

El estudio de la interacción virus-hospedador como fuente de nuevas dianas en la infección por el VIH

José Alcamí. Luis Miguel Bedoya

Unidad de Inmunopatología del SIDA. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III

Correspondencia:

José Alcamí. Centro Nacional de Microbiología.

Instituto de Salud Carlos III. Carretera de Majadahonda a Pozuelo Km 2. 28224 Majadahonda.

Resumen

En los últimos 10 años se ha producido un progreso en el tratamiento de la infección por VIH que ha mejorado la supervivencia y calidad de vida de los pacientes seropositivos. Sin embargo, la erradicación del VIH sea imposible con las terapias actuales. Este hecho junto a la emergencia continua de resistencias frente a los fármacos disponibles hace que la búsqueda de nuevos antiretrovirales sea un proceso en continuo desarrollo. Hasta el momento los fármacos desarrollados se han dirigido frente a proteínas virales, la transcriptasa inversa, la proteasa y más recientemente la envuelta viral. Pero el hecho de que el VIH se aproveche de la maquinaria celular para su replicación y el descubrimiento y caracterización de factores celulares indispensables para permitir el ciclo del VIH ha permitido definir nuevas dianas celulares. Estas dianas abarcan un amplio espectro de moléculas que van desde proteínas de adhesión, receptores de entrada, factores celulares, y en general cualquier estructura o molécula celular implicadas en la replicación del virus y en los mecanismos de resistencia celular a la infección, como los sistemas APOBEC y Trim 5 alpha recientemente descritos.

En el tratamiento de la infección por el VIH se abre por tanto una nueva perspectiva en la que los factores celulares implicados en la replicación viral son una diana preferente y previsiblemente se desarrollarán en los próximos años una serie de "antiretrovirales de base celular".

Palabras clave: VIH. Tratamiento. Ciclo viral. Fármacos anti-VIH.

Summary

In the last ten years a progress in the HIV infection treatment has occurred leading to an improved life quality and survival of seropositive patients. However, HIV eradication is not possible with the actual therapies. This fact together with the continuous emergence of resistances against available drugs made the search of new antiretrovirals a continuous process in development. To date, available drugs have been targeted to viral proteins, reverse transcriptase, protease and, recently, viral envelope. The fact that HIV use the cellular machinery to replicate and the discovery and characterization of cellular factors essential for the HIV cycle has led to define new cellular targets. This targets include a great number of different molecules like adhesion proteins, entry receptors, cellular factors and, in general, any cell structure or molecule involved in virus replication and in cell resistance mechanisms to infection, like APOBEC and Trim 5 alpha systems recently described.

HIV infection treatment present now new perspectives in which cellular factors involved in viral replication are a preferred target rather than viral

ones, and it seems that, in the next years, "cellular based antiretroviral drugs" will be developed.

Key words: HIV. Treatment. Viral cycle. Anti-HIV drugs.

Introducción

Estructura de la partícula viral

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) forma partículas esféricas de un tamaño de 80-130 nm de diámetro. Su estructura está compuesta de una envoltura lipido-proteica procedente de la de la célula hospedadora en la que se anclan las glicoproteínas virales gp120 y gp41 y una nucleocápside central denominada *core* de estructura cónica truncada en cuyo interior se localiza el material genético y los enzimas necesarios para permitir las primeras fases del ciclo viral: transcriptasa inversa, integrasa y proteasa (Figura 1).

El genoma viral está constituido por dos moléculas de ARN monocatenario de polaridad positiva (ARN_{mc}+) de banda sencilla, poliadeniladas en su extremo 3' y con caperuza estructural (cap) en el extremo 5'. Contiene unas 9,2 kilobases (Kb), que comprenden las secuencias repetitivas terminales (LTR), tres genes estructurales característicos de los retrovirus (*gag*, *pol*, *env*) y seis genes reguladores (*tat*, *rev* y *nef*, *vif*, *vpr* y *vpu*) (Figura 2).

Ciclo biológico del VIH

El ciclo biológico del VIH es similar al del resto de los retrovirus y puede dividirse en dos fases: fase temprana, que acaba con la integración del ADN proviral en el genoma de la célula y fase tardía, que implica la transcripción del genoma viral y la generación de una progenie viral infectiva. De una forma más precisa podemos considerar los siguientes pasos o procesos en el ciclo replicativo del VIH: unión y captura de los viriones a proteínas y estructuras no específicas en la membrana celular, unión secuencial a los receptores virales, fusión de membranas, internalización del *core* viral, desencapsidación, transcripción inversa, transporte nuclear, integración, latencia, expresión temprana de genes reguladores, expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos, morfogénesis y salida de la partícula viral de la célula infectada mediante un proceso de gemación¹ (Figura 3).

Fase temprana

Entrada del VIH en la célula: Adsorción, fusión y desencapsidación

El primer fenómeno en el proceso de infección no es un mecanismo espe-

cífico de entrada sino de unión no específica a moléculas de membrana en tipos celulares que actúan como propagadoras de la infección. Algunas son inespecíficas y tienen una baja afinidad por el VIH como es el caso de estructuras de tipo aminoglicano que se han descrito en muchos tipos celulares como moléculas a las que se une el VIH.

Otros son más específicos y tienen una mayor importancia patogénica. Entre éstos se ha descrito la existencia en la superficie de células dendríticas de una serie de lectinas de tipo C denominadas DC-SIGN y L-SIGN que unen de forma inespecífica distintos virus incluido el VIH y el virus de la hepatitis C. No pueden considerarse receptores en el sentido propio ya que su interacción se produce a través de residuos de carbohidratos y no estructuras conformacionales y no tienen la especificidad que caracteriza a un receptor. Sin embargo, la unión del VIH a estas lectinas facilita e incrementa enormemente la infección de los linfocitos circundantes. Existe una alta afinidad del VIH por estas moléculas que hacen que las células dendríticas se encuentren literalmente cubiertas de partículas virales en la parte externa de su membrana. Estas moléculas tienen como función fisiológica el unir integrinas como ICAM-3 en la membrana de los linfocitos, probablemente como un mecanismo de adhesión que permite el reconocimiento por el receptor T de las moléculas HLA clase II ocupadas por antígenos extraños. Es en esta "sinapsis inmunológica" donde se producen los fenómenos de infección de los linfocitos CD4 que entran en contacto con las células dendríticas. Este fenómeno, también denominado de facilitación en trans de la infección reviste una enorme importancia para explicar la propagación del VIH y hace de los órganos linfoides y en particular de las células dendríticas el gran reservorio donde la infección se establece y se transmite a los linfocitos CD4.

La entrada del virus en la célula se produce mediante la interacción con dos tipos de receptores. Por una parte existe un receptor específico y común a todos los subtipos del VIH, la molécula CD4. Además para que se produzca la entrada del virus en la célula son necesarios otro tipo de receptores que actúan como correceptores, son los receptores de quimiocinas². A pesar de que in vitro muchos receptores de quimiocinas pertenecientes a la familia 7M han demostrado capacidad de actuar como correceptores del VIH, in vivo probablemente existen sólo dos receptores mayores, el CCR5 y el CXCR4. El CCR5 es el principal receptor de las cepas R5³. El CXCR4 es el principal receptor de las cepas X4⁴. Existe un tercer tipo de cepas de VIH-1 capaces de unirse tanto al receptor CXCR4 como al CCR5 son denominadas cepas de tropismo dual o R5X4⁵.

Una vez que tiene lugar la interacción entre la gp120 y la molécula de CD4 se produce una serie de cambios conformacionales inducidos por la interacción sucesiva con sus receptores. Esta unión reduce la entropía de la glicoproteína que se vuelve mucho más flexible, exponiendo regiones que interaccionan con los receptores de quimiocinas⁶ como el dominio N-terminal de la gp41. Esta región contiene el denominado péptido de fusión, una región altamente hidrofóbica que, una vez anclada en la membrana, provoca la fusión entre las membranas plasmática y la envoltura viral, permitiendo de esta manera la entrada del virus en la célula y su desencapsidación⁷.

Retrotranscripción

El proceso de síntesis de ADN a partir del ARN viral es realizado por el complejo enzimático de la transcriptasa inversa (TI). Es necesario activar la célula infectada para que la retrotranscripción se complete y esto podría depender de inducción de determinados factores de transcripción. La síntesis del ADN se realiza como en todos los retrovirus: la actividad ADN polimerasa ARN dependiente de la TI produce un hélice híbrida entre el ARN molde y el ADN- sintetizado. Este ARN molde se degrada por la actividad RNasa H de la TI. Posteriormente se procede a la síntesis de la cadena de ADN+ por la actividad ADN polimerasa ADN dependiente de la TI. La TI carece de actividad exonucleasa por lo que no es capaz de

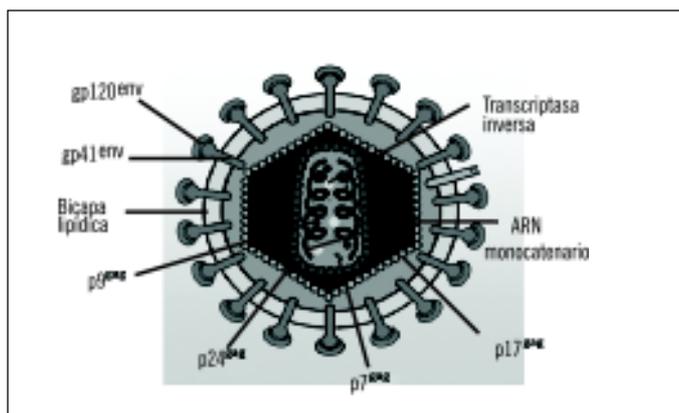


Figura 1. Diagrama esquemático del virión del VIH-1

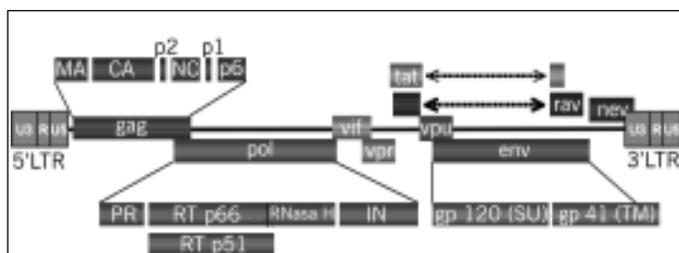


Figura 2. Estructura del genoma vírico

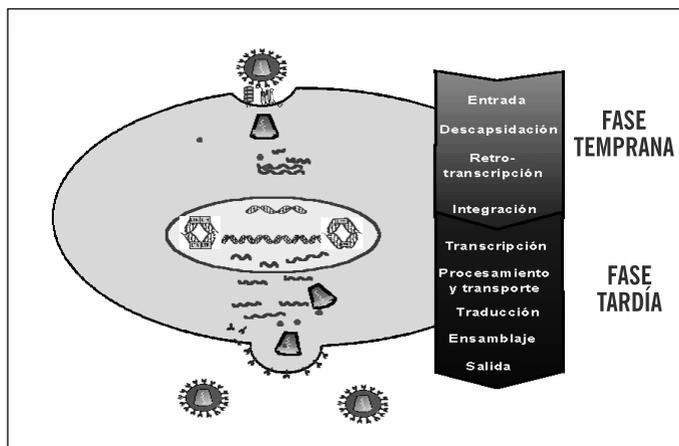


Figura 3. Fases del ciclo de replicación viral

reparar sus errores, siendo esta una de las causas por las que la variabilidad del VIH es tan elevada. Una vez sintetizado el ADN proviral, se acopla a una serie de factores celulares y virales (proteínas reguladoras) formando lo que se denomina el complejo de preintegración, que es trans-

portado al núcleo. En este transporte intervienen proteínas reguladoras, como la vpr viral, que parece existir en el propio virión⁸.

Integración

Una vez el complejo de integración está en el núcleo, se integra en el ADN celular por acción de la integrasa. La acción de la integrasa comprende varios pasos:

El primer paso de la integración es el *procesamiento* 3'. Este paso requiere la presencia del extremo 3' específico sintetizado por la TI. La integrasa corta dos nucleótidos de cada extremo 3' del ADN viral dejando libre Citosina-Adenina-OH (CA OH's) en estos extremos.

En un segundo paso, denominado *transferencia de la hebra*, la integrasa une los extremos 3' procesados a los extremos 5' del ADN celular en el sitio de integración. Estos extremos 5' son producidos por la integrasa, con cortes separados 5 pares de bases. La unión produce una estructura en forma de Y con los extremos libres 5' del ADN viral y los 3' del ADN celular.

La integrasa puede catalizar la escisión del ADN viral, denominado *desintegración*, o bien la *integración* puede progresar, lo que implica la reparación del ADN por la maquinaria celular. Esto produce que los cinco pares de bases sean duplicados en cada extremo y unidos al ADN viral, quedando de esta manera integrado.

Fase tardía

Latencia y reactivación. Expresión temprana de genes reguladores. Función de Tat.

Los genes reguladores de expresión temprana son tat, rev y nef. El genoma proviral integrado puede seguir un comportamiento variable.

- Puede permanecer latente durante un tiempo que varía desde semanas a años, con una media de 10 años, dependiendo de la persona infectada y de factores aun no bien conocidos⁹.
- Puede replicarse de forma controlada o experimentar una replicación masiva con el consiguiente efecto citopático sobre la célula infectada.

Los linfocitos CD4 albergan mayoritariamente el genoma viral en fase latente. La replicación comienza con la transcripción del genoma viral. La parte inicial de este proceso, denominada iniciación de la transcripción, depende de factores celulares y se produce en ausencia de proteínas virales. La transcripción comienza sobre el promotor constituido por la LTR situada en el extremo 5' del ADN proviral. Esta LTR está formada por las secuencias U3RU5, y dentro de ella se distinguen distintas regiones en función de las proteínas que actúan sobre ellas. En la región U3 se encuentran dos zonas, moduladora y central. La región central contiene la típica secuencia TATA de los promotores celulares, además de los sitios de unión del factor de transcripción SP1. La región moduladora contiene los sitios de unión a factores proteicos como el AP1 (activador proteico 1), el NF-AT (factor nuclear de células T activadas), y el NF-κB. Entre ellos, el principal factor celular implicado en el paso de la fase de latencia viral a la de reactivación es el último, el NF-κB¹⁰. Este regula la transcripción de múltiples genes celulares implicados en los procesos de reconocimiento y activación inmunitarias. Este factor no existe en forma activa en los linfocitos CD4 en estado de reposo celular y es inducido únicamente en los procesos de activación inmunológica. Esto explica el que la replicación del VIH dependa exclusivamente de la activación de los linfocitos infectados¹¹. Así, en estado de reposo celular se permite la latencia viral al carecer de los factores necesarios para la replicación del virus, y, por el contrario, la activación celular induce en el linfocito CD4 las proteínas de la familia NF-κB necesarias para iniciar la transcripción del genoma viral. Este fenómeno de reactivación es extraordinariamente agresivo, y se

estima, que tras la activación leucocitaria, en 2 horas se produce la síntesis de todas las proteínas virales en la célula, detectándose viriones viables en 4-6 horas¹².

En la región R está la zona TAR (tat activating RNA). El ARNm que transcribe tiene forma de horquilla y presenta los sitios de unión para varios factores celulares y para la proteína viral tat. Esta proteína se sintetiza en las primeras fases de la expresión génica viral y se localiza en el núcleo. Su función es la de aumentar la tasa de transcripción del genoma del VIH y permitir la síntesis de la totalidad del ARN viral. Tat actúa en cooperación con otros factores celulares y permite la elongación completa del ARNm del virus¹³.

Procesamiento y transporte. Expresión temprana de genes reguladores. Función de rev.

El ARNm viral se sintetiza en forma de un único transcrito que debe ser transportado al citosol y procesado en ARN de distintos tamaños. Ambos procesos, procesamiento y transporte, son realizados fundamentalmente por otra proteína viral, rev, que tiene una localización preferentemente nuclear. La expresión de rev se produce a partir del ARNm doblemente procesado (double splicing). Su unión a RRE provoca que el procesamiento y transporte de los ARNm a los que se ha unido se vea favorecido mediante la formación del complejo ARNm-Rev. RRE es una estructura esencial del ARNm viral ya que une a Rev facilitando el transporte y procesamiento de los ARNm no procesados y procesados (splicing). La importancia de este paso es doble. El ARNm no procesado es el que será el genoma viral en los viriones nacientes y el ARNm procesado será el que traducido daría lugar a la expresión de los genes tardíos, incluyendo gag, pol y env. Si la unión RRE-rev es inhibida se produciría una sobreexpresión del ARNm doblemente procesado, y las proteínas estructurales nunca serían sintetizadas. Aún más, la expresión de tat, rev y nef está sometida a una regulación positiva, y su sobreexpresión sería tóxica para la célula⁷.

Traducción. Expresión tardía de genes estructurales y enzimáticos

La expresión de los genes estructurales y enzimáticos se ha comentado con anterioridad en el apartado de genes y proteínas virales. Los diferentes procesamientos de los ARNm y los cambios de fase en la traducción de los ribosomas, darán lugar a las proteínas virales que ya podrán ser procesadas por las proteasas virales, a excepción de la gp160 que será procesada en gp120 y gp41 por proteasas celulares. En este proceso también participan otras proteínas virales, entre las que destacan vif y vpu. Vif es necesario para el correcto ensamblaje de las partículas virales y vpu para la gemación de estas partículas. Las proteínas virales son transportadas a las inmediaciones de la membrana celular, donde ya estarán insertadas las proteínas gp120 y gp41, que habían sido procesadas en el RE celular y el aparato de Golgi por proteasas celulares.

Especialmente importante es la función de vif como adaptador para la degradación de APOBEC en el proteasoma. Esto es importante porque APOBEC es uno de los enzimas celulares que producen cambios de bases en las secuencias del ADN, en concreto, APOBEC3, es el encargado de producir estos cambios en ADNs extraños, no propios, alterándolos e impidiendo su replicación¹⁴. Parece que para que se produzca su acción debe ser empaquetado en el virión realizando los cambios en la célula diana, no en la productora. En presencia de vif el empaquetamiento de APOBEC no se produce, ya que vif potencia su degradación en el proteasoma. Especialmente interesante es que casi todos los retrovirus presentan una proteína con la acción de vif, pero la interacción vif-APOBEC es específica. Este sería uno de los mecanismos mediante el cual se explica el que los virus son especie-específicos¹⁵.

Morfogénesis y maduración

La maduración final de los viriones y el ensamblaje correcto de las proteínas virales se produce en el momento final del ciclo infectivo, previo a la

gemación de los virus a través de la membrana celular, y permite generar una partícula viral madura. El correcto ensamblaje depende del procesamiento de las proteínas virales llevado a cabo por la proteasa viral. El procesamiento de los precursores gag-pol (p160) y gag (p55) tiene lugar justo antes o durante la gemación de la misma a través de la membrana celular. En la membrana están presentes las glicoproteínas gp120 y gp41, y el ARN monocatenario (ARNmc) interacciona con la p55 o proteína de la nucleocápsida. Por último el proceso de gemación se lleva consigo una parte de la membrana de la célula huésped, incluyendo proteínas celulares como las moléculas del complejo de histocompatibilidad⁷.

Las nuevas partículas virales pueden ahora desarrollar el ciclo infeccioso de nuevo. La replicación de los retrovirus es propensa a errores y esta caracterizada por un alto grado de mutaciones espontáneas. En promedio, la TI origina de 1 a 10 errores por genoma y ciclo de replicación. Estas mutaciones pueden dar lugar a la formación de especies virales no competentes para la replicación, pero también pueden irse acumulando mutaciones asociadas a la resistencia a fármacos, y por tanto, favorecer la presión selectiva a ciertos medicamentos antiretrovirales y la supresión incompleta de la replicación viral. La extensa replicación y tasas de mutación provoca una acumulación de muchos virus relacionados estrechamente, o variantes de virus dentro de una población de virus, denominadas "cuasiespecies". La presión selectiva sobre mutaciones preexistentes, puede no ser ejercida solamente, si no también por componentes del sistema inmune, como los anticuerpos neutralizantes¹⁶.

Dianas celulares en el ciclo del VIH

La inhibición del ciclo del VIH puede realizarse en los diferentes pasos del ciclo biológico viral (Figura 4).

Fase temprana

Viricidas

La primera diana sería el mismo virión antes de que se produzca interacción con la célula. Existen compuestos inhibidores denominados genéricamente viricidas que inactivan la partícula viral. Estos compuestos tienen una vía de administración tópica ya que normalmente presentan una toxicidad muy elevada, como por ejemplo el aldehído laúrico, caprílico y la etilnonilcetona, al igual que el laurilsulfato sódico. El dextran sulfato, nonoxinol 9 y el PRO 2000 han demostrado actividad como viricidas tópicos y actúan desestructurando la envuelta viral. Los escasos ensayos clínicos realizados han sido decepcionantes ya que debido a sus características químicas producen abrasión del epitelio vaginal y a pesar de su carácter viricida favorecen el paso de las partículas virales al destruir las barreras epiteliales¹⁷. Por este motivo se está abordando el desarrollo de una nueva generación de viricidas más específicos del VIH como aquellos que incorporan inhibidores no nucleósidos de la TI como la nevirapina o inhibidores de CCR5¹⁸ aunque este último abordaje probablemente no sea viable debido a su elevado precio.

Entrada del VIH en la célula

Las estatinas han demostrado recientemente su capacidad de inhibir la adhesión del virión a las células diana a través del bloqueo de la unión de la molécula de adhesión intercelular ICAM-1 a su receptor fisiológico LFA-1. Esta unión amplifica la infectividad viral, por lo que sería la primera diana del ciclo, ya que no ha habido aun contacto con los receptores¹⁹.

A pesar de que el receptor primario para la entrada del VIH en la célula es la molécula de CD4, el virus también puede unirse a heparanatos y lectinas

de tipo C como las moléculas DC-SIGN y L-SIGN que se expresan en algunas células dendríticas y macrófagos tisulares²⁰.

Posteriormente a la adhesión, la molécula de CD4 sería el primer objetivo, ya que es el primer receptor para la entrada del virus en la célula. La internalización de CD4 llevada a cabo por los esteres de forbol vía la activación de la protein quinasa C no sería un efecto deseable debido a su toxicidad. Sin embargo la ciclootriazadisulfonamida (CADA) internaliza CD4 pero a través de un proceso postranscripcional²¹ y la prostratina, un ester de forbol modificado de origen vegetal que carece de los efectos tumorigénicos de otros forbol esteres, internaliza CD4 y los coreceptores virales CCR5 y CXCR4 protegiendo a la célula de la infección²².

La interacción con la glicoproteína viral gp120 sería la otra cara de la moneda. Esta interacción se produce por compuestos polianiónicos como los polisacáridos sulfatados²³⁻²⁵, y albúminas cargadas negativamente²⁶, pero su actividad es muy inespecífica y, de hecho, podríamos encuadrarlos dentro del grupo de los viricidas. Se ha desarrollado compuestos más prometedores como el PRO-542, anticuerpo recombinante formado por CD4 soluble y una inmunoglobulina G diseñado para neutralizar las partículas virales²⁷ y la cianovirina N, proteína aislada de la cianobacteria *Nostoc ellipsosporum*, cuya afinidad por gp120 bloquea la unión a CD4 e incluso disocia gp120 de las células diana²⁸.

La interferencia con los correceptores, principalmente CXCR4 y CCR5, sería otro de los mecanismos de inhibición de la entrada. A pesar de que no se conoce totalmente la función de ambos receptores existen inhibidores de los dos. La inhibición de estos correceptores supondría el bloqueo de la entrada ya que la unión de gp120 al correceptor es necesaria para el posterior proceso de fusión.

Inhibidores de la unión a CXCR4 son los bicyclames, con el AMD3100 como el más potente de ellos y que actualmente está en fase de investigación clínica²⁹. Otro inhibidor de CXCR4 sería el recientemente caracterizado KRH-1636³⁰.

Entre los inhibidores de la unión a CCR5 el derivado de amonio cuaternario TAK-779 fue la primera molécula no peptídica con esta actividad³¹. Otra pequeña molécula con esta actividad es el SCH-C, que además ha servido como cabeza de serie para el desarrollo de nuevos fármacos con esta actividad³².

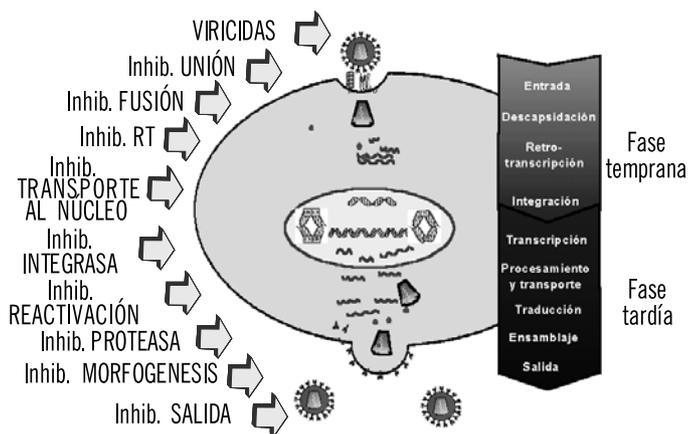


Figura 4. Dianas de inhibición en el ciclo de replicación del VIH

La seguridad de los tratamientos con los inhibidores de la unión a los correceptores sigue siendo incierta, ya que pueden intervenir en el correcto funcionamiento del sistema inmune. Ello exigiría ser cautelosos en su utilización a pesar de que los adultos homocigotos CCR5-D32 no expresan CCR5 en sus células y aparentan estar sanos con una función inmunológica normal³³.

El proceso de la fusión es el último paso para que se produzca la entrada del virus en la célula. El T-20³⁴ es un péptido que interfiere con este proceso, y ha sido hasta el momento la única molécula no inhibidora de las enzimas virales proteasa y TI aprobada para su uso en humanos. Su

actuación parece desarrollarse mediante la interacción con la región HR1 que está presente en cada unidad de la gp41³⁵.

Transcripción inversa

Esta clase de inhibidores fueron los primeros en utilizarse, siendo el más importante de ellos al AZT. El mecanismo de inhibición de la transcriptasa inversa (TI) se produce mediante la interacción con el sitio de unión de la enzima con su sustrato natural, es decir, el sitio de unión de los nucleótidos, mecanismo por el cual actúan los inhibidores de la TI análogos de nucleótidos (ITIANs) (Figura 5A), o bien, mediante la unión a un sitio alostérico que modifique la afinidad de la enzima por sus sustratos,

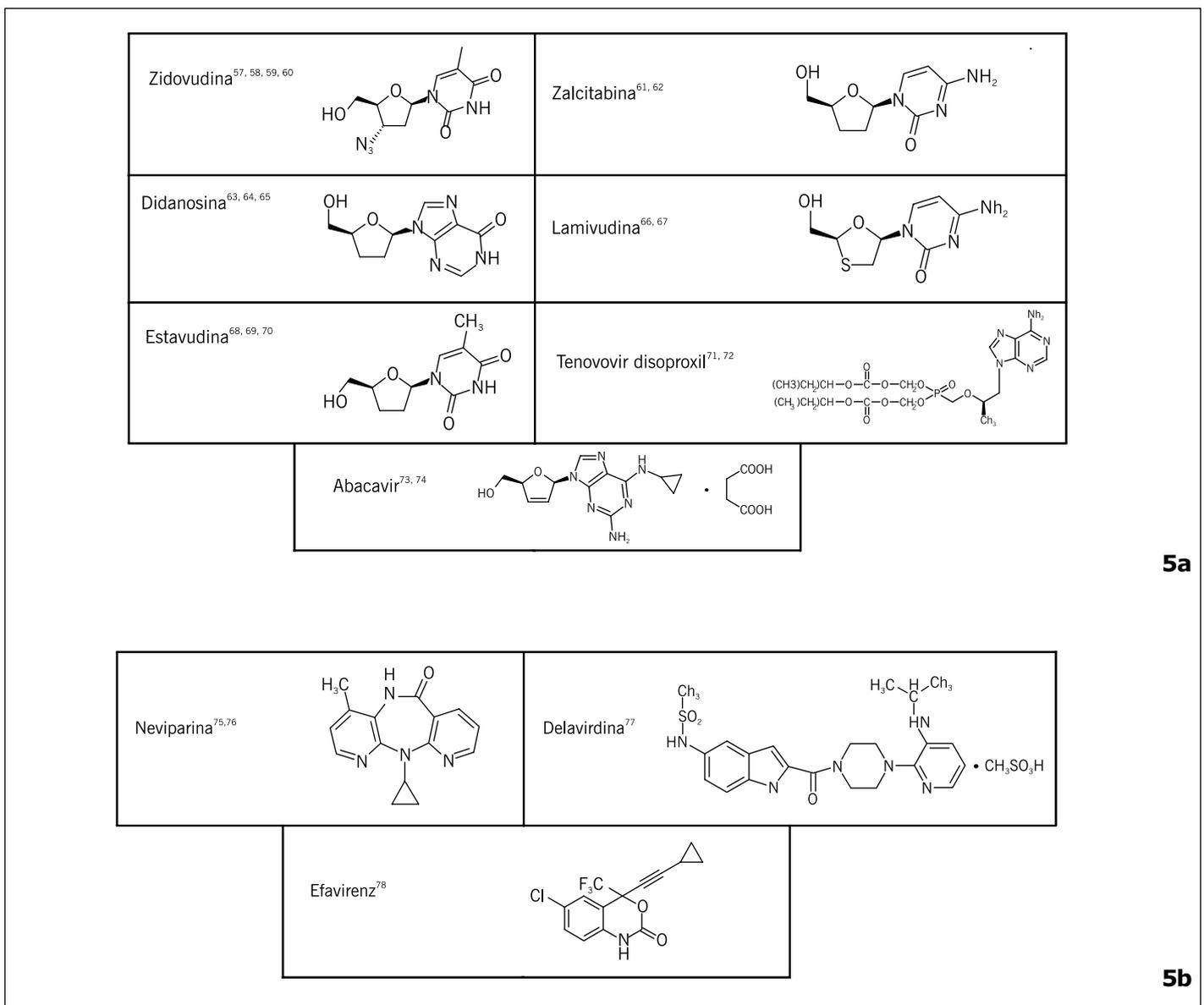


Figura 5. Inhibidores de la TI aprobados para su uso en humanos. Figura 5a. Análogos de nucleótidos. Figura 5b. No análogos de nucleótidos

mecanismo por el que actúan los inhibidores de la TI no análogos de nucleótidos (ITINANs) (Figura 5B).

Los análogos de nucleótidos presentan un mecanismo de acción semejante. Actúan como terminador de cadena en la reacción de la TI, seguido de fosforilación intracelular a la forma trifosfato, e incorporación del monofosfato al extremo 3' terminal de la cadena de ADN viral.

Existe una gran cantidad de fármacos inhibidores de la TI en fase de investigación, tanto análogos como no análogos de nucleótidos. Esta búsqueda es intensa ya que se producen una gran cantidad de mutaciones que confieren resistencias a la enzima viral.

Transporte al núcleo del complejo de preintegración

La formación y el transporte al núcleo del complejo de preintegración necesita de proteínas virales como Vpr o la proteína de la cápside viral (CA) para que se lleve a cabo, pero también requiere la cooperación de factores celulares. La ciclofilina A presente en la célula no sólo interviene en el proceso de entrada mediante la interacción con la proteína de la cápside, sino que también sería importante en la función de vpr³⁶. Inhibidores de la ciclofilina A son las ciclosporinas, que aunque su función inmunosupresora sería una desventaja se han modificado consiguiendo derivados no inmunosupresores como el SDZ NIM811^{37,38}.

En el caso del VIH y otros lentivirus, el ADN viral retrotranscrito puede integrarse en la célula aunque esta no este en fase de mitosis, ya que la proteína de la cápside sería disociada activamente en la interfase celular permitiendo la unión al complejo de pre-integración de los factores celulares requeridos y el transporte nuclear del mismo³⁹.

Integración

No existen aún inhibidores de la integración aprobados para su uso en humanos pero la integrasa es una de las enzimas virales y se presenta como una de las dianas más atractivas. Los dicetoácidos han demostrado su actividad como inhibidores de la unión covalente entre los extremos 3' del ADN viral y el ADN celular⁴⁰. Sin embargo es el S-1360 el inhibidor de la integración que primero ha entrado en fase de investigación clínica. Su mecanismo de acción parece semejante al de los dicetoácidos⁴¹. Otro tipo de inhibidores de la integración son los ácidos dicafeoilquinicos (ADCQ), que inhiben esta enzima a concentraciones submicromoleculares. Por modelación molecular de estos ligandos con el dominio catalítico de la integrasa, se observó que los inhibidores más potentes "rellenan una ranura" del sitio catalítico e interaccionan con la integrasa de un modo energéticamente favorable⁴². La unión al sitio catalítico es irreversible y la interacción se produce con los aminoácidos centrales⁴³.

La interacción de la integrasa del VIH con el factor de crecimiento LENS por una parte localiza la integrasa en el núcleo y por otra parte la dirige a la cromatina celular. LENS sería por tanto una diana celular potencial para los inhibidores de la integración⁴⁴.

Transcripción

La transcripción del ADN viral integrado es estimulado, entre otros, principalmente por dos factores, uno celular como NF- κ B y uno viral, la proteína tat.

La inhibición de NF- κ B sería demasiado inespecífica, ya que este factor celular está implicado en numerosos procesos celulares. Sin embargo la inhibición de tat sería mucho más específica. No existen inhibidores de tat de uso aprobado en humanos, pero sí muchos en diferentes fases de investigación. Entre ellos K37⁴⁵ o el EM2487 aislado del *Streptomyces* sp⁴⁶. Una vez se ha producido la transcripción, el ARN transcrito debe ser transportado al citoplasma, siendo rev uno de los factores que regulan este paso. En el caso de rev, parece ser más difícil encontrar inhibidores específicos que para tat. Sólo unos pocos compuestos han sido identifica-

dos con esta actividad. En los dos casos, inhibidores de tat y rev, la selectividad de sus inhibidores no ha sido suficiente para eliminar la toxicidad producida en las células huésped⁴⁷.

Proteasa

La proteasa es la otra enzima viral de la que disponemos actualmente inhibidores aprobados para su uso en humanos (Figura 6). Es la enzima encargada del procesamiento de los precursores gag y gag-pol en las proteínas estructurales y funcionales que formarán parte del virión. Es por tanto una atractiva diana terapéutica, ya que sin su función no se generaría progenie infectiva. Todos los inhibidores aprobados presentan una misma característica estructural o esqueleto: Un enlace hidroxietileno en lugar del enlace peptídico, actuando como peptidomiméticos para la proteasa del VIH.

El atazanavir ha sido el último de los inhibidores de la proteasa en aprobarse para uso clínico⁴⁸. Otros inhibidores de la proteasa bajo desarrollo clínico es TMC 126⁴⁹ y el TMC-114, del que ya se han comenzado estudios clínicos, y que ha demostrado actividad en cepas resistentes a otros inhibidores de la proteasa⁵⁰.

Morfogénesis y salida

Este proceso requiere el ensamblaje de la cápside viral en endosomas tardíos. Es un proceso muy complejo, en el que intervienen un gran número de proteínas celulares y virales. La proteína de la nucleocápsida, p6, juega un papel central en este proceso, reclutando los factores celulares requeridos para el paso de vesículas celulares a endosomas tardíos. El papel de estos factores celulares, como AIP1 o ESCRT-III, es pues importante para la gemación viral, y por tanto se presentan como nuevas dianas terapéuticas⁵¹.

Los inhibidores de las glucosidasas impedirían la formación de las glicoproteínas virales y por tanto su incorporación al virión. Entre ellos la castanospermina^{52,53}, 6,7-diepicastanospermina⁵⁴, la australina y la alexina⁵⁵ parecen funcionar de este modo. La megalomicina, sin embargo, parece inhibir el procesamiento de la gp160 en el aparato de Golgi⁵⁶.

Conclusiones

La infección por VIH es la infección vírica mejor conocida hasta el momento. Sin embargo, cada día se producen nuevos descubrimientos que nos hacen comprenderla un poco mejor. Estos nuevos conocimientos nos permiten abordar la lucha contra la infección desde nuevos frentes. En esta revisión se exponen algunas de las dianas más estudiadas, muchas

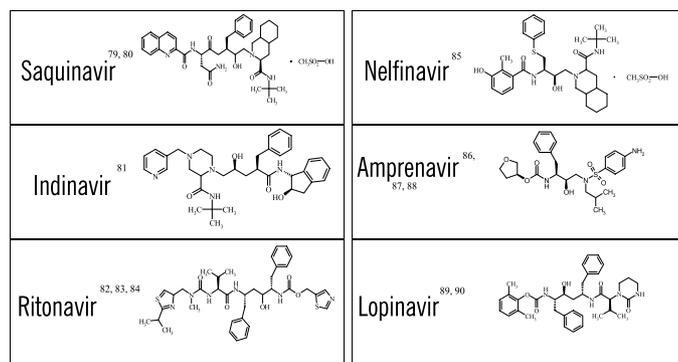


Figura 6. . Inhibidores de la proteasa del VIH

Tabla 1. Dianas celulares y virales en el ciclo del VIH.

Fase del ciclo viral	Dianas virales	Dianas celulares
	Envuelta del VIH	Receptores tipo lectina: ICAM-1 DC-SIGN CD4
Entrada	Glicoproteínas: gp120 gp41	Correceptores: CXCR4 CCR5 Ciclofilina A
Retrotranscripción	TI	
Transporte al núcleo del complejo de preintegración	vpr	
Integración	Integrasa	Factor de crecimiento LENS
Transcripción	NF-kB	tat
Transportes de los transcritos al citoplasma		rev
Proteasa	Proteasa viral vif	Proteasas celulares APOBEC
Morfogénesis y salida	p6	AIP1, ESCRT-III glucosidasas

de ellas con inhibidores, si no para uso clínico, si por lo menos en una fase de desarrollo avanzada o con un mecanismo de acción más novedoso. Las dianas terapéuticas más estudiadas han sido las enzimas virales, dos de ellas con inhibidores en el mercado, la TI y la proteasa. Sin embargo los factores celulares implicados en la infección por VIH son cada día mejor conocidos y se presentan como nuevas dianas para combatir la infección por VIH. En la Tabla 1 se resumen algunas de las dianas terapéuticas del ciclo de replicación del VIH.

Bibliografía

- Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New English Journal of Medicine* 1991;324:308-17.
- Weiss RA. HIV receptors and the pathogenesis of AIDS. *Science* 1996;272:1885-6.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995;270:1811-5.
- Oberlin E, Amara A, Bachelier F, et al. The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996;382:833-5.
- Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, et al. A Dual-Tropic Primary HIV-1 Isolate That Uses Fusin and the B-Chemokine Receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as Fusion Cofactors. *Cell* 1996;85:1149-58.
- Rizzuto CD, Wyatt R, Hernández-Ramos N, et al. Conserved HIV gp120 Glycoprotein Structure Involved in Chemokine Receptor Binding. *Science* 1998;280:1949-1953.
- Alcamí J, Rullas J, Bermejo M, et al. Inmunopatología del SIDA. Gatell JM, Clotet B, Podzamczar D, Miró JM, Mallolas J. Eds. Guía práctica del SIDA. Clínica, diagnóstico y tratamiento. 7ª Edición. 2002.
- Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, Chen IS. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 1990;61:213-22.
- Chun TW, Carruth L, Finzi D, et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature* 1997;387:183.
- Alcamí J, Lain de Lera T, Folgueira L, et al. Absolute dependence on kappa B responsive elements for initiation and Tat-mediated amplification of HIV transcription in blood CD4 T lymphocytes. *EMBO Journal* 1995;14:1552-60.
- Baeuerle PA, Baltimore D. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996;87:13-20.
- Hazan U, Thomas D, Alcamí J, et al. Stimulation of a human T-cell clone with anti-CD3 or tumor necrosis factor induces NF-kappa B translocation but not human immunodeficiency virus 1 enhancer-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1990;87:7861-5.
- Greene WC. The molecular biology of human immunodeficiency virus type 1 infection. *New England Journal of Medicine* 1991;324:308-17.
- Conticello SG, Harris RS, Neuberger MS. The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G. *Current Biology* 2003;13:2009-13.
- Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Davidson NO, Cho SJ, Malim MH. Cytidine deamination of retroviral DNA by diverse APOBEC proteins. *Current Biology* 2004;14:1392-6.
- Rubbert A, Ostrowski M. Patogénesis de la infección por VIH-1. *HIV Medicine* 2003-1. *Flying publisher* 2003.
- Dezzutti CS, James VN, Ramos A, Sullivan ST, Siddig A, Bush TJ, Grohskopf LA, Paxton L, Subbarao S, Hart CE. In vitro comparison of topical microbicides for prevention of human immunodeficiency virus type 1 transmission. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004;48:3834-44.
- Lederman MM, Veazey RS, Offord R, Mosier DE, Dufour J, Mefford M, Piatak M Jr, Lifson JD, Salkowitz JR, Rodriguez B, Blauvelt A, Hartley O. Prevention of vaginal SHIV transmission in rhesus macaques through inhibition of CCR5. *Science* 2004;306:485-7.
- Giguere JF, Tremblay MJ. Statin compounds reduce human immunodeficiency virus type 1 replication by preventing the interaction between virion-associated host intercellular adhesion molecule 1 and its natural cell surface ligand LFA-1. *Journal of Virology* 2004;78:12062-5.
- Pohlmann S, Baribaud F, Doms RW. DC-SIGN and DC-SIGNR: helping hands for HIV. *Trends in Immunology* 2001;22:643-6.
- Vermeire K, Zhang Y, Princen K, et al. CADA inhibits human immunodeficiency virus 7 replication by down-modulation of the cellular CD4 receptor. *Virology* 2002;302:342-53.
- Rullas J, Bermejo M, García-Pérez J, et al. Prostratin induces HIV activation and downregulates HIV receptors in peripheral blood lymphocytes. *Antiviral Therapy* 2004;9:545-54.
- Bruní T, Dürig J, Kraiselbrud EN, De Clercq E, Bruñi HD, Béress L. Antiviral and anticoagulant activity of polysaccharides from marine brown algae. Lazarovici P, Spira ME, Zlotkin E editors. *Biochemical aspects of marine pharmacology*. Fort Collins: Alaken Inc 1996;187-208.
- Hashimoto K, Kodama E, Mori S, et al. Antiviral activity of a sulphated polysaccharide extracted from the marine Pseudomonas and marine plant Dinoflagellata against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1996;7:189-96.
- De Clercq E. HIV-chemotherapy and prophylaxis: new drugs, leads and approaches. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2004;36:1800-22.
- Jansen RW, Molema G, Pauwels R, Schols D, De Clercq E, Meijer DK. Potent in vitro anti-human immunodeficiency virus-1 activity of modified human serum albumins. *Molecular Pharmacology* 1991;39:818-23.
- Jacobson JM, Lowy I, Fletcher CV, et al. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *Journal of Infectious Disease* 2000;182:326-9.
- Boyd MR, Gustafson KR, McMahon JB, et al. Discovery of cyanovirin-N, a novel human immunodeficiency virus-inactivating protein that binds viral surface envelope glycoprotein gp120: potential applications to microbicide development. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:1521-30.
- De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nature Reviews Drug Discovery* 2003;2:581-7.
- Ichiyama K, Yokoyama-Kumakura S, Tanaka Y, et al. A duodenally absorbable CXC chemokine receptor 4 antagonist, KRH-1636, exhibits a potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 2003;100:4185-190.
- Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, et al. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1999;96:5698-703.

32. Strizki JM, Xu S, Wagner NE, *et al.* SCH-C (SCH 351125), an orally bioavailable, small molecule antagonist of the chemokine receptor CCR5, is a potent inhibitor of HIV-1 infection in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 2001;98:12718-23.
33. Dean M, Carrington M, Winkler C, *et al.* Genetic restriction of HIV-1 infection and progression to AIDS by a deletion allele of the CKR5 structural gene. Hemophilia Growth and Development Study, Multicenter AIDS Cohort Study, Multicenter Hemophilia Cohort Study, San Francisco City Cohort, ALIVE Study. *Science* 273:1856-62. 1996.
34. Wild C, Greenwell T, Matthews T. A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Research Human Retroviruses* 1993;9:1051-3.
35. Pierson TC, Doms RW. HIV-1 entry inhibitors: new targets, novel therapies. *Immunology letters* 2003;85:113-8.
36. Zander K, Sherman MP, Tessmer U, *et al.* Cyclophilin A interacts with HIV-1 Vpr and is required for its functional expression. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:43202-13.
37. Rosenwirth B, Billich A, Datema R, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporine analog. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994;38:1763-72.
38. Billich A, Hammerschmid F, Peichl P, *et al.* Mode of action of SDZ NIM 811, a nonimmunosuppressive cyclosporin A analog with activity against human immunodeficiency virus (HIV) type 1: interference with HIV protein-cyclophilin A interactions. *Journal of Virology* 1995;69:2451-61.
39. Yamashita M, Emerman M. Capsid is a dominant determinant of retrovirus infectivity in nondividing cells. *Journal of Virology* 2004;78:5670-8.
40. Espeseth AS, Felock P, Wolfe A, *et al.* HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 2000;97:11244-9.
41. Yoshinaga T, Sato A, Fujishita T, Fujiwara T. S-1360: In vitro activity of a new HIV-1 integrase inhibitor in clinical development. *Proceedings of the 9th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* 2002;8:55.
42. Robinson WE Jr, Cordeiro M, Abdel-Malek S, *et al.* Dicafeoylquinic acid inhibitors of human immunodeficiency virus integrase: inhibition of the core catalytic domain of human immunodeficiency virus integrase. *Molecular Pharmacology* 1996;50:846-55.
43. Zhu K, Cordeiro ML, Atienza J, Robinson WE Jr, Chow SA. Irreversible inhibition of human immunodeficiency virus type 1 integrase by dicafeoylquinic acids. *Journal of Virology* 1999;73:3309-16.
44. Cherepanov P, Maertens G, Proost P, *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *Journal of Biological Chemistry* 2003;278:372-81.
45. Okamoto H, Cujec TP, Okamoto M, Peterlin BM, Baba M, Okamoto T. Inhibition of the RNA-dependent transactivation and replication of human immunodeficiency virus type 1 by a fluoroquinoline derivative K-37. *Virology* 2000;272:402-8.
46. Baba M, Okamoto M, Takeuchi H. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in acutely and chronically infected cells by EM2487, a novel substance produced by a *Streptomyces* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1999;43:2350-2355.
47. Baba M. Inhibitors of HIV-1 gene expression and transcription. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2004;4:871-82.
48. Haas DW, Zala C, Schrader S, *et al.*; Protocol A1424-009 Study Group. Therapy with atazanavir plus saquinavir in patients failing highly active antiretroviral therapy: a randomized comparative pilot trial. *AIDS* 2003;17:1339-49.
49. Yoshimura K, Kato R, Kavlick MF, *et al.* A potent human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitor, UIC-94003 (TMC-126), and selection of a novel (A28S) mutation in the protease active site. *Journal of Virology* 2002;76:1349-58.
50. Tie Y, Boross PI, Wang YF, *et al.* High resolution crystal structures of HIV-1 protease with a potent non-peptide inhibitor (UIC-94017) active against multi-drug-resistant clinical strains. *Journal of Molecular Biology* 2004;338:341-52.
51. Strack B, Calistri A, Craig S, Popova E, Gottlinger HG. AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* 2003;114:689-99.
52. Shimizu H, Tsuchie H, Yoshida K, *et al.* Inhibitory effect of novel 1-deoxynojirimycin derivatives on HIV-1 replication. *AIDS* 1990;4:975-9.
53. Walker BD, Kowalski M, Goh WC, *et al.* Inhibition of human immunodeficiency virus syncytium formation and virus replication by castanospermine. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1987;84:8120-4.
54. Molyneux RJ, Pan YT, Tropea JE, Benson M, Kaushal GP, Elbein AD. 6,7-Diepicastanospermine, a tetrahydroindolizidine alkaloid inhibitor of amyloglucosidase 1991;30:9981-7.
55. Tropea JE, Molyneux RJ, Kaushal GP, Pan YT, Mitchell M, Elbein AD. Australine, a pyrrolizidine alkaloid that inhibits amyloglucosidase and glycoprotein processing. *Biochemistry* 1989;28:2027-34.
56. San Jose E, Munoz-Fernandez MA, Alarcon B. Megalomicin inhibits HIV-1 replication and interferes with gp160 processing. *Virology* 1997;239:303-14.
57. Mitsuya H, Weinhiok KJ, Furman PA, *et al.* 3'-azido-3'-deoxythymidine (BWA509U): An antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1985;82:7096-100.
58. Herdewijn P, Balzarini J, De Clercq E, *et al.* 3'-substituted 2',3'-dideoxynucleoside analogues as potential anti-HIV (HTLV-III/LAV) agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 1987;30:1270-8.
59. Daluge SM, Purifoy DJ, Savina PM, *et al.* 5-Chloro-2',3'-dideoxy-3'-fluorouridine (935U83), a selective anti-human immunodeficiency virus agent with an improved metabolic and toxicological profile. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1994;38:1590-603.
60. Larder BA, Kemp SD, Harrigan PR. Potential mechanism for sustained antiretroviral efficacy of AZT-3TC combination therapy. *Science* 1995;269:696-9.
61. Mitsuya H, 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. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1986;83:1911-5.
62. Chu CK, Schinzari RF, Arnold BH, *et al.* Comparative activity of 2',3'-saturated and unsaturated pyrimidine and purine nucleosides against HIV-1 in peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical Pharmacology* 1988;37:3543-8.
63. Mitsuya H, 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. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1986;83:1911-5.
64. De Clercq E, Van Aerschot A, Herdewijn P, Baba M, Pauwels R, Balzarini J. Anti-HIV-1 activity of 2',4'-dideoxynucleoside analogues: structure-activity relationship. *Nucleosides and Nucleotides* 1989;8:659-671.
65. Schinazi RF, Sommadossi JP, Saalman V, *et al.* Activities of 3'-azido-3'-deoxythymidine nucleotide dimers in primary lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1990;34:1061-7.
66. Coates JA, Cammack N, Jenkinson HJ, *et al.* The separated enantiomers of 2'-deoxy-3'-thiacytidine (BCH 189) both inhibit human immunodeficiency virus replication in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1992;36:202-5.
67. Schinazi RF, Lloyd Jr RM, *et al.* Characterization of human immunodeficiency viruses resistant to oxathiolane-cytosine nucleosides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1993;37:875-81.
68. Lin TS, Schinazi RF, William H, Prusoff WH. Potent and selective activity of 3' - deoxythymidin-2'-ene (3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine) against human immunodeficiency virus. *Biochemical Pharmacology* 1987;36:2713-8.
69. Balzarini J, Aerschot AV, Herdewijn P, De Clercq E. 5-chloro-substituted derivatives of 2',3'-didehydro-2', 3'-dideoxyuridine, 3'-fluoro-2', 3'-dideoxyuridine and 3'-azido-2', 3'-dideoxyuridine as anti-HIV agents. *Biochemical Pharmacology* 1989;38:869-74.
70. Chu CK, Schinazi RF, Arnold BH, *et al.* Comparative activity of 2',3'-saturated and unsaturated pyrimidine and purine nucleosides against human immunodeficiency virus type 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Biochemical Pharmacology* 1988;37:3543-8.
71. Arimilli MN, Kim CU, Dougherty J, *et al.* Synthesis, in vitro biological evaluation and oral bioavailability of 9-R-(2-Phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA) prodrugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 1997;8:557-64.
72. Robbins BL, Srinivas RV, Kim C, Bischofberger N, Fridland A. Anti-Human Immunodeficiency Virus Activity and Cellular Metabolism of a Potential Prodrug of the Acyclic Nucleoside Phosphonate 9-R-(2-Phosphonomethoxypropyl) adenine (PMPA), Bis(isopropylloxymethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998;42:612-7.
73. Daluge SM, Good SS, Falletto MB, *et al.* 1592U89, a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:1082-93.

74. OTisdale M, Alnadaf T, Cousens D. Combination of mutations in human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase required for resistance to the carbocyclic nucleoside 1592U89. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:1094-8.
75. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, *et al.* Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* 1990;250:1411-13.
76. De Clercq E. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) for the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections: strategies to overcome drug resistance development. *Medicinal Research Reviews* 1996;16:125-57.
77. Romero DL, Morge RA, Genin MJ, *et al.* Bis(heteroaryl) piperazine (BHAP) reverse transcriptase inhibitors: structure-activity relationships of novel substituted indole analogues and the identification of 1-[(5-methanesulfonamido-1H-indol-2-yl)-carbonyl]-4-[3-[(1-methylethyl)amino]-pyridinyl]piperazine monomethanesulfonate (U-90152S), a second-generation clinical candidate. *Journal of Medicinal Chemistry* 1993;36:1505-8.
78. Young SD, Britcher SF, Tran LO, *et al.* L-743, 726 (DMP-266): a novel, highly potent nonnucleoside inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1995;39:2602-5.
79. Roberts NA, Martin JA, Kinchington D, *et al.* Rational design of peptide-based HIV proteinase inhibitors. *Science* 1990;248:358-61.
80. Craig JC, Duncan IB, Hockley D, Grief C, Roberts NA, Mills JS. Antiviral properties of Ro 31-8959, an inhibitor of human immunodeficiency virus (HIV) proteinase. *Antiviral Research* 1991;16:295-305.
81. Vacca JP, Dorsey BD, Schleif WA, *et al.* L-735,524: An Orally Bioavailable Human Immunodeficiency Virus Type 1 Protease Inhibitor. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1994;91:4096-100.
82. Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, *et al.* ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans. *Proceedings of the National Academy for Sciences USA* 1995;92:2484-8.
83. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, *et al.* Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Natural Medicine* 1996;2:760-6.
84. Markowitz M, Mo H, Kempf DJ, *et al.* Selection and analysis of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-538, a novel protease inhibitor. *Journal of Virology* 1995;69:701-6.
85. Patick AK, Mo H, Markowitz M, *et al.* Antiviral and resistance studies of AG1343, an orally bioavailable inhibitor of human immunodeficiency virus protease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1996;40:292-7.
86. St Clair MH, Millard J, Rooney J, *et al.* In vitro antiviral activity of 141W94 (VX-478) in combination with other antiretroviral agents. *Antiviral Research* 1996;29:53-56.
87. Baba M, Okamoto M, Makino M, *et al.* Potent and selective inhibition of human immunodeficiency virus type 1 transcription by piperazinylloxquinoline derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997;41:1250-5.
88. Livingston DJ, Pazhanisamy S, Porter DJ, Partaledis JA, Tung RD, Painter GR. Weak binding of VX-478 to human plasma proteins and implications for anti-human immunodeficiency virus therapy. *Journal of Infectious Diseases* 1995;172:1238-1245.
89. Sham HL, Kempf DJ, Molla A, *et al.* ABT-378, a highly potent inhibitor of the human immunodeficiency virus protease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1998;42:3218-24.
90. Carrillo A, Stewart KD, Sham HL, *et al.* In vitro selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants with increased resistance to ABT-378, a novel protease inhibitor. *Journal of Virology* 1998;72:7532-41.