sia antagonizzando la loro interazione con i fattori di sdoppiamento o facilitando direttamente la loro interazione con un componente della via di trasporto dell'RNA cellulare. L'aumentata esportazione dal nucleo degli mRNA non divisi, specifici per trascrizioni non divise dell'HIV-1, è mediata da una sequenza di 234 nt dell'RNA bersaglio, RRE, localizzata all'interno del gene env. L'RRE è presente nell'mRNA singolarmente diviso o nell'mRNA più grande non diviso. E' stato dimostrato che la proteina Rev si lega all'RRE *in vivo* con alta affinità. Un sottodominio 66 nt a spirale dell'RRE è sufficiente per un legame ad alta affinità del Rev e si è rivelato sufficiente per un'attività biologica parziale *in vivo*; mentre il rimanente sito legante del RRE aiuta a stabilizzare la struttura dell'RNA del sito legante del Rev ed è necessario per una completa attività biologica *in vivo*.

Nef è il terzo prodotto genico dell'HIV-1. Si tratta di una fosfoproteina miristilata associata con una struttura della membrana citoplasmatica. Il ruolo del nef non è chiaro.

Oltre alle proteine regolatrici codificate dal genoma virale, l'espressione genica dell'HIV è anche influenzata da vari fattori di trascrizione cellulare. Il LTR dell'HIV-1 ha evidenziato un numero di elementi di controllo trascrizionale che possono essere legati da proteine cellulari costitutive o indotte dell'ospite . Queste regioni comprendono l'AP-1, l'HFAT-1, l'USF, l'NFkB, l'SP-1, il TFIID, il TAR, l'LBP e TATA. L'NF-kB gioca un ruolo importante nell'attivazione di molti geni coinvolti nella risposta cellulare all'infiammazione. Questi geni sono ß-interferon, GM-CSF, IL-2, TNF-α , IL6, la catena α del recettore dell'IL-2, antigeni MHC della classe I ed amiloide A del siero. Usando l'NFkB per stimolare la replicazione retrovirale nei siti dell'infiamma-

zione, l'attivazione di questa proteina come una delle prime risposte cellulari è stata attenuata dall'HIV-1.

Le funzioni dei siti leganti per il NFAT-1 e l'AP-1 nel LTR dell'HIV-1 non sono chiare. I siti leganti per i fattori della trascrizione cellulare costitutiva SP-1 ed TFIID e del TATA box sono collocate nell'LTR dell'HIV-1 e giocano il ruolo di promotori. Altri siti leganti per i fattori costitutivi come USF ed LBP sono anche presenti nel LTR dell'HIV-1; tuttavia, il significato funzionale di queste interazioni rimane poco chiaro.

L'espressione genica dell'HIV-1 può anche essere influenzata da virus eterologhi, particolarmente da virus DNA. Il controllo della trascrizione dell'LTR dell'HIV-1 può essere stimolata quando le cellule sono coinfettate con i cloni molecolari del virus JC, del virus BK, del papovavirus linfotropico, con il papillomavirus bovino, con l'herpes simplex virus di tipo 1 e con il virus della varicella-zoster. Inoltre, è stato dimostrato che i prodotti genici virali codificati dal virus della leucemia delle cellule T umane, dagli adenovirus e dal virus dell'epatite B, aumentano l'espressione del gene dipendente dall'LTR dell'HIV nelle cellule transfettate.

Il CMV ed il prodotto del gene precoce del suo *trans*-attivatore possono anche trans-attivare l'espressione dell'HIV-1. In maniera analoga, ciò accade anche per il virus dell'epatite B e per il virus herpes 6 (HHV-6). L'infezione doppia delle cellule T umane CD4+ in coltura con HHV-6 ed HIV-1 ha portato ad un aumento della replicazione dell'HIV-1 ed un aumento della morte delle cellule. Inoltre, è stato dimostrato che il transattivatore Tax dell'HTLV-I induce l'attività dell'NF-kB in cellule T infettate dall'HTLV-I.

Arresto della trascrizione e/o traslazione: gli antisenso

Gli oligonucleotidi sono piccoli oligomeri di RNA o DNA a singola elica complementari alle regioni del genoma dell'HIV che vengono trascritte. Possono arrestare la trascrizione del DNA provirale in mRNA virale, legandosi al DNA provirale, impediscono la translazione (oligonucleotidi antisenso) dell'mRNA virale legandosi all'mRNA, o impediscono la divisione legandosi alle parti di giunzione dell'mRNA precursore virale.

Vengono suggeriti vari modi perché arrivino nella cellula senza essere degradati dagli enzimi ed aumentare la captazione e la loro

migliore presentazione alle cellule. Tali approcci che hanno avuto successo sono la sostituzione dei legami di fosfodiestere con i metilfosfonati, i fosfonotionati, i fosforamidati ed il legame del colesterolo nella posizione 5' terminale dell'oligomero fosforotionato. Inoltre, un recente approccio comprendente gli anticorpi rivolti verso liposomi contenenti RNA antisenso nella regione env si è rivelato in grado di inibire l'HIV-1.

Gli oligomeri antisenso complementari al donatore, all'accettante sovrapposto, ed il siti leganti del primer tRNA dell'HIV-1 hanno evidenziato attività anti-HIV *in vitro*. Il metilfosforato complementare al primo sito accettante sovrapposto del gene tat-3 è stato in grado di inibire la formazione di sincizi mediata dall'HIV-1e i livelli dell'RNA dell'HIV-1 ridotto e della RT in cellule trattate con gli oligo (dNmp). La superespressione del TAR dell'HIV-1 contenente trascrizioni ha portato ad una diminuzione dei livelli di HIV-1 nelle cellule CEM che presentavano livelli elevati di trascrizioni tRNA-TAR chimerico.

Inoltre sono stati testati per l'attività anti-HIV gli analoghi fosforotionati complementari al gene rev dell'HIV, gli oligonucleotidi senso di questa stessa regione e gli omopolimeri. L'omopolimero 28-mer dell'oligodeossicitina fosforotionata ha dimostrato effetti inibitori significativi sulla replicazione dell'HIV-1 in cellule infettate in modo cronico dall'HIV-1 senza effetti deleteri sulle cellule bersaglio non infettate.

Recentemente, un'omocitidina 10-mer fosforotionata non sequenza specifica contenente una parte di colesterolo legato covalentemente all'estremità 5' terminale ha inibito la formazione di sincizio indotta dall'HIV-1 ed HIV-2 nelle cellule T suscettibili.

Questo oligomero non è propriamente un oligomero antisenso o senso. In questo studio, si è anche dimostrato che esso inibisce l'attività della DNA polimerasica, ma non l'attività dell'RT H dell'RNAse. Bloccava anche parzialmente il legame del gp120 con i CD4.

I dati provenienti da un altro laboratorio hanno dimostrato un'inibizione della replicazione dell'HIV-1 da parte dell'RNA trascritto nell'orientamento senso o antisenso dalla regione 5'leader/*gag*.

Non risulta ancora chiaro se queste molecole inibiscano la replicazione dell'HIV e le citopatogenicità associate interferendo con la trascrizione dell'mRNA e/o processazione, attraverso un arresto della traduzione o attraverso altri meccanismi.

Benché i dati sopra menzionati sembrino far presagire un possibile uso di tali oligonucleotidi (senso e antisenso), questi approcci do-

vrebbero essere attentamente valutati in termini di costo, di diffusione alle cellule senza degradazione da parte degli enzimi dell'ospite, e di effetti tossici con lo studio su animali prima dell'uso in test clinici sull'uomo.

Un composto facente parte della famiglia delle benzodiazepine è stato descritto come inibitore della proteina Tat.

Proteasi virale ed i suoi inibitori

Oltre a codificare la trascriptasiinversa e l'integrasi degli enzimi, il gene virale *pol* codifica una proteasi che è essenziale per la proteolisi di alcune proteine virali come le proteine del gag (p17, p24, p15, p9, p6) (Figura 13) e dei prodotti del gene *pol*. La proteasi è codificata dall'estremità 5' del gene pol nella regione della parte sovrapposta del *gag-pol*. Lo spostamento ribosomiale determina la produzione delle poliproteine precursore codificate nel gag-pol (Pr160$^{gag\text{-}pol}$). Queste poliproteine (Figura 13) sono sottoposte a rottura autocatalitica per dare origine alla proteasi virale, e successivamente alla RT, la ribonucleasi H, l'integrasi, p17, p24, p1 e p15. Inoltre, la rottura della poliproteina gag porta alla formazione di varie proteine codificate nel gene gag come descritto in precedenza. Questa rottura proteolitica è necessaria per la maturazione dei virioni.

La sequenza del sito attivo altamente conservata Asp-Thr/Ser-

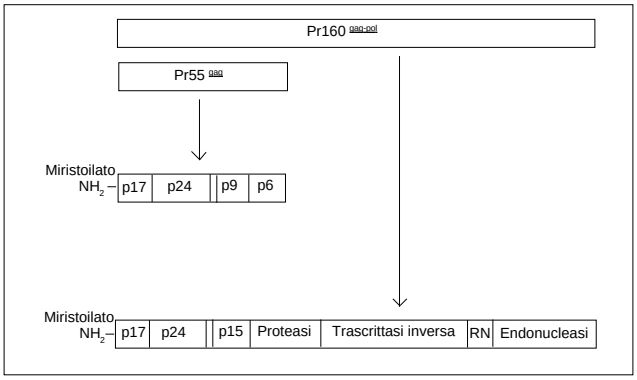


Figura 13. Presentazione schematica delle poliproteine, Pr160gag-pol e Pr55gag tradotte rispettivamente dai geni gag-pol e gag. La rottura proteolitica del Pr55gag produce il p17, p24, p1, p9 e p6; mentre la rottura proteolitica del Pr160gag-pol porta alla p17, p24, p1, p15, alla proteasi, alla trascriptasiinversa, alla ribonucleasi H (RN) e alla endonucleasi.

Glyn nelle proteasi retrovirali e la loro esistenza come omodimeri, suggerisce che questi enzimi sono simili nella struttura tridimensionale all'antenato delle proteasi aspartiche simil pepsina.

Inoltre, l'analisi con raggi X della proteasi dell'HIV-1 con una risoluzione di 2.7 A conferma l'omologia strutturale tra le proteasi retrovirali. La conoscenza della somiglianza tra le proteasi retrovirali e le proteasi aspartiche dei miceti e dei mammiferi implica un processo catalitico identico.

A causa del significato di questa ricerca, sono stati individuati vari inibitori anti-proteasi. Gli inibitori basati sul substrato comprendono l'aloperidolo ed la cerulenina. Usando un sistema di ricerca basato sulla struttura con l'ausilio di un computer, si è riscontrato che l'aloperidolo è un inibitore selettivo della proteasi dell'HIV-1. Benché l'aloperidolo inibisca selettivamente le proteasi dell'HIV-1 e dell'HIV-2, la concentrazione di questo medicinale, richiesta per una tale inibizione è tossica e può essere mortale. Un altro composto, la cerulenina è un antibiotico che si trova comunemente in natura, una proteinase di aspartile fungina ben caratterizzata, un attivatore di endotiapepsina, ed un inibitore della sintesi degli acidi grassi. La cerulenina inibisce la proteasi dell'HIV-1 come si evidenzia in studi *in vitro* usando tre substrati: 1) un eptapeptide sintetico corrispondente alla sequenza nel punto di congiunzione del gag p17 e p24 dell'HIV-1, 2) un precursore gag batteriologicamente espresso e 3) Transcriptasi inversa. La sua mancanza di specificità a causa del vasto raggio di effetti e di citotossicità rende la cerulenina un candidato non idoneo all'uso clinico.

Recentemente, l'U-75875 (Figura 14), un inibitore peptidomimetico, si è dimostrato un inibitore irreversibile della processazione della proteina gag-pol dell'HIV-1. Le particelle del virus prodotte in presenza del farmaco non erano infettive, contenevano solo precursori del gag ed erano morfologicamente immature. Questo composto, su base molare, era potente quanto l'AZT nel blocco della replicazione dell'HIV-1 nei linfociti umani. Inoltre, inibiva anche le proteasi dell'HIV-2 e del SIV.

Un altro peptide, contenente una idrossietilamina attiva al centro della molecola, indicato come composto XVII (Figura 15), è un potente ed altamente selettivo inibitore della proteasi contro l'HIV-1a concentrazioni nanomolari in varie linee cellulari.

Esso era in grado di inibire sia l'HIV-1 che l'HIV-2, ma presentava un effetto limitato sulle proteasi aspartiche. Inoltre sono stati recentemente disegnati, inibitori immetrici della proteasi dell'HIV basando-

si sulla simmetria tri-dimensionale del sito attivo dell'enzima.

Questi composti si sono rivelati estremamente potenti contro l'infezione acuta da HIV-1 *in vitro* e altamente selettivi contro la proteasi dell'HIV-1 se paragonati ai relativi enzimi cellulari.

Recentemente, i composti di difluorochetoni si sono rivelati in grado di inibire la proteasi dell'HIV-1 a concentrazioni nanomolari.

Alcuni di questi composti dovrebbero essere testati in prove precliniche per studiarne la biodisponibilità e farmacocinetica. Benché alcuni degli inibitori dell'antiproteasi presentino problemi di tossicità, la conoscenza acquisita nella preparazione di questi composti dovrebbe essere applicata allo sviluppo di futuri farmaci.

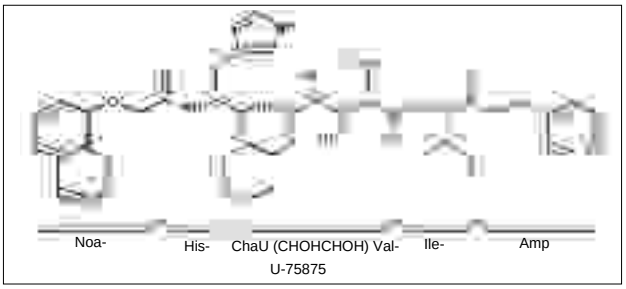


Figura 14. Struttura dell'U75875.

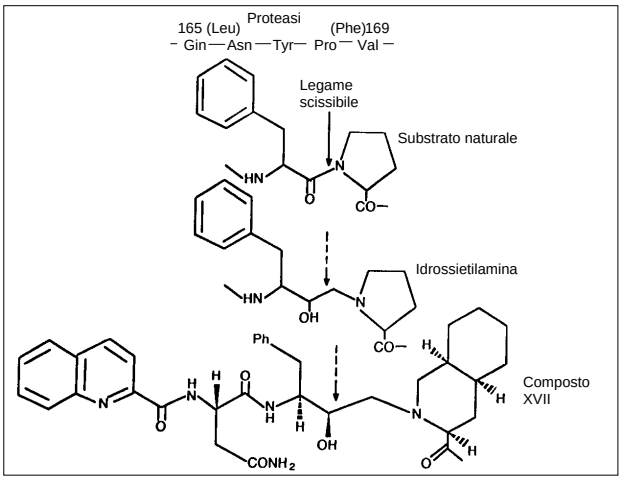


Figura 15. L'inibizione dell'attività proteasica dell'HIV-1 può essere ottenuta dagli inibitori del substrato come l'idrossietilamina e il composto XVII.

La sequenza del substrato ha legame scissibile (Tyr(phe)-Pro); mentre l'inibitore substrato-basato presenta legame nonscissile come rappresentato dalla freccia tratteggiata.

Glicosilazione e miristoilazione

Durante la maturazione delle proteine dell'HIV-1 avviene la miristoilazione delle poliproteine precursore gag e gag-pol e la glicosilazione pesante delle glicoproteine dell'involucro virale .

Il legame covalente del miristato al residuo Gly dell'NH_2-terminale residuo della poliproteina 55 gag dell'HIV-1 attraverso il miristoil CoA: la transferasi protein N-miristoil è essenziale per il processo proteolitico e l'assemblaggio virale. Recentemente, un analogo dell'acido miristico, il 12-metossideconato (13-OxaMyr) si è dimostrato in grado di inibire il processo proteolitico e la produzione del virus in cellule H9 cronicamente infettate. Inibisce anche la produzione di HIV-1 in cellule H9 infette in modo acuto senza accompagnarsi a tossicità cellulare. Inoltre, questo composto e l'AZT agiscono sinergicamente per ridurre la produzione del virus in cellule H9 infette in modo acuto. La glicosilazione delle proteine dell'involucro dell'HIV-1 è prevalentemente N-legato ed è effettuato dagli enzimi cellulari all'interno del reticolo endoplasmatico e del Golgi. Dopo la sintesi del precursore della poliproteina env con l'inserimento co-translazionale nel reticolo endoplasmatico, avviene il trasferimento del componente glicano dal lipide carrier dolico fosfato alla catena di peptidi crescente.

Successive modificazioni di questo glicano ramificato comprendono la rimozione del glucosio terminale attraverso l'α−glucosidasi I e successivamente attraverso α−glucosidasi II all'interno del reticolo endoplasmatico e del Golgi. A seguito di ciò, la maturazione delle catene laterali di N-oligosaccaridi delle glicoproteine avviene attraverso α−mannossidasi I e II ed altre transferasi. Dopo la divisione del precursore gp160 e l'aggiunta delle parti di galattosio, queste proteine mature vengono trasportate sulla superficie delle cellule. La presenza di carboidrati sembra giocare un ruolo chiave nell'interazione tra gp120 e molecole CD4, e la formazione di sincizi multinucleati.

Sono stati descritti vari inibitori della glicosilazione delle proteine virali (Figura 16). La tunicamicina è un inibitore della glicosilazione N-legata, mentre la castanospermina e derivati della deossinogirimicina sono inibitori dell'α−glucosidasi I. Questi composti inibiscono anche la citopaticità HIV-1 mediata e la formazione di sincizi. Inoltre, la loro citotossicità è accettabile. La N-butil-deossigirimicina è considerata un potente inibitore della replicazione dell'HIV-1 più di quanto non lo sia il composto ad essa affine. La N-butil-deossigirimicina ritarda il processo di formazione dell'involucro dalla forma del precursore alla

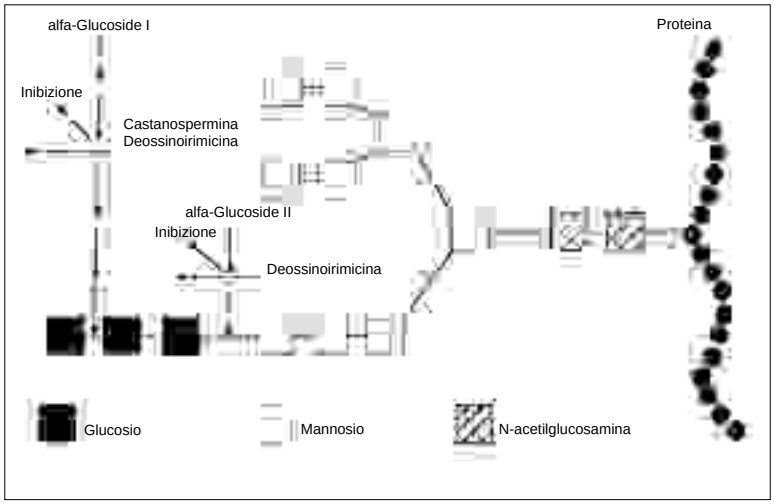


Figura 16. Meccanismo di azione di vari inibitori della glicosilazione

superficie matura e delle proteine di transmembrana nelle cellule infettate dall'HIV-1 e dal SIV-mac, così come nelle cellule infettate dal virus ricombinante envelope HIV-1 vaccinico. Per contro, questo composto non ha effetto sulla sintesi e processazione delle proteine gag.

Gemmazione e maturazione

Le attuali conoscenze riguardanti la cinetica dell'assemblaggio e del processo di gemmazione non sono chiare. I geni *vpu* e *vif* sono rispettivamente responsabili del rilascio di particelle e della infettività virale. Ad oggi, non sono noti gli inibitori di questi geni o dei loro prodotti. L'α -Interferone inibisce in coltura il rilascio della trascriptasiinversa virale e della p24 nel surnatante da parte di linee cellulari cronicamente infette; ma non ha effetti sui livelli di trascriptasiinversa o p24 associati alla cellula.

Inoltre, inibisce la replicazione dell'HIV-1 in cellule, infette acutamente.

Miscellanea di composti antivirali

Si è evidenziato come vari derivati vegetali naturali inibiscano la replicazione dell'HIV-1 *in vitro*. Il meccanismo(i) attraverso il quale alcuni di questi composti inibiscano l'HIV non è del tutto chiaro. Alcuni derivati del tannino come l'acido 1,3,4-tri-O-galloil-chinico; l'acido 3,5-di-O-galloil-scichimico; l'acido 3,4,5-tri-O-galloil-scichimico, la punicalina e la punicalagina inibiscono la replicazione dell'HIV-1 nella linea di cellule H9 infettate con scarsa tossicità.

Inoltre due di questi composti, la punicalina e la punicalagina inibiscono l'attività della trascriptasiinversa dell'HIV-1 purificato a concentrazioni di µm. Una proteina di 30kDa purificata dai semi e frutti della *Mormodica charantia* presenta *in vitro* proprietà inibitrici dell'infezione delle cellule libere da HIV-1 in ragione della dose riducendo la formazione di sincizi, l'antigene p24 e la trancriptasi inversa a concentrazioni di nM. Non sono stati riscontrati effetti citostatici o citotossici durante la sperimentazione. Recenti scritti sugli estratti dei polissaccaridi (PC-6 e PC-7) solubili in acqua provenienti da pigne del *Pinus parviflora sieb et Zucc* hanno rivelato potenti effetti immuno-potenzianti.

Questi composti hanno anche presentato un'attività anti-HIV-1, in maniera proporzionale alla dose, in linee cellulari infette in maniera cronica ed acuta, come misurato attraverso il dosaggio della p24 dell'HIV-1. Essi sono relativamente non tossici per le cellule. Inoltre, la PC-6 inibisce anche la trascriptasiinversa dell'HIV-1, probabilmente per un effetto diretto sulla trascriptasiinversa piuttosto che per l'attività bloccante della trascriptasiinversa quando si lega allo stampo.

Vari flavanoidi quali la biacelina, la quercetina, la quercetagetina e la miricetina si sono rivelati potenti inibitori a concentrazioni di ng della trascriptasiinversa del virus della leucemia murina di Rauscher (RLV) e dall'HIV-1. L'inibizione della trascriptasiinversa era competitiva nel caso della RLV e parzialmente competitiva nel caso dell'HIV nel caso del complesso primer dello stampo (rA)n (dT) 12-18 e non competitivo rispetto al substrato trifosfato, dTTP. L'inibizione da parte delle biacelina è altamente specifica per la trascriptasiinversa e non per la DNA polimerasi B o per la DNA polimerasi I se paragonata ad altri flavanoidi. Benché sia stata osservata questa eccezionale inibizione della trascriptasiinversa, questi composti sono altamente citotossici per i linfociti in coltura e possono avere problemi nel raggiungere la trascriptasiinversa nel citoplasma. Alcune

modificazioni strutturali dei flavanoidi possono aiutare a ridurre la tossicità ed aumentare l'ingresso nella cellula bersaglio.

Altri medicinali vegetali quali la glicirizzina, derivata dalla *glycyrrhiza uralensis,* e *schizymenia pacifica* hanno rivelato rispettivamente attività anti-HIV e capacità di diminuire la trascriptasiinversa dell'HIV.

Una tricosantina, derivata dalle radici medicinali della pianta cinese *trichosanthes kirilowii maxim cucurbitaceae*, è un inibitore delle proteine ribosomiali. Inibisce la replicazione dell'HIV nei linfociti e nei macrofagi *in vitro* ed uccide specificatamente i macrofagi infettati dall'HIV. E' in corso una seconda fase dello studio con uso di questo composto sia con AZT che con ddI in pazienti che non hanno risposto a terapia con analoghi del nucleoside. I dati preliminari di questo studio indicano che l'aggiunta di tricosantina ed AZT comporta una diminuzione delle cellule CD4+. Non è stata riscontrata diminuzione nei livelli elevati di p24 con terapia combinato probabilmente a causa della bassa dose di tricosantina utilizzata.

La GLQ223, una versione formulata della tricosantina, ha dimostrato effetti anti-HIV nelle cellule linfoblastoidi T e livelli diminuiti di p24 in monociti infettati da HIV misurata con la citofluorimetria a flusso. Questo composto ha anche diminuito la replicazione dell'HIV-1 in macrofagi cronicamente infettati *in vitro* così come rilevato dalla p24 citoplasmatica (sia con ELISA che citometria a flusso) e i livelli di RNA dell'HIV-1 (analisi slot blot) senza causare citotossicità misurabile nelle colture non infette. Effetti collaterali associati a questo farmaco come preliminarmente illustrato nella fase I dello studio comprendono febbre, brividi, dolori muscolari e ossei, innalzamento degli enzimi ed eruzione cutanea.

Il cloruro di fagaronina, un alcaloide di benzofenatinidina derivato dalla pianta africana *Fagara Xanthoxyloides Lam* sembra inibire la trascriptasiinversa e l'HIV-1 a livelli di ng in linee cellulari infettate in maniera acuta e si è rivelato non tossico alla concentrazione di 0.1 µg.

Il fosfonoformato ed i suoi analoghi, gli analoghi dell'acido naftalenesulfonico hanno dimostrato proprietà inbitorie della replicazione dell'HIV-1 e della formazione di sincizi. Inoltre, i derivati dell'acido naftalenesulfonico inibiscono anche la trascriptasi inversa del'HIV-1.

Associazione di farmaci

Vari farmaci anti-HIV sono associati a gravi effetti collaterali. Inoltre, stanno emergendo anche isolati resistenti associati alla terapia con AZT. Tuttavia, alcuni di questi composti hanno differenti meccanismi di azione sul ciclo di replicazione dell'HIV-1.

Per questo motivo, possono essere usate combinazioni di vari medicinali per ottenere effetti sinergici contro l'HIV-1 e si possono eliminare o ridurre i problemi succitati. Ad oggi, combinazioni di AZT con ampligen, GM-CSF, IFNa, aciclovir, CD4 solubile, castano-spermina, fosfonoformato, PMEA o 5-etil-1- etossimetil-6(fenilzio) uracile hanno evidenziato effetti sinergici anti-HIV senza un concomitante aumento della tossicità *in vitro*.

Inoltre, la ribavarina ha potenziato l'attività anti-HIV del DDI o del 2',3'-dideossi-2,6 diaminopurina riboside *in vitro*. Osservazioni simili sono state anche fatte con combinazioni di dipiridamolo (DPM) con AZT o ddc in monociti *in vitro*. Tali azioni sono state attribuite all'inibizione selettiva e della fosforilazione del DPM della captazione dei deossinucleosidi. Evidenze preliminari suggeriscono che la combinazione di effetto dell'inibitore della proteasi C_2 simmetrico dell'HIV-1 usato sia con AZT che con ddI si è rivelata additiva o sinergica.

I dati preliminari provenienti da recenti studi clinici con terapia combina consistente in AZT e DDI in pazienti sottoposti per tre mesi a trattamento con AZT e con meno di 400 cellule/cmm di cellule CD4, hanno rivelato un miglioramento nelle cellule CD4; tuttavia è ancora necessario un maggiore follow-up per valutare l'efficacia virologica e clinica di questi medicinali.

Sfortunatamente, l'AZT o 2',3'-dideossiriboside con ribavirina e dextrano solfato con CD4 hanno rivelato un effetto antagonistico.

Conclusioni

La pandemia dell'AIDS esiste da più di un decennio. L'isolamento del suo agente causale e le ricerche chiave nel campo della biologia cellulare, dell'immunologia e della biologia molecolare attinenti all'HIV-1 hanno condotto alla comprensione della replicazione di questo virus ed ai meccanismi della patogenesi. La conoscenza acquisita in questi campi ha portato allo studio di numerosi medicinali anti-HIV.

I vari analoghi dei nucleosidi, particolarmente l'AZT e il ddI, sono presto passati dall'uso di laboratorio all'uso clinico. Ad oggi, numerosi analoghi di nucleosidi o di non-nucleosidi possono essere considerati possibili agenti antivirali. Tuttavia, questi medicinali prolungano solo la vita, ma non curano l'AIDS. Inoltre, stanno emergendo nuovi isolati resistenti ai farmaci. I concetti molecolari circa l'HIV hanno progredito a tal punto che "l'immunità cellulare" potrebbe un giorno diventare realtà. Vari agenti anti-HIV diretti contro funzioni specifiche di vari geni virali sono possibilità terapeutiche potenziali, così come rilevato da studi *in vitro*. Oltre agli effetti anti-HIV-1, vari composti agiscono anche contro altri virus che si pensa siano cofattori associati all'AIDS. Gli effetti della terapia combina, benché agli inizi, potranno un giorno rivelarsi più efficaci contro questo virus. La combinazione di farmaci con differenti meccanismi d'azione e tossicità non additive tra loro potranno servire a curare o, nella peggiore delle ipotesi, a ritardare in maniera rilevante la progressione della malattia.

Ringraziamenti

Desideriamo ringraziare Mary Rubert e Jayne Love per l'assistenza fotografica, e Lori Tillis per la preparazione del manoscritto.

Le figure 1, 2, 3, 4, 7, 8, sono state Pubblicate con l'autorizzazione del Mosby Year Book, Inc., St. Louis, MO, USA, K.H. Wells, B.J. Poiesz: Retroviruses: Individuazione, biologia molecolare e trattamento dell'infezione retrovirale. J Am Acad Dermatol, 1990; 22: 1175-95.

Bibliografia

1. Abrams DI, Kuno S, Wong R, and Ueno R. Oral dextran sulfate (UA001) in the treatment of the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. Ann Int Med 110: 183-88, 1989.
2. Adachi A, Koenig S, Gendelman HE, et al. Productive, persistant infection of human colorectal cell lines with human immunodeficiency virus. J Virol 61: 209-13, 1987.
3. Adams DS, Crawford TB, Klevjer-Anderson P. A pathogenic study of the early connective tissue lesions of viral caprine arthritis-encephalitis. Am J Pathol 99: 257-78, 1980.
4. Agrawal S, Goodchild J, Civeira MP, et al. Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 85: 7079-83, 1988.
5. Ahmad N and Venkatesan S. Nef protein of HIV-1 is a transcriptional repressor of HIV-1 LTR. Science 241: 1481- 85, 1988.
6. Amin RM, Dean MT, Zaumetzer LE, Poiesz BJ. Virucidal efficacy of various lens cleaning and disinfecting solutions on HIV-1 contaminated contact lenses. AIDS Research and Hum Retroviruses. 7: 403-8, 1991.
7. Anand R, Moore JL, Curran JW, et al. Interaction between rifabutin and human immunodeficiency virus type 1: inhibition of replication, cytopathic effect, and reverse transcriptase in vitro. Antimicrob Agents Chemother 32: 684-8, 1988.
8. Ashorn P, McQuade TJ, Thaisrivongs S, et al. An inhibitor of the protease blocks maturation of human and simian immunodeficiency viruses and spread of infection. Proc Natl Acad Sci USA 87: 7472-76, 1990.
9. Baba M, Schols D, DeClercq E. Novel sulfated polymers as highly potent and selective inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) replication and giant cell formation. Antimicrob Agents Chemother 34: 134-8, 1990.
10. Baba M, Tanaka H, DeClercq E, et al. Highly specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by a novel 6-substituted acyclouridine derivative. Biochem Biophys Res Commun 165: 1375-81, 1989.
11. Baba M, Pauwels R, Balzarini J, et al. Selective inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) by 3'-azido-2',3'- dideoxyguanosine in vitro. Biochem Biosphys Res Communi 145: 1080-86, 1987.
12. Baba M, Pauwels R, Balzarini J, et al. Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6132-36, 1988.
13. Baba M, Schols D, Pauwels R. Sulfated polysaccharides as potent inhibitors of HIV-

induced syncytium formation: a new strategy toward AIDS chemotherapy. J Acq Immun Def Syndr 3: 493-9, 1990.

14. Baba M, Ito M, Shigeta S, et al. Synergistic inhibition of human immunodeficiency type 1 replication by 5-ethyl-1- ethoxymethyl-6-(phenylthio) uracil (E-EPU) and azidothymidine in vitro. Antimicrob Agents Chemother 35: 1430-33, 1991.
15. Baba M, Pauwels R, Balzarini J, et al. Ribavirin antagonizes inhibitory effects of pyrimidine 2',3'- dideoxynucleosides on replication of human immunodeficiency virus in vitro. Antimicrob Agents Chemother 31: 1613-7, 1987.
16. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumor viruses. Nature 226: 1209-11, 1970.
17. Baltimore D. Intracellular Immunization. Nature 335: 395- 6, 1988.
18. Balzarini J, Kang GJ, Dalal M, et al. The anti-HTLV-III (anti-HIV) and cytotoxic acitivity of 2',3'-didehydro-2',3'- dideoxyribonucleosides: a comparison with their parental 2',3'-dideoxyribonucleosides. Mol Pharmacol 32: 162-7, 1987.
19. Balzarini J, Naesens L, Robins MJ, DeClercq E. Potentiating effect of ribavirin on the in vitro and in vivo antiretrovirus activities of 2',3'-dideoxyinosine and 2',3'- dideoxy-2,6-diaminopurine riboside. J Acq Immun Def Syndr 3: 1140-47, 1990.
20. Balzarini J, Hao Z, Herdewijn P, et al. Intracellular metabolism and mechanism of anti-retrovirus action of 9-(2- phosphonyl-methylethyl) adenine, a potent anti-human immunodeficiency virus compound. Proc Natl Acad Sci USA 88: 1499-03, 1991.
21. Balzarini J, Naesens L, Herdewijn P, et al. Marked in vivo antiretrovirus activity of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl)- adenine, a selective anti-human immunodeficiency virus agent. Proc Natl Acad Sci USA 86: 332-6, 1989.
22. Barre-Sinoussi F, Cherman JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Science 220: 868-70, 1983.
23. Baba M, DeClercq E, Tanaka H, et al. Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) by 5-ethyl-6-phenylthiouracil derivatives through their interaction with the HIV-1 reverse transcriptase. Proc Natl Acad Sci USA 88: 2356-60, 1991.
24. Berman PW, Riddle L, Nakamura G, et al. Expression and immunogenecity of the extracellular domain of the human immunodeficiency virus type I envelope glycoprotein, gp160. J Virol 63: 3489-98, 1989.
25. Bertani G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli. J Bacteriol 2: 293-300, 1951.
26. Blattner WA. HIV epidemiologic: past, present, and future. FASEB J 5: 2340-48, 1991.
27. Blundell TL, Lapatto R, Wilderspin AF, et al. The 3-D structure of HIV-1 proteinase and the design of antiviral agents for the treatment of AIDS. TIBS 15: 425-430, 1990
28. Bohnlein E, Lowenthal JW, Siekevitz M, et al. The same inducible nuclear proteins

regulate mitogen activation of both the interleukin-2 receptor-alpha gene and type 1 HIV. Cell 53: 827-36, 1988.

29. Bonchard J, Walker MC, Leclerc J-M, et al. 5-Azacytidine and 5-azadeoxycytidine inhibit human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro. Antimicrob Agents Chemother 34: 206-9, 1990.
30. Braddock M, Thorburn AM, Chambers A. A nuclear translational block imposed by the HIV-1 U3 region is relieved by the Tat-TAR interaction. Cell 62: 1123-33, 1990.
31. Brenneman DE, Westbrook GL, Fitzgerald SP, et al. Neuronal cell killing by the envelope protein of HIV and its prevention by vasoactive intestinal peptide. Nature (London) 335: 639-42, 1988.
32. Broder S. Pharmacodynamics of 2',3'-dideoxycytidine: An inhibitor of human immunodeficiency virus. Am J Med 88(suppl 5B): 2-7, 1990.
33. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. Correct integration of retroviral DNA in vitro. Cell 49: 347-56, 1987.
34. Brown PO, Bowerman B, Varmus HE, Bishop JM. Retroviral integration: structure of the initial covalent product and its precursor and a role for the viral IN product. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2525-29, 1989.
35. Browne MJ, presenting for the Brown University AIDS Program, Clinical Trial Group (1990). Phase I study of 2',3'- didehydro-2',3'-dideoxythymidine (d4T) in patients with AIDS or ARC. VIth International Conference on AIDS, San Francisco, p. 200, SB456, 1990.
36. Bryant ML, Ratner L, Duronio RJ, et al. Incorporation of 12-methoxydodecanoate into the human immunodeficiency virus 1 gag polyprotein precursor inhibits its proteolytic processing and virus production in a chronically infected human lymphoid cell line. Proc Natl Acad Sci USA 88: 2055- 59, 1991.
37. Busso ME, Resnick L, Yang BH, Mian AM. Cellular pharmacology and anti-HIV activity of 2',3'- dideoxyguanosine. AIDS Res Hum Retro 6: 1139-46, 1990.
38. Butler KM, Husson RN, Balis FM, et al. Dideoxyinosine in children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. N Engl J Med 324: 137-44, 1991.
39. Butler KM, Husson R, Lewis L, et al. Prolonged dideoxyinosine (ddI) therapy in HIV infected children. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy,pg. 81,Vol I, Abstract #TUB94, 1991.
40. Byers V, Levin AS, Waites L, et al. A phase II study of effect of trichosanthin treatment in combination with zidovudine in HIV disease. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg. 224, Vol. 1, Abstract # WB2171, 1991.
41. Byrn RA, Mordenti J, Lucas C. Biological properties of a CD4 immunoadhesin. Nature (London) 344: 667-70, 1990.
42. Byrne BC, Li JJ, Sninsky J, et al. Detection of HIV-1 RNA sequences by in vitro DNA amplification. Nucleic Acids Res 16: 4165, 1988.

43. Capon DJ, Chamow SM, Mordenti J. Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy. Nature 337: 525-31, 1989.

44. Carter SG, Kessler JA, Rankin CD. Activities of (-)- Carbovir and 3'-Azido-3'-deoxythymidine against human immunodeficiency virus in vitro. Antimicrobial Agents Chemother 34: 1297-1300, 1990.

45. Centers for Disease Control: Task force on Kaposi's sarcoma and opportunistic infections: Special report: Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. N Engl J Med 306: 248-51, 1982.

46. Chang DD, and Sharp PA. Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites. Cell 59: 789-95, 1989.

47. Cheevers WP, McGuire TC. Equine infectious anemia virus: immunopathogenesis and persistance. Res Infect Dis 7: 83-8, 1985.

48. Cheng-Mayer C, Rutka JT, Rosenblum ML, et al. Human immunodeficiency virus can productively infect cultured human glial cells. Proc Natl Acad Sci USA 84: 3526-30, 1987.

49. Cheson BD, Levine AM, Mildvan D, et al. Suramin therapy in AIDS and related disorders: report of the U.S. Suramin Working Group. JAMA 258: 1347-51, 1987.

50. Claphan PR, Weber L, Whitby D, et al. Soluble CD4 blocks the infectivity of diverse strains of HIV and SIV for T cells and monocytes but not for brain and muscle cells. Nature 337: 368-79, 1989.

51. Clark DP, Dougherty RM. Detection of avian oncovirus group- specific antigens by the enzyme-linked immunosorbent assay. J Gen Virol 47: 283-91, 1980.

52. Clavel F, Geutard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. Science 233: 343-6, 1986.

53. Clayton LK, Hussey RE, Steinbrich R, et al. Substitution of murine for human CD4 residues identifies amino acids critical for HIV gp120 binding. Nature 335: 363-66, 1988.

54. Coller AC, Fischl MA, Kaplan LD, et al. Effect of combination therapy with zidovudine (ZDV) and didanosine (DDI) on surrogate markers. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy, pg. 54, Vol. 1, Abstract # TUB2, 1991.

55. Cooley TP, Kunches LM, Saunders CA, et al. Once-daily administration of 2',3'-dideoxyinosine (ddI) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. Results of a phase I trial. N Engl J Med 322: 1340-1345, 1990.

56. Cork LC, Hadlow WJ, Crawford TB, et al. Infectious leukoencephalomyelitis of young goats. J Infect Dis 129: 134-41, 1974.

57. Crawford TB, Adams DS, Cheevers WP, Cork LC. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. Science 207: 997-99, 1980.

58. Crawford TB, Cheevers WP, Klevjer-Anderson P, McGuire TC. Equine infectious anemia: virion characteristics, virus-cell interactions and host responses in persistent viruses; ICN/UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology. Stevens J, Todaro G and Fox CF (eds). Academic Press, NY, USA, Vol. 2, 729-49, 1978.

59. Cullen BR. Trans-activation of human immunodeficiency virus occurs via a bimodal mechanism. Cell 46: 973-982, 1986.

60. Cullen BR and Greene WC. Functions of the auxilary gene products of the human immunodeficiency virus type 1. Virology 178: 1-5, 1990.

61. Cullen BR. Regulation of HIV-1 gene expression. FASEB Journal 5: 2361-68, 1991.

62. Dahlberg JE, Mitsuya H, Broder S, et al. Broad spectrum antiretroviral activity of 2',3'-dideoxynucleosides. Proc Natl Acad Sci USA 84: 2469-73, 1987.

63. Dalgleish AG, Beverly PCL, Clapman PR, et al. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. Nature 312: 763-6, 1984.

64. Davies WL, Grunert RR, Haff RF, et al. Antiviral activity of 1-adamantanamine (Amantidine). Science 144: 862-3, 1984.

65. Davis MG, Kenney SC, Kamine J, et al. Immediate early gene region of human cytomegalovirus trans-activates the promoter of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8642-46, 1987.

66. DeClercq E. New acquisitions in the development of anti-HIV agents. Antiviral Res 12: 1-20, 1989.

67. DeClercq E. New developments in anti-AIDS drug research. In: Claassen V, ed. Trends in drug research. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 133-52, 1990.

68. DeClercq E. Review: Basic approaches to anti-retroviral treatment. J Acq Immun Def Syndr 4: 207-18, 1991.

69. DeClercq E. Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses. Cancer Lett 8: 9-22, 1979.

70. DesJarlais RL, Seibel GL, Kuntz ID, et al. Structure-based design of nonpeptide inhibitors specific for the human immunodeficiency virus 1 protease. Proc Natl Acad Sci USA 87: 6644-48, 1990.

71. diMarro Veronese FD, Copeland PD, DeVico AL, et al. Characterization of highly immunogenic p66/p51 as the reverse transcriptase of HTLV-III/LAV. Science 231: 1289- 91, 1986.

72. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, et al. Human immunodeficiency virus 1 tat protein binds trans-activation- responsive region (TAR) RNA in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 86: 6925-29, 1989.

73. Dormont D, Spire B, Barre-Sinoussi F, et al. Inhibition of RNA-dependent DNA polymerase of AIDS and SAIDS retroviruses by HPA-23 (ammonium-21-tungsto-9-antimoniate). Ann Inst Pasteur Virol 136E: 75-83, 1985.

74. Dournon E, Matherson E, Rozenbaum W, et al. The Claude Bernard Hospital AZT Study Group: Effects of zidovudine in 365 consecutive patients with AIDS or AIDS-related complex. Lancet 2: 1297, 1988.

75. Drexler H. The kinetics of yielder cell formation in host- controlled modification caused by P1 lysogenic cells. Virology 33: 674-83, 1967.

76. Dreyer GB, Metcalf BW, Tomaszek TA Jr, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus 1 protease in vitro: rational design of substrate analogue inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9752-56, 1989.

77. Dreyer EB, Kaiser PK, Offermann JT and Lipton SA. HIV-1 coat protein neurotoxicity prevented by calcium channel antagonists. Science 248: 364-67, 1990.

78. Duggan DB, Ehrlich GD, Davey FP, et al. HTLV-I induced lymphoma mimicking Hodgkin's disease: diagnosis by polymerase chain reaction amplification of specific HTLV-I sequences in tumor DNA. Blood 71: 1027-32, 1988.

79. Egberink H, Borst M, Niphuis H, et al. Suppression of feline immunodeficiency virus infection in vivo by 9-(2- phosphono-methoxyethyl) adenine. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3087-91, 1990.

80. Erickson J, Neidhart DJ, VanDrie J, et al. Design, activity and 2.8 Å crystal structure of a C2 symmetric inhibitor complexed to HIV-1 protease. Science 249: 527-33, 1990.

81. Feinberg MB, Baltimore D, and Frankel AD. The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4045-49, 1991.

82. Feinberg MB, Jarrett RF, Aldovini A, et al. HTLV-III expression and production involve complex regulation at the levels of splicing and translation of viral RNA. Cell 46: 807-17, 1986.

83. Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, et al. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1495-99, 1989.

84. Feng S and Holland EC. HIV-1 tat trans-activation requires the loop sequence within tar. Nature 334: 165-67, 1988.

85. Fischinger PJ, Bolognisi DP. Prospects for diagnostic intervention and vaccine development, in AIDS. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, eds. AIDS: etiology, diagnosis, treatment and prevention. Philadelphia, JB Lippincott, 55-58, 1985.

86. Fischl MA, Richman DD, Causey DM, et al. Prolonged zidovudine therapy in patients with AIDS and advanced AIDS- related complex. JAMA 262: 2405-10, 1989.

87. Fischl, M, Galpin JE, Levine JD, et al. Recombinant human erythropoietin for patients with AIDS treated with zidovudine. N Engl J Med 322: 1488-93, 1990.

88. Fischl MA, Richman DD, Grieco MH, et al. The efficacy of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex: a double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med 317: 185-91, 1987.

89. Folks TM, Kessler S, Cottler-Fox M, et al. Infection and replication of human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) in purified CD4-negative precursor cells from normal bone marrow. IV International Conference on AIDS, Stockholm, Abstract #2067, 1988.

90. Frankel AD, Bredt DS and Pabo CO. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. Science 240: 70-73, 1988.

91. Frankel AD and Pabo CO. Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. Cell 55: 1189-93, 1988.

92. Fujiwara T, and Mizuuchi K. Retroviral DNA integration: structure of an integration intermediate. Cell 54: 497-504, 1988.

93. Furner, Bek M, Gold J, et al. A phase I/II unblinded dose ranging study of hypercin in HIV-positive patients. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg. 199, vol. 2, Abstract # WB2071, 1991.

94. Gabuzda DH, Ho DD, Dela Monte SM, et al. Immunohistochemical identification of HTLV-III antigens in brains of patients with AIDS. Ann Neurol 20: 289-95, 1986.

95. Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, et al. Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV- III) from patients with AIDS and at risk of AIDS. Science 224: 500-3, 1984.

96. Gangemi JD, Cozens RM, De Clercq E, et al. 9-(2- Phosphonylmethoxyethyl) adenine in the treatment of murine acquired immunodeficiency disease and opportunistic herpes simplex virus infections. Antimicrob Agents Chemother 33: 1864-8, 1989.

97. Ganglioti D, Ficarra G, Adler-Strothz K, et al. Zidovudine- related oral lichenoid reactions.VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg 282, Vol I, Abstract #2203, 1991.

98. Garcia JA, Wu FK, Mitsuyasu R and Gaynor RB. Interactions of cellular proteins involved in the transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus. EMBO J 6: 3761-70, 1987.

99. Gardner MB, Luciw PA. Simian immunodeficiency viruses and their relationship to the human immunodeficiency viruses. AIDS 2 (suppl 1): 511-33, 1988.

100. Gelderblom H, Renpke H, Winkel T, et al. MHC antigens: constituents of the envelopes of human and simian immunodeficiency viruses. Z Naturforsch 42: 1328-34, 1987.

101. Gendelman HE, Phelps W, Feigenbaum L, et al. Transactivation of the human immunodeficiency virus long terminal repeat sequence by DNA viruses. Proc Natl Acad Sci USA 83: 9759-63, 1986.

102. Gerard GF, Rottman F, Green M. Poly (2'-O-methyl- cytidylate) oligodeoxyguanylate as a template for the ribonucleic acid directed deoxyribonucleic acid polymerase in ribonucleic acid tumor virus particles and a specific probe for the ribonucleic acid directed enzyme in transformed mouse cells. Biochemistry 13: 1632-41, 1976.

103. Gilmore TD. NF-kB, KBF1, dorsal, and related matters. Cell 62: 841-43, 1990.

104. Goff, SP. Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure and function. J Acq Immun Def Syndr 3: 817-31, 1990.

105. Gonzalez-Scarano F, Waxham MN, Ross AM, Hoxie JA. Sequence similarities between human immunodeficiency virus gp41 and paramyxovirus fusion proteins. AIDS Res and Human Retroviruses 3: 245-52, 1987.

106. Gorda MA, Braun MJ, Clements JE, et al. Human T-cell lymphotropic virus type III shares sequence homology with a family of pathogenic lentiviruses. Proc Natl Acad Sci USA 83: 4007-11, 1986.

107. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, et al. Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence for a new acquired cellular immunodeficiency. N Engl J Med 305: 1425-31, 1981.

108. Graf T. A plaque assay for avian RNA tumor viruses. Virology 50: 567-78, 1972.

109. Graziano SL, Lehr BM, Merl SA, et al. Quantitative assay of human T-cell leukemia/ lymphoma virus transformation. Cancer Res 47: 2468-73, 1987.

110. Greico MH, Lange M, Reddy M, Metroka C. Open study of AL- 721 treatment of HIV-infected subjects with generalized lymphadenopathy syndrome. Antiviral Res 9: 177-190, 1988.

111. Groopman JE, Hartzband PI, Shulman L, et al. Antibody seronegative human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III)- infected patients with acquired immunodeficiency syndrome or related disorders. Blood 66: 742-4, 1985.

112. Guyader M, Emerman M, Sonigo P, et al. Genomic organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. Nature 326: 662-9, 1987.

113. Haase AT. The slow infection caused by visna virus. Curr Top Microbiol Immunol 72: 101-56, 1975.

114. Hamamoto Y, Nakashima H, Matsui T, et al. Inhibitory effect of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxynucleosides on infectivity, cytopathic effects, and replication of human immunodeficiency virus. Antimicrob Agents Chemother 31: 907-910, 1987.

115. Hammes SR, Dixon EP, Malim MH, et al. Nef protein of human immunodeficiency virus type 1: evidence against its role as a transcriptional inhibitor. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9549-53, 1989.

116. Harouse JM, Kunsch C, Hartle HT, et al. CD4-independent infection of human neural cells by immunodeficiency virus type 1. J Virol 63: 2527-33, 1989.

117. Harper ME, Marselle LM, Gallo RC, et al. Detection of lymphocytes expressing human T-lymphotropic virus type III in lymph nodes and peripheral blood from infected individuals in situ hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 83: 772-6, 1986.

118. Harrich D, Garcia J, Wu F, et al. Role of Spl-binding domains in vivo transcriptional regulation of the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat. J Virol 63: 2585-91, 1989.

119. Hartman NR, Johns DJ and Mitsuya H. Pharmacokinetic analysis of dextran sulfate in rats as it pertains to the clinical treatment of HIV infection. AIDS Res Hum Retrov 6: 805-12, 1990.

120. Hartshorn KL, Vogt MW, Chou T-C, et al. Synergistic inhibition of human immunodeficiency virus in vitro by azidothymidine and recombinant alpha interferon. Antimicrob Agents Chemother 31: 168-72, 1987.

121. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB J 5: 2349-60, 1991.

122. Haseltine WA. Development of antiviral drugs for the treatment of AIDS: strategies and prospects. J Acq Immun Def Syndr 2: 311-34, 1989.

123. Haseltine WA. Molecular biology of the human immunodeficiency virus type 1. FASEB journal 5: 2349-60, 1991.

124. Hauber J, Perkins A, Heimer EP and Cullen BR. Trans- activation of human immunodeficiency virus gene expression is mediated by nuclear events. Proc Natl Acad Sci USA 84: 6364-68, 1987.

125. Hayashi S, Phadtare S, Zemlicka J, et al. Adenallene and cytallene: acyclic nucleoside analogues that inhibit replication and cytopathic effect of human immunodeficiency virus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6127-31, 1988.

126. Hayashi S, Norbeck DW, Rosenbrook W, et al. Cyclobut-A and cyclobut-G, carbocyclic oxetanocin analogs that inhibit the replication of human immunodeficiency virus in T cells and monocytes and macrophages in vitro. Antimicrob Agents Chemother 34: 287-94, 1990.

127. Hayashi S, Fine RL, Chou T-C, et al. In vitro inhibition of the infectivity and replication of human immunodeficiency virus type 1 by combination of antiretroviral 2',3'-dideoxynucleosides and virus-binding inhibitors. Antimicrob Agents Chemother 34: 82-88, 1990.

128. Ho DD, Kaplan JC, Rackauskas IE, et al. Second conserved domain of gp120 is important for HIV infectivity and antibody neutralization. Science 239: 1021-3, 1988.

129. Ho DD, Hartshorn KL, Rota TR, et al. Recombinant human interferon alpha suppressed HTLV-III replication in vitro. Lancet 1: 602, 1985.

130. Hunsman G, Schneider J. The primate lentiviruses. AIDS 2: 1-15, 1988.

131. Huryn DM, Sluboski BC, Tam SY, et al. Synthesis of Iso-ddA, member of a novel class of anti-HIV agents. Tetrahedron Lett 30: 6259-62, 1989.

132. Idziorek T, Klatzmann D. Functional expression of the CD4 protein after cross-linking to red blood cells with a bifunctional reagent. Biochimica et Biophysica Acta 1062: 39-45, 1991.

133. Ito M, et al. Inhibitory effect of glycyrrhizin on the in vitro infectivity and cytopathic activity of the human immunodeficiency virus [HIV (HTLV-III/LAV)]. Antiviral Research 7: 127-37, 1987.

134. Itoh W, Sugawara I, Kimura S, et al. Immunopharmacological study of sulfated schizophyllan (SPG)1 - Its action as a mitogen and anti-HIV agent. Int J Immunopharmac 12: 225- 233, 1990.

135. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, et al. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression. Nature 331: 280-83, 1988.

136. Jacobovits A, Smith DA, Jacobovits EB, Capon DJ. A discrete element 3' of human

immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation site mediates transcriptional activation by an HIV trans activator. Mol Cell Biol 8: 2555-61, 1988.

137. Jakobovits A, Rosenthal A, and Capon DJ. Trans-activation of HIV-1 LTR-directed gene expression by tat requires protein kinase C. EMBO J 9: 1165-70, 1990.

138. Johnson MA and Fridland A. Phosphorylation of 2',3'- dideoxyinosine by cytosolic 5'-nucleotidase of human lymphoid cells. Mol Pharmacol 36: 291-95, 1989.

139. Johnson VA, Barlow MA, Merrill DP, et al. Three-drug synergistic inhibition of HIV-1, replication in vitro by zidovudine, recombinant soluble CD4, and recombinant interferon-alpha A. J Infect Dis 161: 1059-67, 1990.

140. Jones KA, Kadonaga JT, Luciw PA and Tijan R. Activation of the AIDS retrovirus promoter by the cellular transcription factor, Spl. Science 232: 755-59, 1986.

141. Kageyama S, Erickson J, Weinstein J, et al. In vitro inhibition of HIV-1 replication by C2 symmetric HIV protease inhibitors as single agents or in combinations with azidothymidine (AZT) or dideoxyinosine (ddI). VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg. 105, Vol. 2, Abstract # WA1054, 1991.

142. Kahn JO, Allan JD, Hodges TL, et al. The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. Ann Int Med 112: 254-61, 1990.

143. Kanki PJ, McLane MF, King NW, et al. Serological identification and characterization of a macaque T- lymphotropic retrovirus closely related to HTLV-III. Science 228: 1199-1201, 1985.

144. Kao S-Y, Calman AF, Luciw PA and Peterlin BM. Anti- termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. Nature 330: 489-93, 1987.

145. Karpas A, Fleet GWJ, Dwek RA, et al. Aminosugar derivatives as potential anti-human immunodeficiency virus agents. Proc Natl Acad Sci USA 85: 9229-33, 1988.

146. Katoh I, Yasunaga , Ikawa Y and Yoshaka Y. Inhibition of retroviral protease activity by an aspartyl proteinase inhibitor. Nature 329: 654-56, 1987.

147. Katz RA and Skalka AM. Control of retroviral RNA splicing through maintenance of suboptimal processing signals. Mol Cell Biol 10: 696-704, 1990.

148. Kaufman JF, Valandra G, Rodriquez G, et al. Phorbol ester enhances human immunodeficiency virus-promoted gene expression and acts on a repeated 10-base-pair function enhancer element. Mol Cell Biol 7: 3759-66, 1987.

149. Kawakami K, Scheidereit C, roeder RG. Identification and purification of a human immunoglobulin enhancer binding protein NF-kB that activates transcription from a human immunodeficiency virus 1 promoter in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4700-4, 1988.

150. Kessler HA, Blaauw B, Spear J, et al. Diagnosis of human immunodeficiency virus infection in seronegative homosexuals presenting with an acute viral syndrome. JAMA 258: 1196-9, 1987.

151. Kiessling AA, Gaulian MA. A comparison of the enzymatic responses of the DNA polymerases from four RNA tumor viruses. Biochem Biophys Res Commun 71: 1069-77, 1976.

152. Kim S, Ikeuchi K, Byrn R, et al. Lack of a negative influence on viral growth by the nef gene of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA 86: 9544-48, 1989.

153. Kim S, Byrn R, Groopman J and Baltimore D. Temporal aspects of DNA and RNA synthesis during human immunodeficiency virus infection: evidence for differential gene expression. J Virol 63: 3708-13, 1989.

154. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, et al. T-lymphocyte T4 molecule behaves as a receptor for human retrovirus LAV. Nature 312: 767-8, 1984.

155. Klein KB, Creagh-Kirk T, Maha M, et al. Assessing etiology of adverse events in HIV positive patients: relationship of liver abnormalities to HIV disease versus zidovudine therapy. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg 245, Vol I, Absract #MB2253, 1991.

156. Koenig S, Gendelman HE, Orenstein JM, et al. Detection of AIDS virus in macrophages in brain tissues from AIDS patients with encephalopathy. Science 233: 1089-93, 1986.

157. Koenig S, Fauci AS. AIDS: immunopathogenesis and immune response to the human immunodeficiency virus; in AIDS: Etiology, Diagnosis, Treatment and Prevention. Devita VT, Hellman S and Rosenberg SA (eds). J.B. Lippincott Co, Philadelphia, 2nd edition, pp. 61-77, 1989.

158. Koup RA, Merhuzzi VJ, Hargrave KD, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication by the dipyridodiazepinone BI-RG-587. J Infect Dis 163: 966- 970, 1991.

159. Kovacs JA, Deyton L, Davey R, et al. Combined zidovudine and interferon-alpha therapy in patients with Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Ann Int Med 111: 280-287, 1989.

160. Kozarsky K, Perman M, Basiripour L, et al. Glycosylation and processing of the human immunodeficiency virus type 1 envelope protein. J Acq Immun Def Syndr 2: 163-9, 1989.

161. Kramer RA, Schaber MD, Skalka AM, et al. HTLV-III gag protein is processed in yeast cells by the virus pol- protease. Science 231: 1580-84, 1986.

162. Kukla MJ, Breslin HJ, Pauwels R, et al. Synthesis and anti- HIV-1 activity of 4,5,6,7-tetrahydro-5-methylimidazo [4,5,1- jk] [1,4] benzodiazepin-2 (1H)-one (TIBO) derivatives. J Med Chem 34: 746-51, 1991.

163. Kulaga H, Folks TM, Rutledge R, Kindt TJ. Infection of rabbit T-cell and macrophage lines with human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4455-9, 1988.

164. Kwok S, Mack D, Mullis KB, et al. Identification of HIV viral sequences using in vitro enzymatic amplification and oligomer cleavage detection. J Virol 61: 1690-4, 1987.

165. Kwok S, Ehrlich G, Poiesz B, et al. Enzymatic amplification of HTLV-I viral sequences from peripheral blood mononuclear cells and infected tissues. Blood 72: 1117-23, 1988.

166. Lai PK, Donovan J, Takayama H, et al. Modification of human immunodeficiency viral replication by pine core extracts. AIDS Res Hum Retro 6: 205-17, 1990.

167. Lambert JS, Seidlin M, Reichman RC, et al. 2',3'- Dideoxyinosine (ddI) in patients with the acquired immunodeficiency syndrome or AIDS-related complex. A phase I trial. N Engl J Med 322: 1333-40, 1990.

168. Land S, Treloar G, McPhee D, et al. Decreased in vitro susceptibility to zidovudine of HIV isolates obtained from patients with AIDS. J Infect Dis 161: 326-9, 1990.

169. Larder BA, Kemp SD. Multiple mutations in HIV-1 reverse transcriptase confer high-level resistance to zidovudine (AZT). Science 246: 1155-8, 1989.

170. Larder BA, Darby G, Richman DD. HIV with reduced sensitivity to zidovudine (AZT) isolated during prolonged therapy. Science 243: 1731-4, 1989.

171. Laspia MF, Rice AP and Mathews MB. HIV-1 Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. Cell 59: 283-92, 1989.

172. Lee-Huang S, Huang PL, Nara PL, et al. MAP 30: A new inhibitor of HIV-1 infection and replication. FEBS Lett 272: 12-8, 1990.

173. Lever A, Gottlinger H, Haseltine W and Sodroski J. Identification of a sequence required for efficient packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA into virions. J Virol 63: 4085-87, 1989.

174. Levy JA, Hoffman AD, Kramer SM, et al. Isolation of lymphocytopathic retroviruses from San Francisco patients with AIDS. Science 225: 840-42, 1984.

175. Libermann TA and Baltimore D. Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kB transcription factor. Mol Cell Biol 10: 2327-34, 1990.

176. Lifson JD, Hwang KM, Nara PL, et al. Synthetic CD4 peptide derivatives that inhibit HIV infection and cytopathicity. Science 241: 712-6, 1988.

177. Lightfoote MM, Coligan JE, Folks TM, et al. Structural characterization of reverse transcriptase and endonuclease polypeptides of the acquired immunodeficiency syndrome retrovirus. J Virol 60: 771-5, 1986.

178. Lin TS, Guo JY, Schinazi RF, et al. Synthesis and anti- viral activity of various 3'-azido analogues of pyrimidine deoxyribonucleosides against human immunodeficiency virus (HIV-1, HTLV-III/LAV). J Med Chem 31: 336-40, 1988.

179. Lin TS, Chen MS, McLaren C, et al. Synthesis and antiviral acivity of various 3'-azido,3'-amino,2',3'-unsaturated, and 2',3'-dideoxy analogues of pyrimidine deoxyribonucleosides against retroviruses. J Med Chem 30: 440-4, 1987.

180. Loke SL, Stein CA, Zhang XH, et al. Characterization of oligonucleotide transport into living cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3474-78, 1989.

181. Lorentsen K, Hendrix C, Collins J, et al. Dextran sulfate is poorly absorbed after oral administration. Ann Int Med 111: 561-66, 1989.

182. Lu Y, Touzjian N, Stenzel M, et al. Identification of cis- acting repressive sequences within the negative regulatory element of human immunodeficiency virus type 1. J Virol 64: 5226-29, 1990.

183. Luciw PA, Cheng-Meyer C, and Levy JA. Mutational analysis of the human immunodeficiency virus: the orf-B region down- regulates viral replication. Proc Natl Acad Sci USA 84: 1434-38, 1987.

184. Lusso P, Ensoli B, Markham PD, et al. Productive dual infection of human CD4+ T lymphocytes by HIV-1 and HHV-6. Nature 337: 370-73, 1989.

185. Lusso P, DiMarzo Veronese F, Ensoli B, et al. Expanded HIV- 1 cellular tropism by phenotypic mixing with murine endogenous retroviruses. Science 247: 848-52, 1990.

186. Maden PJ, Dalgleish AG, McDougal JS, et al. The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. Cell 47: 333-48, 1986.

187. Malim MH, Tiley LS, McCarn DF, et al. HIV-1 structural gene expression requires binding of the Rev trans-activator to its RNA target sequence. Cell 60: 675-83, 1990.

188. Malim MH, Hauber J, Le S-Y, et al. The HIV-1 rev trans- activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. Nature 338: 254-57, 1989.

189. Malim MH and Cullen BR. HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. Cell 65: 241-48, 1991.

190. Malim MH, Bohnlein S, Hauber J and Cullen BR. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator—derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. Cell 58: 205-14, 1989.

191. Malim MH, Fenrick R, Ballard DW, et al. Functional characterization of a complex protein: DNA binding domain located within the HIV-1 LTR leader region. J Virol 63: 3213-19, 1989.

192. Marciniak RA, Garcia-Blanco MA and Sharp PA. Identification and characterization of a HeLa nuclear protein that specifically binds to the trans-activation-response (TAR) element of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 87: 3624-28, 1990.

193. Marciniak RA, Calnan BJ, Frankel AD and Sharp PA. HIV-1 Tat protein trans-activates transcription in vitro. Cell 63: 791-802, 1990.

194. Marquez VE, Tseng CKH, Driscoll JS, et al. 2',3'-Dideoxy- 2'-fluoro-adenosine, an acid-stable purine nucleoside active against human immunodeficiency virus (HIV). Biochem Pharmacol 36: 2719-22, 1987.

195. Marquez VE, Tseng CKH, Mitsouya H, et al. Acid-stable 2'- fluoro purine dideoxynucleosides as active agents against HIV. J Med Chem 33: 978-85, 1990.

196. Martin LS, McDougal JS and Loskosky SL. Disinfection and inactivation of the human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus. J Infect Dis 152: 400-3, 1985.

197. Marx PA, Munn RJ, Joy KI. Methods in laboratory investigation: computer evaluation of thin section electron microscopy predicts an envelope-associated icosadeltahedral capsid for human immunodeficiency virus. Lab Invest 58: 112-8, 1988.

198. Matsukura M, Zon G, Shinozuka K, et al. Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus in vitro by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev (art/trs) in chronically infected cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4244-48, 1989.

199. Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, et al. Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7706-10, 1987.

200. Matsuyama T, Hamamoto Y, Soma GI, et al. Cytocidal effect of tumor necrosis factor on cells chronically infected with human immunodeficiency virus (HIV): enhancement of HIV replication. J Virol 63: 2504-9, 1989.

201. McDougal JS, Kennedy MS, Sligh JM, et al. Binding of HTLV- III/LAV to T4+ T cells by a complex of the 110K viral protein and the T4 molecule. Science 247: 382-85, 1985.

202. McDougal JS, Cort SP, Kennedy MS, et al. Immunoassay for the detection and quantitation of infectious human retrovirus, lymphadenopathy virus (LAV). J Immunol Methods 76: 171-83, 1985.

203. McDougal JS, Martin LS, Cort SP, et al. Thermal inactivation of the acquired immunodeficiency virus, human T-lymphotropic virus-III/lymphadenopathy associated virus, with special reference to antihemophilic factor. J Clin Invest. 76: 875-77, 1985.

204. McGarth MS, Hwang KM, Caldwell S, et al. GLQ-223: An inhibitor of HIV replication in acutely and chronically infected cells of lymphocyte and mononuclear phagocyte lineage. Proc Natl Acad Sci USA 86: 2844-48, 1989.

205. McGrath MS, Santulli S, Gaston I. Effects of GLQ223TM on HIV replication in human monocytes/macrophages chronically infected in vitro with HIV. AIDS Res Hum Retro 6: 1039-43, 1990.

206. McLaren C, Ellis MN, Hunter GA. A colorimetric assay for the measurement of the sensitivity of herpes simplex viruses to antiviral agents. Antiviral Res 3: 223-34, 1983.

207. McNeely MC, Yarchoan R, Broder S, Lawley TJ. Dermatologic complications associated with administration of 2',3'- dideoxycytidine in patients with human immunodeficiency virus infection. J Am Acad Dermatol 21: 1213, 1989.

208. McQuade TJ, Tomasselli AG, Liu L, et al. A synthetic HIV-1 protease inhibitor with antiviral activity arrests HIV-like particle maturation. Science 247: 454-6, 1990.

209. Meek TD, Lambert DM, Dreyer GB, et al. Inhibition HIV-1 protease in infected T-lymphocytes by synthetic peptide analogues. Nature 343: 90-2, 1990.

210. Meek TD, Dayton BD, Metcalf BW, et al. Human immunodeficiency virus 1 protease expressed in Escherichia coli behaves as a dimeric aspartic protease. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1841-45, 1989.

211. Merigan TC, Skowron G, Bozzette SA, et al. The ddC Study Group of the AIDS Clinical

Trials Group: Circulating p24 antigen levels and responses to dideoxycytidine in human immunodeficiency virus (HIV) infections. Ann Intern Med 110: 189, 1989.

212. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, et al. Inhibition of HIV-1 replication by a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor. Science 250: 1411-13, 1990.

213. Meruelo D, Lavie G, and Lavie D. Therapeutic agents with dramatic antiretroviral activity and little toxicity at effective doses: aromatic polycyclic diones hypericin and pseudohypericin. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5230-34, 1988.

214. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, et al. Structure of complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate- based inhibitor at 2.3 Å resolution. Science 246: 1149-52, 1989.

215. Mitsuya H, Weinhold KJ, Furman FA, et al. 3'-Azido-3'- deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 82: 7096-100, 1985.

216. Mitsuya H, Popovic M, Yarchoan R, et al. Suramin protection of T cells in vitro against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III. Science 226: 172-4, 1984.

217. Mitsuya H, Looney DJ, Kuno S, et al. Dextran sulfate suppression of virus in the HIV family: inhibition of virion binding to CD4+ cells. Science 240: 646-49, 1988.

218. Mitsuya H, Jarrett RF, Matsukura M, et al. Long-term inhibitors of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus (human immunodeficiency virus) DNA synthesis and RNA expression in T cells protected by 2',3' dideoxynucleosides in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 84: 2033-7, 1987.

219. Mitsuya H and Broder S. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus (HTLV- III/ LAV) by 2',3'-dideoxynucleosides. Proc Natl Acad Sci USA 83: 1911-15, 1986.

220. Mitsuya H, Yarchoan R, Kageyama S, Broder S. Targeted therapy of human immunodeficiency virus-related disease. FASEB Journal 5: 2369-81, 1991.

221. Miyasaka T, Tanaka H, Baba M, et al. A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6- (phenylthio)-thymine. J Med Chem 32: 2507-9, 1989.

222. Mizukami T, Fuerst TR, Berger EA and Moss B. Binding region for human immunodeficiency virus (HIV) and epitopes for HIV- blocking monoclonal antibodies of the CD4 molecule defined by site-directed mutagenesis. Proc Natl Acad Sci USA 85: 9273-7, 1988.

223. Moelling K, Schulze T, Knoop MT, et al. In vitro inhibition of HIV-1 proteinase by cerulenin. FEBS 2: 373-77, 1990.

224. Mohan P, Singh R, Baba M. Anti HIV-1 and HIV-2 activity of naphthalenesulfonic acid derivatives. Inhibition of cytopathogenesis, giant cell formation, and reverse transcriptase activity. Biochem Pharmacology 4: 642-46, 1991.

225. Mohan P, Singh R, Wepsiec J, et al. Inhibition of HIV replication by

naphthalenemonosulfonic acid derivatives and a Bis naphthalenedisulfonic acid compound. Life Sciences 47: 993-99, 1990.

226. Montefiori DC, Robinson WE Jr, Mitchell WM. Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1. Proc Natl Acad Sci USA 85: 9248-52, 1988.

227. Morgan RA, Looney DJ, Muenchau DD, et al. Retroviral vectors expressing soluble CD4: A potential gene therapy for AIDS. AIDS Res Hum Retro 6: 183-191, 1990.

228. Mosca JD, Bednarik DP, Raj NBK, et al. Activation of human immunodeficiency virus by herpesvirus infection: identification of a region within the long terminal repeat that responds to a trans-acting factor encoded by herpes simplex virus 1. Proc Natl Acad Sci USA 84: 7408-12, 1987.

229. Moskovitz BL, the HPA-23 Cooperative Study Group. Clinical trial of tolerance of HPA-23 in patients with acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Antimicrob Agents Chemother 32: 1300-3, 1988.

230. Muesing M, Smith D, Labradilla C, et al. Nucleic acid structure and expression of the human AIDS retrovirus. Nature 313: 450-8, 1985.

231. Mullis KB, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol 155: 335-50, 1987.

232. Munn RJ, Marx PA, Yamamoto JK, Gardner MB. Ultrastructural comparison of the retroviruses associated with human and simian acquired immunodeficiency syndromes. Lab Invest 53: 194-9, 1985.

233. Murakawa GJ, Zaia JA, Spallone PA, et al. Laboratory methods: direct detection of HIV-1 RNA from AIDS and ARC patient samples. DNA 7: 287-95, 1988.

234. Nabel GJ, Rice SA, Knipe FM and Baltimore D. Alternative mechanisms for activation of human immunodeficiency virus enhancer in T cells. Science 239: 1299-302, 1988.

235. Nabel G, Baltimore D. An inducible transcription factor activates expression of human immunodeficiency virus in T cells. Nature 326: 711-13, 1987.

236. Naesens L, Balzarini J, Rosenberg I, et al. 9-(2- Phosphonyl-methoxyethyl)-2,6-diaminopurine (PMEDAP): a novel agent with anti-human immunodeficiency virus activity in vitro and potent anti-Moloney murine sarcoma virus activity in vivo. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 8: 1043-7, 1989.

237. Nakashima H, Tanabe A, Tochikura TS, et al. Rapid screening method with a cell multisizer for inhibitors of human immunodeficiency virus-induced cell fusion in vitro. J Clin Microbiol 26: 1229-32, 1988.

238. Nakashima H, Kido Y, Kobayashi N, et al. Purification and characterization of an avian myeloblastosis and human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor, sulfated polysaccharides extracted from sea algae. Antimicrob Agents Chemother 31: 1524-8, 1987.

239. Nelson JA, Wiley CA, Reynolds-Kohler C, et al. Human immunodeficiency virus

detected in bowel epithelium from patients with gastrointestinal symptoms. Lancet 1: 259-62, 1988.

240. Nelson M, Moyle G, Reddy J, et al. Toxicity of dideoxyinosine (ddI) in zidovudine intolerant patients. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg 203, Vol 2, Abstract #WB2111, 1991.

241. Neto CC, Steim JM, Sarin PS, et al. Lipid conjugates of antiretroviral agents II. Disodium palmityl phosphonoformate: anti-HIV activity, physical properties, and interaction with plasma proteins. Biochem Biophys Res Communications 171: 458-64, 1990.

242. Nicholson JKA, Cross GD, Callaway CS, et al. In vitro infection of human monocytes with human T lymphotropic virus type III/lymphadenopathy associated virus (HTLV-III/LAV). J Immunol 137: 329-39, 1986.

243. Niederman TMJ, Thielan BJ and Ratner L. Human immunodeficiency virus type 1 negative factor is a transcriptional silencer. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1128- 32, 1989.

244. Nonaka G, Nishioka I, Nishizawa M, et al. Anti-AIDS agents, 2: Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. J Nat Prod 53: 587-95, 1990.

245. Novak RM, Keyer KA, Kinghorn AD, et al. Antiviral activity of the plant compound Fagaronine chloride, a reverse transcriptase inhibitor in HIV-infected peripheral blood mononuclear cells and T cell lines. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg. 111, Vol. 2, Abstract # WA1076, 1991.

246. Olsen HS, Cochrane AW, Dillon PJ, et al. Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. Genes Dev 4: 1357-64, 1990.

247. Ono K, Nakane H, Fukushima M, et al. Differential inhibitory effects of various flavanoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. 190: 469-76, 1990.

248. Ostrove JM, Leonard J, Weck KE, et al. Activation of the human immunodeficiency virus by herpes simplex virus type 1. J Virol 61: 3726-32, 1987.

249. Pal R, Gallo RC, and Sarngadharan MG. Processing of the structural proteins of human immunodeficiency virus type 1 in the presence of monensin and cerulenin. Proc Natl Acad Sci USA 85: 9283-86, 1988.

250. Panganiban AT, Tenim HM. The retrovirus pol gene encodes a product required for DNA integration: identification of a retroviral int locus. Proc Natl Acad Sci USA 81: 7885-89, 1984.

251. Patarca R, Heath C, Goldenberg GJ, et al. Transcription directed by the HIV long terminal repeat in vitro. AIDS Res Hum Retroviruses 3: 41-55, 1987.

252. Paul DA, Falk LA, Kessler HA, et al. Correlation of serum HIV antigen and antibody with clinical status in HIV- infected patients. J Med Virol 22: 357-63, 1987.

253. Pauwels R, Balzarini J, Schols D, et al. Phosphonylmethoxyethyl purine derivatives, a new class of anti-human immunodeficiency virus agents. Antimicrob Agents Chemother 32: 1025-30, 1988.

254. Pauwels R, Andries K, Desmyter J, et al. Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. Nature 343: 470-74, 1990.

255. Pauza CD, Galindo JE and Richman DD. Reinfection results in accumulation of unintegrated viral DNA in cytopathic and persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of CEM cells. J Exp Med 172: 1035-42, 1990.

256. Pauza CD and Galindo J. Persistent human immunodeficiency virus type 1 infection of monoblastoid cells leads to accumulation of self-integrated viral DNA and to production of defective virions. J Virol 63: 3700-07, 1989.

257. Pederson NC, Ho EW, Brown ML, Yamamoto JK. Isolation of a T-lymphotropic virus from domestic cats with an immunodeficiency-like syndrome. Science 235: 790-3, 1987.

258. Perno CF, Yarchoan R, Cooney DA, et al. Replication of human immunodeficiency virus in monocytes. Granulocytes/macrophages colony-stimulating factor (GM-CSF) potentiates viral production yet enhances the antiviral effect mediated by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) and other dideoxynucleoside congeners of thymidine. J Exp Med 169: 933-51, 1989.

259. Perno CF, Yarchoan R, Cooney DA, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus (HIV-1/HTLV-III) replication in fresh and cultured human peripheral blood monocytes/ macrophages by azidothymidine and related 2',3'-dideoxynucleosides. J Exp Med 168: 1111-25, 1988.

260. Pialoux G, Youle M, Dupont B, et al. Pharmacokinetics of R82913 in patients with AIDS or AIDS-related complex. Lancet 338: 140-43, 1991.

261. Pizzo PA, Eddy J, Faloon J, et al. Effect of continuous intravenous infusion of zidovudine (AZT) in children with symptomatic HIV infection. N Engl J Med 319: 889-96, 1988.

262. Pizzo PA, Butler K, Balis F, et al. Dideoxycytidine alone and in an alternating schedule with zidovudine in children with symptomatic human immunodeficiency virus infection. J Pediatrics 117: 799-808, 1990.

263. Pluda JM, Yarchoan R, Jaffe ES, et al. Development of opportunistic non-Hodgkin's lymphoma in a cohort of patients with severe HIV infection on long-term antiretroviral therapy. Ann Int Med 113: 276-82, 1990.

264. Poli G, Orenstein JM, Kinter A, et al. Interferon-a but not AZT suppresses HIV expression in chronically infected cell lines. Science 244: 575-77, 1989.

265. Pomerantz RJ, Trono D, Feinberg MB and Baltimore D. Cells nonproductively infected with HIV-1 exhibit aberrant pattern of viral RNA expression: a molecular model for latency. Cell 61: 1271-76, 1990.

266. Popovic M, Sarangadharan MG, Read E, Gallo RC. Detection, isolation and continuous production of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and preAIDS. Science 224: 497-500, 1984.

267. Powderly WG, Klebert MK, Clifford DB. Ototoxicity associated with dideoxycytidine. Lancet 335: 1990 (letter).

268. Preston BD, Poiesz BJ, Loeb LA. Fidelity of HIV-1 reverse transcriptase. Science 242: 1168-71, 1988.

269. Price RW, Brew B, Sidtis J, et al. The brain in AIDS: central nervous system HIV-1 infection and AIDS dementia complex. Science 239: 586-92, 1988.

270. Querat G, Barban V, Sauze N, et al. Highly lytic and persistent lentiviruses naturally present in sheep with progressive pneumonia are genetically distinct. J Virol 52: 672-79, 1984.

271. Ratner L, Haseltine W, Patarca R, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus: HTLV-III. Nature 313: 277-84, 1985.

272. Ratner L, vander Heyden N, Dedara D. Inhibition of HIV and SIV infectivity by blockade of alpha-glucosidase activity. Virology 181: 180-92, 1991.

273. Renneisen K, Leserman L, Mathes E, et al. Inhibition of expression of human immunodeficiency virus-1 in vitro by antibody-targeted liposomes containing antisense RNA to the env region. J Biolog Chem 265: 16337-342, 1990.

274. Resnick L, Veren K, Salahuddin SZ, et al. Stability of inactivation of HTLV-III/LAV under clinical and laboratory environments. J Am Med Assoc 255: 1887-91, 1986.

275. Richardson NE, Brown NR, Hussey RE, et al. Binding site for human immunodeficiency virus coat protein gp120 is located in the NH2-terminal region of T4 (CD4) and requires the intact variable region like domain. Proc Natl Acad Sci USA 85: 6102-6, 1988.

276. Richman DD, Kornbluth RS, Carson DA. Failure of dideoxynucleosides to inhibit human immunodeficiency virus replication in cultured human macrophages. J Exp Med 166: 1144-9, 1987.

277. Richman DD, Fischl MA, Grieco MH, et al. The toxicity of azidothymidine (AZT) in the treatment of patients with AIDS and AIDS-related complex. A double-blind, placebo-controlled trial. N Engl J Med 317: 192-97, 1987.

278. Roberts JD, Bebenek K, Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science 242: 1171-73, 1988.

279. Roberts NA, Martin JA, Kinchington D, et al. Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. Science 248: 358-61, 1990.

280. Roberts JD, Bebenek K, and Kunkel TA. The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1. Science 242: 1171-73, 1988.

281. Rosen CA and Pavlakis GN. Tat and Rev: positive regulations of HIV gene expression. AIDS 4: 499-509, 1990.

282. Rosen CA, Terwilliger E, Dayton A, et al. Intragenic cis- acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2071-75, 1988.

283. Rosen CA, Sodroski JG and Haseltine WA. The location of cis-acting regulatory sequences in the human T cell lymphotropic virus type III (HTLV-III/LAV) long terminal repeat. Cell 41: 813-23, 1985.

284. Rosen CA, Sodroski JG, Goh WC, et al. Post-transcriptional regulation accounts for the trans-activation of the human T- lymphotropic virus type III. Nature 319: 555-59, 1986.

285. Rossman MG. Antiviral agents targeted to interact with viral capsid proteins and a possible application to human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 85: 4625-7, 1988.

286. Roth MJ, Schwartzberg PL, Goff SP. Structure of the termini of DNA intermediates in the integration of retroviral DNA: dependence on IN function and terminal DNA sequence. Cell 58: 47-54, 1989.

287. Rowe WP, Pugh WE, Hartley JW. Plaque assay techniques for murine leukemia viruses. Virology 42: 1136-9, 1970.

288. Roy S, Delling U, Chen CH, et al. A bulge structure in HIV- 1 TAR RNA is required for Tat binding and a Tat-mediated trans-activation. Genes Dev 4: 1365-73, 1990.

289. Ruprecht RM, O'Brien LG, Rossoni LD and Nusinoff-Lehrman S. Suppression of mouse viraemia and retroviral disease by 3'- azido-3'-deoxythymidine. Nature 323: 467-96, 1986.

290. Salahuddin SZ, Rose RM, Groopman JE, et al. Human T lymphotropic virus type III infection of human alveolar macrophages. Blood 68: 281-4, 1986.

291. Sanchez-Pescador R, Power MD, Ban PJ, et al. Nucleotide sequence and expression of an AIDS-associated retrovirus (ARV-2). Science 227: 484-92, 1985.

292. Sandstrom EG, Kaplan JC, Byington RE, et al. Inhibition of human T-cell lymphotropic virus type III in vitro by phosphonoformate. Lancet 1: 480-2, 1985.

293. Sarin PS, Agrawal S, Civeira MP, et al. Inhibition of acquired immunodeficiency syndrome by oligodeoxynucleoside methylphosphonates. Proc Natl Acad Sci USA 85: 7448-51, 1988.

294. Sarver N, Cantin EM, Chang PS, et al. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. Science 247: 1222- 25, 1990.

295. Sattentau OJ, Weiss RA. The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. Cell 52: 631-33, 1988.

296. Schinazi RF, Ahn MK. Selective in vitro inhibition of human immunodeficiency virus (HIV) replication by 3'-azido-2',3'- dideoxythymidine (CS-87). J Clin Biochem (Suppl) 11D: 74, 1987.

297. Schnittman SM, Psallidopoulos MC, Lane HC, et al. The reservoir for HIV-1 in human peripheral blood is a T cell that maintains expression of CD4. Science 245: 305-8, 1989.

298. Schols D, Pauwels R, Vanlangendenck F, et al. A highly reliable, sensitive, flow cytometric/fluorometric assay for the evaluation of the anti-HIV activity of antiviral compounds in MT-4 cells. J Immunol Methods 114: 27-32, 1988.

299. Schols D, Pauwels R, Desmyter J, DeClercq E. Dextran sulfate and other polyanionic anti-HIV compounds specifically interact with the viral gp120 glycoprotein expressed by T-cells persistently infected with HIV-1. Virology 175: 556-61, 1990.

300. Schols D, Baba M, Pauwels R, et al. Specific interaction of aurintricarboxylic acid with the human immunodeficiency virus/CD4 cell receptor. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3322- 26, 1989.

301. Schooley RT, Merigan TC, Gaut P, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial. Ann Int Med 112: 247-53, 1990.

302. Schwartz O, Henin Y, Marechal V, et al. A rapid and simple calorimetric test for the study of anti-HIV agents. AIDS Res Hum Retroviruses 4: 441-8, 1988.

303. Schwartz S, Felber BK, Fenyo EM, and Pavlakis GN. Env and Vpu proteins of human immunodeficiency virus type 1 are produced from multiple bicistronic mRNAs. J Virol 64: 5448- 56, 1990.

304. Selby M.J., Bain E.S., Lucin P.A. and Peterlin B.M. Structure, sequence and position of the stem-loop in tar determine transcriptional elongation by tat through the HIV-1 long terminal repeat. Genes Dev 3: 547-58, 1989.

305. Sezakiel G, Pawlita M, Kleinheinz A. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA transcribed in sense and antisense orientation from the 5'- leader/gag region. Biochem Biophys Communications 169: 643- 51, 1990.

306. Sham HL, Betebenner DA, Widebug NE, et al. Potent HIV-1 protease inhibitors with antiviral activities in vitro. Biochem Biophysic Res Communi 175: 914-919, 1991

307. Shaw GM, Harper ME, Hahn BH, et al. HTLV-III infection in brains of children and adults with AIDS encephalopathy. Science 227: 177-82, 1985.

308. Shimizu H, Tsuchie H, Yoshida K, et al. Inhibitory effect of novel 1-deoxynojirimycin derivatives on HIV-1 replication. AIDS 4: 975-9, 1990.

309. Shirasaka T, Murakami K, Ford H, Jr., et al. Lipophilic halogenated congeners of 2',3'j-dideoxypurine nucleosides active against human immunodeficiency virus in vitro. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9426-30, 1990.

310. Siddiqui A, Gaynor R, Srinivasan A, et al. trans-activation of viral enhancers including long terminal repeat of the human immunodeficiency virus by the hepatitis B virus X protein. Virology 169: 479-84, 1989.

311. Siekevitz M, Josephs SF, Dukovich M, et al. Activation of the HIV-1 LTR by T cell mitogens and the trans-activator protein of HTLV-1. Science 238: 1575-78, 1987.

312. Smith TJ, Kremer MJ and Luo M. The site of attachment in human rhinovirus 14 for antiviral agents that inhibit uncoating. Science 233: 1286-93, 1986.

313. Sodroski J, Goh WC, Rosen C, et al. A second post- transcriptional trans-activator gene required for HTLV-III replication. Nature 321: 412-17, 1986.

314. Spire B, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, and Chermann JC. Inactivation of

lymphadenopathy associated virus by chemical disinfectants. Lancet 2: 899-901, 1984.

315. Spire B, Dermont D, Barre-Sinoussi F and Montagnier L. Inactivation of lymphadenopathy-associated virus by heat, gamma rays and ultraviolet light. Lancet 1: 188-189, 1985.

316. St. Clair MH, Richards CA, Spector T, et al. 3'-Azido-3'- deoxythymidine triphosphate as an inhibitor and substrate of purified human immunodeficiency virus reverse transcriptase. Antimicrob Agents Chemother 31: 1972-7, 1987.

317. Staal FJT, Roederer M, Herzenberg LA and Herzenberg LA. Intracellular thiols regulate activation of nuclear factor kB and transcription of human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 87: 9943-47, 1990.

318. Stein CA, Pal R, DeVico AL, et al. Mode of action of 5'- linked cholesteryl phosphorothioate oligodeoxynucleotides in inhibiting syncytia formation and infection by HIV-1 and HIV-2 in vitro. Biochemistry 30: 2439-44, 1991.

319. Stein B, Gouda S, Lifson J, et al. pH-independent HIV entry into CD4-positive T cells via virus envelope fusion to the plasma membrane. Cell 49: 659-68, 1987.

320. Sterzycki RZ, Ghazzouli I, Brankovan V, et al. Synthesis and anti-HIV activity of several 2'-fluoro-containing pyrimidine nucleotides. J Med Chem 33: 2150-57, 1990.

321. Sullenger BA, Lee TC, Smith CA, et al. Expression of chimeric tRNA-antisense transcripts renders NIH3T3 cells highly resistant to Moloney murine leukemia virus replication. Mol Cell Biol 10: 6512-23, 1990.

322. Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE and Gilboa E. Overexpression of TAR sequences renders cells resistant to human immunodeficiency virus replication. Cell 63: 601-8, 1990.

323. Sundquist B, Oberg B. Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. J Gen Virol 45: 273-81, 1979.

324. Szebeni J, Peterfy M, Patel S, et al. Modulation of the anti-HIV activity of dideoxynucleoside drugs by dipyridamole: pertubation of nucleoside metabolism. VII International Conference on AIDS, Florence, Italy; pg. 101, Vol. 2, Abstract # WA1037, 1991.

325. Szebeni J, Wahl SM, Popovic M, et al. Dipyridamole potentiates the inhibition by 3'-azido-3'-deoxythymidine and other dideoxynucleosides of human immunodeficiency virus replication in monocyte-macrophages. Proc Natl Acad Sci USA 86: 3842-46, 1989.

326. Tachikura TS, Nakashima H, Tanabe A, et al. Human immunodeficiency virus (HIV)-induced cell fusion: quantification and its application for the simple and rapid screening of anti-HIV substances in vitro. Virology 164: 542-6, 1988.

327. Takahoshi I, Takama M, Ladhoff AM, Scholz D. Envelope structure model of human immunodeficiency virus type I. J Acq Immun Def Syndr 2: 136-40, 1989.

328. Takeuchi Y, Nagumo T, Hoshino H. Low fidelity of cell free DNA synthesis by reverse transcriptase of human immunodeficiency virus. J Virol 62: 3900-2, 1988.

329. Tan CT, Civil R, Mian AM, et al. Inhibition of the RNAse H activity of HIV reverse transcriptase by Azidothymidylate. Biochem 30: 4831-35, 1991.

330. Tateno M, Gonzalez-Scararo F, Levy JA. Human immunodeficiency virus can infect CD4 negative human fibroblastoid cells. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4287-90, 1989.

331. Temin HM, Mizutani S. RNA-directed DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. Nature 226: 1211-3, 1970.

332. Temin HM, Baltimore D. RNA-directed DNA synthesis and RNA tumor viruses. Adv Virus Res 17: 129-86, 1972.

333. Thormar, H, Sigurdardottir B. Growth of visna virus in primary tissue cultures from various animal species. Acta Pathol Microbiol Scand 55: 80-6, 1962.

334. Trono D, Feinberg MB and Baltimore D. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication. Cell 59: 113-20, 1989.

335. Tsubata H, Ringler DJ, Kannagi M, et al. CD8+ CD4- lymphocyte lines can harbor the AIDS virus in vitro. J Immunol 143: 858-63, 1989.

336. Twu JS, Rosen CA, Haseltine WA, et al. Identification of a region within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat that is essential for transactivation by the hepatitis B virus gene X. J Virol 63: 2857-60, 1989.

337. Twu JS, Chu K, Robinson WS. Hepatitis B virus X gene activates kB-like enhancer sequences in the long terminal repeat of human immunodeficiency virus 1. Proc Natl Acad Sci USA 86: 5168-72, 1989.

338. Ueno R and Kuno S. Dextran sulfate, a potent anti-HIV agent in vitro having synergism with zidovudine. Lancet 1: 1379- 80, 1987.

339. Van Aerschot A, Everaert D, Balzarini J, et al. Synthesis and anti-HIV evaluation of 2',3'-dideoxyribo-5- chloropyrimide analogues: Reduced toxicity of 5-chlorinated 2',3'-dideoxynucleosides. J Med Chem 33: 1833-39, 1990.

340. Varmus H, Swanstrom. Replication of retroviruses; in RNA Tumor Viruses: Molecular biology of tumor viruses. Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J (eds). Cold Spring Harbor Laboratories, 2nd edition, pp. 369-513.

341. Veronese FD, DeVico AL, Copeland TD, et al. Characterization of gp41 as the transmembrane protein coded by the HTLV-III/LAV envelope gene. Science 229: 1402-4, 1985.

342. Vince R, Hua M, Brownell J, et al. Potent and selective activity of a new carbocyclic nucleoside analog (carbovir: NSC 614846) against human immunodeficiency virus in vitro. Biochem Biophys Res Commun 156: 1046-53, 1988.

343. Vogt MW, Hartshorn KL, Furman PA, et al. Ribavirin antagonizes the effect of azidothymidine on HIV replication. Science 235: 1376-9, 1987.

344. Vogt PK. Fluorescence microscopic observations on the defectiveness of Rous sarcoma virus. Nat Cancer Inst Monogr 17: 523-41, 1964.

345. Volberding PA, Lagakos SW, Koch MA, et al. Zidovudine in asymptomatic human immunodeficiency virus infection. A controlled trial in persons with fewer than 500 CD4-positive cells per cubic millimeter. N Engl J Med 322: 941-49, 1990.

346. Wain-Hobsen S, Sonigo P, Danos O, et al. Nucleotide sequence of the AIDS virus, LAV. Cell 40: 9-17, 1985.

347. Walker BD, Kowalski M, Goh WC, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermin. Proc Natl Acad Sci USA 84: 8120-24, 1987.

348. Wang J, Yan Y, Garrett TPJ, et al. Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. Nature 348: 411-18, 1990.

349. Waqar MA, Evans MJ, Manley KF, et al. Effects of 2',3'- dideoxynucleosides on mammalian cells and viruses. J Cell Physiol 121: 402-8, 1984.

350. Watanabe M, Reimann KA, Delong PA, et al. Effect of recombinant soluble CD4 in rhesus monkeys infected with simian immunodeficiency virus of macaques. Nature 337: 267- 270, 1990.

351. Weeks KM, Ampe C, Schultz SC, et al. Fragments of the HIV-1 Tat protein specifically bind TAR RNA. Science 249: 1281- 85, 1990.

352. Wells KH, Poiesz BJ. Biology of retroviruses: Detection, molecular biology and treatment of retroviral infection. J Am Acad Dermatology 22: 1175-95, 1990.

353. Wells KH, Latino J, Gavalchin J and Poiesz BJ. Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone in vitro. Blood 78: 1882-90, 1991.

354. Wiley CA, Schrier RD, Nelson JA, et al. Cellular localization of human immunodeficiency virus infection within the brains of acquired immune deficiency syndrome patients. Proc Natl Acad Sci 83: 7089-93, 1986.

355. Wright CM, Felber BK, Paskalis H and Pavlakis GN. Expression and characterization of the trans-activator of HTLV-III/LAV virus. Science 234: 988-92, 1986.

356. Wu JC, Warren TC, Adams J, et al. A novel dipyridodiazepinone inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase acts through a nonsubstrate binding site. Biochemistry 30: 2022-26, 1991.

357. Wu KF, Garcia JA, Harrich D, et al. Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1. EMBO J 7: 2117-29, 1988.

358. Yarchoan R, Thomas RV, Pluda JM, et al. Phase I study of the administration of recombinant soluble CD4 (rCD4) by continuous infusion to patients with AIDS or ARC. Proceedings of Vth International Conference on AIDS, Montreal, Canada, p. 564, MCP 137, 1989.

359. Yarchoan R, Perno CF, Thomas RV, et al. Phase I studies of 2',3'-dideoxycytidine in

severe human immunodeficiency virus infection as a single agent and alternating with zidovudine (AZT). Lancet 1: 76-81, 1988.

360. Yarchoan R, Mitsuya H, Thomas RV, et al. In vivo activity against HIV and favored toxicity profile of 2',3'- dideoxyinosine. Science 245: 412-15, 1989.

361. Yarchoan R, Klecker R, Weinhold KJ, et al. Administration of 3'-azido-3'-deoxythymidine, an inhibitor of HTLV-III/LAV replication, to patients with AIDS or AIDS-related complex. Lancet 1: 575-80, 1986.

362. Yarchoan R, Berg G, Brouwers P, et al. Response of human immunodeficiency virus-associated neurological disease to 3'-azido-3'-deoxythymidine. Lancet 1: 132-35, 1987.

363. Yarchoan R, Mitsuya H, Pluda J, et al. The National Cancer Institute phase I study of ddI administration in adults with AIDS or AIDS-related complex: Analysis of activity and toxicity profiles. Rev Infect Dis 12(suppl 5): 5522, 1990.

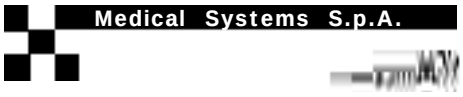
364. Zapp ML and Green MR. Sequence-specific RNA binding by the HIV-1 Rev protein. Nature 342: 714-16, 1989.

365. Zarling JM, Moran PA, Haffar O, et al. Inhibition of HIV replication by pokweed antiviral protein targeted to CD4+ cells by monoclonal antibodies. Nature 347: 92-95, 1990.

Indice

Istruzioni per gli autori..... pag. 2
Editoriale..... » 3
Introductione..... » 5
Caratteristiche fisiche dell' HIV..... » 6
Il Genoma dell'HIV..... » 7
Cellule infettabili dell' HIV ..... » 8
Ciclo vitale dell'HIV come guida ad un potenziale bersaglio
per una terapia antiretrovirale..... » 8
Individuazione ed isolamento dei retrovirus ..... » 11
Inibitori del ciclo di replicazione dell'HIV ..... » 15
Inibitori del virus libero ..... » 15
Inibitori della penetrazione del virus..... » 15
Penetrazione e liberazione..... » 18
Trascrizione inversa..... » 19
Gli Analoghi dei Nucleosidi..... » 19
Integrazione del DNA provirale dell'HIV ..... » 27
Regolazione genetica dell'HIV ..... » 27
Arresto della trascrizione e/o traslazione: gli antisenso..... » 30
Proteasi virale ed i suoi inibitori ..... » 32
Glicosilazione e miristoilazione ..... » 33
Gemmazione e maturazione..... » 36
Miscellania di composti antivirali ..... » 37
Associazioni di farmaci ..... » 39
Conclusioni..... » 40
Bibliografia..... » 41
Indice ..... » 66

Collana Caleidoscopio - Ed. Italiana



1. **Rassu S.:** ***Principi generali di endocrinologia.*** **Gennaio '83**
2. **Rassu S.:** ***L'ipotalamo endocrino.*** **Giugno '83**
3. **Rassu S.:** ***L'ipofisi.*** **Dicembre '83**
4. **Alagna., Masala A.:** ***La prolattina.*** **Aprile '84**
5. **Rassu S.:** ***Il pancreas endocrino.*** **Giugno '84**
6. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza).*** **Luglio '84.**
7. **Rassu S.:** ***L'obesita'.*** **Settembre '84**
8. **Franceschetti F., Ferraretti A.P, Bolelli G.F., Bulletti C.:** ***Aspetti morfofunzionali dell'ovaio.*** **Novembre '84.**
9. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (1).*** **Dicembre '84.**
10. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima.*** **Gennaio'85.**
11. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda.*** **Febbraio '85.**
12. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima.*** **Aprile '85.**
13. **Nacamulli D, Girelli M.E, Zanatta G.P, Busnardo B.:** ***Il TSH.*** **Giugno '85.**
14. **Facchinetti F. e Petraglia F.:** ***La b-endorfina plasmatica e liquorale.*** **Agosto '85.**
15. **Baccini C.:** ***Le droghe d'abuso (1).*** **Ottobre '85.**
16. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda.*** **Dicembre '85.**
17. **Nuti R.:** ***Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale.*** **Febbraio '86**
18. **Cavallaro E.:** ***Ipnosi: una introduzione psicofisiologica.*** **Marzo '86.**
19. **Fanetti G.:** ***AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti.*** **Maggio '86.**
20. **Fiorini I., Nardini A.:** ***Toxoplasmosi, immunologia e clinica.*** **Luglio '86.**
21. **Limone P.:** ***Il feocromocitoma.*** **Settembre '86.**
22. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.:** ***Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici.*** **Novembre '86.**
23. **Bolcato A.:** ***Allergia.*** **Gennaio '87.**
24. **Kubasik N.P.:** ***Il dosaggio enzimoimmunologico ed fluoroimmunologico.*** **Febbraio '87.**
25. **Carani C.:** ***Patologie sessuali endocrino-metaboliche.*** **Marzo '87.**
26. **Sanna M., Carcassi R., Rassu S.:** ***Le banche dati in medicina.*** **Maggio '87.**
27. **Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.:** ***L'amenorrea.*** **Giugno '87.**

28. **Zilli A., Pagni E., Piazza M.:** ***Il paziente terminale.*** **Luglio '87.**
29. **Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.:** ***Patologie prostatiche.*** **Settembre '87.**
30. **Cingolani M.:** ***Manuale di ematologia e citologia ematologica.*** **Novembre '87.**
31. **Kubasik N.P.:** ***Ibridomi ed anticorpi monoclonali.*** **Gennaio '88.**

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: ***Diagnostica del carcinoma mammario.*** **Febbraio '88.**
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: ***Neuroendocrinologia dello stress.*** **Marzo '88.**
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: ***La fecondazione in vitro.*** **Maggio '88.**
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: ***Il gozzo nodulare.*** **Giugno '88.**
36. Baccini C.: ***Le droghe d'abuso (2).*** **Luglio '88.**
37. Piantino P., Pecchio F.: ***Markers tumorali in gastroenterologia.*** **Novembre '88.**
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: ***Le leucemie acute infantili.*** **Gennaio '89.**
39. Sommariva D., Branchi A.: ***Le dislipidemie.*** **Febbraio '89.**
40. Butturini U., Butturini A.: ***Aspetti medici delle radiazioni.*** **Marzo '89.**
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: ***Diagnostica delle neoplasie colo-rettali.*** **Aprile '89.**
42. Palleschi G.: ***Biosensori in Medicina.*** **Maggio '89.**
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: ***HTLV-I.*** **Giugno '89.**
44. Fanetti G.: ***Emostasi: fisiopatologia e diagnostica.*** **Luglio '89.**
45. Contu L., Arras M..: ***Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie.*** **Settembre '89.**
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: ***Immunologia dell'occhio.*** **Ottobre '89.**
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E. : ***Infezioni opportunistiche in corso di AIDS.*** **Gennaio '90.**
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P. : ***La coriogonadotropina umana.*** **Febbraio '90.**
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: ***L'immunologia del diabete mellito.*** **Marzo '90.**
50. Cappi F.: ***La trasfusione di sangue: terapia a rischio.*** **Aprile '90.**
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: ***I micobatteri.*** **Maggio '90.**
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: ***Anticorpi antinucleo.*** **Giugno '90.**
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: ***Le macchine in terapia intensiva.*** **Luglio '90.**
54. Goracci E., Goracci G.: ***Gli allergo-acari.*** **Agosto '90.**
55. Rizzetto M.: ***L'epatite non A non B (tipo C).*** **Settembre '90.**
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: ***Infezione da HIV-1:patogenesi ed allestimento di modelli animali.*** **Ottobre '90.**
57. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (I).*** **Gennaio '91.**
58. La Vecchia C. ***Epidemiologia e prevenzione del cancro (II).*** **Febbraio '91.**
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: ***Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti.*** **Marzo '91.**
60. Bedarida G., Lizioli A.: ***La neopterina nella pratica clinica.*** **Aprile '91.**
61. Romano L.: ***Valutazione dei kit immunochimici.*** **Maggio '91.**
62. Dondero F. e Lenzi A.: ***L'infertilità immunologica.*** **Giugno '91.**
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: ***Gli Oncogèni.*** **Luglio '91.**
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: ***Infezione-malattia da HIV in Africa.*** **Agosto '91.**
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: ***L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni.*** **Settembre '91.**
66. Gentilomi G.A.: ***Sonde genetiche in microbiologia.*** **Ottobre '91.**
67. Santini G.F. , Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: ***Le sonde di DNA e la virulenza batterica.*** **Gennaio '92.**
68. Zilli A., Biondi T.: ***Il piede diabetico.*** **Febbraio '92.**
69. Rizzetto M.: ***L'epatite Delta.*** **Marzo '92.**
70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: ***Gli screening neonatali.*** **Aprile '92.**
71. Tavani A., La Vecchia C.: ***Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari.*** **Luglio '92.**

72. Cordido F. , Peñalva A. , De la Cruz L. F. , Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita.* Agosto '92.
73. Contu L.., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I).* Settembre '92.
74. Ferrara S.:*Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti.* Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa.* Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin.* Marzo '93.
79. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II).* Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale.* Maggio '93.

Caleidoscopio

Rivista mensile di Medicina

anno 11, numero 80

user

data-star

A service of RadioSuisse

Direttore Responsabile
Sergio Rassu
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari
Tel.-Fax 079 270464

Responsabile Commerciale
Alessandra Pater

European Association of Science Editors

EASE

Consulenti di Redazione
Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Segretaria di Direzione
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti
Fina Grandeppieno
Giuseppe Gambetta

Editore

Medical Systems S.p.A.

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)
Tel. (010) 83401 Numero Verde 167 801005 (senza prefisso);
Telex 270310 Ideal I.
Telefax (010) 809737- 809070.

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio -Ed. Spagnola- Caleidoscopio letterario, Kaleidoscope - Engl. Ed.,- Pandora, Tribuna Biologica e Medica, The Medical Systems Voice, Journal of Preventive Medicine and Hygiene.

Stampa
ATA-Azienda Tipografi Associati
Via G. Torti, 32 C Rosso
16143 Genova - Tel. 010 503320

Registrazione Tribunale di Sassari n. 189 del 6/11/84
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989

Finito di stampare: Maggio 1993
Sped. in Abb. Post. gr. III/70%

Pubblicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Associata all'USPI
Unione Stampa Periodica Italiana

USPI

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano

SAGGIO FUORI COMMERCIO ESENTE IVA E BOLLA DI ACCOMPAGNAMENTO (Art. 4 - 3/8/6 DPR 627/78)