

# El futuro en la infección por VIH: terapia génica y ARN de interferencia

Rafael Delgado<sup>a</sup> y Benito J. Regueiro<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Microbiología Molecular. Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre. Madrid. España. <sup>b</sup>Microbiología. Facultad de Medicina. Complejo Hospitalario Universitario (CHUS). Universidad de Santiago. España.

**La descripción del mecanismo de interferencia mediada por ARN (ARNi) ha despertado un enorme interés en todos los campos de la biomedicina. Una vía previamente desconocida en la que fragmentos de doble hebra de ARN de 21 a 23 residuos (ARNpi) median la degradación específica de secuencias de ARN mensajero (RRNm) se está convirtiendo en una de las herramientas más poderosas en la investigación en biología celular y genética. Existen grandes expectativas en el uso terapéutico del silenciamiento genético por medio de ARNi que se basan en su potencia, especificidad y fisiología. La comunicación de las primeras evidencias sobre la efectividad del ARNi como supresor de la replicación de virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha estimulado de nuevo el desarrollo de estrategias de terapia génica o molecular para el tratamiento de la infección por VIH.**

**Palabras clave:** VIH. Terapia génica. ARN de interferencia.

The Future in HIV infection: Gene Therapy and RNA interference

**The description of the mechanism of RNA interference (RNAi) has generated an enormous interest in the biomedical field. A previously unrecognized pathway in which small interfering 21 to 23 mer double-stranded RNA (siRNA) mediates sequence-specific degradation of mRNA is becoming one of the most useful techniques in cell biology and genetics research. Based on the potency, specificity and physiology of RNAi to silence gene expression there are great expectations on its use as a therapeutic tool. The first evidences of RNAi as suppressor of HIV replication have already been communicated and this has again stimulated the development of molecular or gene therapy approaches to HIV infection.**

**Key words:** HIV. Gene therapy. RNA interference.

Correspondencia: Dr. R. Delgado.  
Laboratorio de Microbiología Molecular.  
Servicio de Microbiología. Hospital 12 de Octubre.  
28041 Madrid. España.  
Correo electrónico: rdelgado.hdoc@salud.madrid.org

## Introducción

En los últimos años, la contribución de la quimioterapia a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha sido muy significativa en términos de supervivencia y mejora de la calidad de vida. Sin embargo, un tratamiento curativo para la infección sigue siendo un objetivo incierto, ya que no se consigue la eliminación completa de virus, que se mantiene latente y con capacidad de reactivación en un pequeño reservorio celular<sup>1,2</sup>. Todo esto hace que se haya estimulado la aplicación a este problema de otras alternativas terapéuticas como el trasplante de médula, la terapia celular, la inmunostimulación, la utilización de vacunas terapéuticas e intervenciones genéticas dentro de lo que se ha venido en llamar terapia génica<sup>3</sup>.

Si se tiene en cuenta que el VIH se integra dentro del genoma de la célula del hospedador se puede considerar el sida como una enfermedad genética adquirida<sup>4</sup>. Aunque se ha intentado la curación genética del provirus mediante procedimientos de escisión<sup>5</sup>, la mayor parte de los diseños de terapia génica anti-VIH se han dirigido a la introducción de un gen antiviral dentro de la célula que prevenga la infección o inhiba la expresión del virus. Este concepto fue originalmente bautizado por David Baltimore como "inmunización intracelular"<sup>6</sup> y constituye el objetivo último de la terapia génica. Esta disciplina, que nació fruto del extraordinario avance en genética y patología molecular, ha generado muchas expectativas desde sus inicios a principios de los noventa que no siempre se han visto acompañadas por resultados clínicos convincentes<sup>7</sup>. La realidad ha demostrado que, al igual que nuestra comprensión de la enfermedad producida por el VIH, el desarrollo de la terapia génica es mucho más complejo de lo que se preveía. La tarea de introducir y expresar genes en células somáticas necesita de un detallado conocimiento de las bases moleculares de la enfermedad y también de la mejora de nuestras herramientas para conseguir la transferencia de genes<sup>8</sup>. En relación con estos avances el campo de la terapia génica ha experimentado, como veremos a continuación, momentos de intensa euforia y decepción, a la vez que se han descrito formidables herramientas para el tratamiento molecular como el mecanismo de ARN de interferencia (ARNi).

## Estrategias moleculares anti-VIH

El VIH es un retrovirus complejo que aparte de los productos de los genes *gag*, *pol* y *env* de los retrovirus simples utiliza seis proteínas accesorias cuya función es esencial

para la replicación del virus y completar el ciclo infectivo. Algunos de estos productos, fundamentalmente *tat* y *rev*, junto a los receptores necesarios para la infección celular, han sido los candidatos más importantes contra los que se han dirigido la mayoría de las intervenciones moleculares.

### Proteína *tat*

La proteína *tat* es un potente transactivador del promotor LTR del VIH-1 y es esencial para la replicación del virus<sup>9</sup>. Se han utilizando dos mecanismos para interferir con *tat*: en el primero se expresa un ARN antisentido correspondiente a la región TAR, de forma que su unión impida la localización de *tat* en esta estructura y por lo tanto su función<sup>4</sup>. Otra estrategia de bloqueo de *tat* consiste en la expresión de grandes cantidades de fragmentos de ARN correspondientes a TAR, utilizándolos como señuelo para disminuir el número de moléculas efectivas de *tat* que puedan unirse al TAR retroviral<sup>10</sup>.

### Rev

La porción carboxiterminal de *rev* contiene una región rica en residuos de leucina que funciona como señal de exportación nuclear a través de la interacción con la maquinaria de transporte celular<sup>11</sup>. Se han construido diferentes transdominantes de Rev pero el más utilizado es el conocido como RevM10, que contiene una mutación precisamente en la región de interacción con proteínas celulares<sup>12</sup>. Este producto RevM10 se ha utilizando por varios grupos en ensayos clínicos en seres humanos<sup>13,14</sup> con resultados muy limitados<sup>15,16</sup>. RevM10 tiene algunas características muy atractivas desde el punto de vista de su utilización como antiviral: carece de toxicidad celular, es muy poco inmunogénico y el desarrollo de variantes resistentes, aunque recientemente se han logrado inducir *in vitro*<sup>17</sup>, parece más difícil que cuando se utiliza una diana enzimática.

### Receptores

Los aislamientos detectados en las primeras fases de la infección utilizan invariablemente la molécula CCR5 como correceptor<sup>18</sup>). La significación de este hecho cobró una mayor dimensión al descubrirse que algunos individuos homocigóticos para una delección de 32 pb en el gen de CCR5<sup>19,20</sup>, presente hasta en el 1% de la raza blanca<sup>21</sup>, eran resistentes a la infección por el VIH-1 y que incluso los individuos portadores de esta delección de manera heterocigótica, si bien podían infectarse, presentaban una evolución clínica más lenta<sup>22,23</sup>. Parece claro que la interferencia con la expresión de CCR5 y CXCR4 podría tener importantes beneficios terapéuticos. Es importante puntualizar que si bien la completa anulación de CCR5 es el

caso de los homocigóticos para  $\Delta 32$ CCR5, no parece asociarse con ninguna inmunodeficiencia, el bloqueo de CXCR4 podría ser más problemático, ya que, al menos en ratones, la anulación de CXCR4 tiene consecuencias graves sobre la hematopoyesis y el desarrollo cerebral, aunque su anulación en etapas posteriores al desarrollo podría ser mejor tolerada.

Una de las alternativas para bloquear la expresión de los correceptores en la membrana celular es la utilización de sus mismos ligandos naturales modificados de tal manera que puedan unirse intracelularmente a sus receptores y a la vez quedar bloqueados en el retículo endoplásmico (RE), limitando así la accesibilidad del virus para este correceptor. Estas moléculas que pueden inhibir el transporte de sus receptores hacia la membrana celular se conocen como "intracinas"<sup>24</sup>. Las intracinas, cuyo potencial antiviral se está evaluando, están basados en RANTES, MIP-1 $\alpha$  y MIP-1 $\beta$  para CCR5 (MIP-1 $\beta$  es completamente específico para CCR5 mientras que RANTES y MIP-1 $\alpha$  también pueden bloquear otros receptores) y SDF-1 para CXCR5.

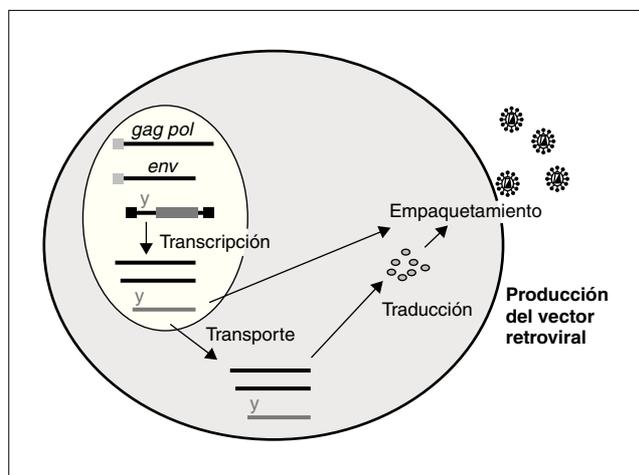
Aparte de las intracinas se pueden utilizar otras estrategias para bloquear la expresión de estos correceptores a un nivel diferente, por ejemplo mediante la utilización de ribozimas. Los ribozimas catalizan el corte específico de secuencias de ARN y debido a su eficiencia y a la simplicidad de su diseño se han convertido en interesantes herramientas para la supresión selectiva de expresión de genes<sup>25</sup>. Recientemente<sup>26</sup> se ha realizado el diseño y estudio funcional de una ribozima, *hammerhead*, RzR5-76, que hidroliza de manera específica el ARN mensajero (ARNm) de CCR5. Los resultados de este ribozima en un modelo de transfección *in vitro* indican que su actividad catalítica permite una importante reducción en la expresión del correceptor CCR5 en la superficie celular<sup>26</sup>. Frente al receptor CD4 se han utilizado igualmente diferentes estrategias, entre ellas la fabricación de quimeras de CD4 con señales de retención en RE<sup>27</sup>.

## Herramientas para la transferencia genética

Uno de los factores limitantes para convertir la terapia génica en una alternativa terapéutica realista es sin duda el desarrollo de vehículos genéticos o vectores seguros y efectivos, con los que se pueda conseguir la restauración de un defecto genético o, como es el caso del sida, transferir resistencia antiviral a las poblaciones celulares susceptibles. Hay diferentes posibilidades de introducir ADN dentro de una célula (tabla 1), pero en la actualidad son

TABLA 1. Características de los vectores virales y no virales empleados para transferencia genética

	Eficiencia	Limitación en el tamaño del gen	Integración	Seguridad	Infección de células en reposo
Adenovirus	++	No	No	++	Sí
Adenovirus asociados	++	Sí (4,5 kb)	+/-	++	Sí
Retrovirus	+++	Sí (7 kb)	Sí	++	No
Lentivirus	+++	Sí (7 kb)	Sí	+	Sí
ADN desnudo	+	No	No	+++	Sí
ADN en liposomas	+	No	No	+++	Sí



**Figura 1.** Célula empaquetadora para la producción de retrovirus recombinantes: los componentes estructurales, *gag-pol* y *env*, de la partícula retroviral así como el ARN genómico se introducen en la célula por medio de transfección de diferentes plásmidos. Todos estos componentes se empaquetan y generan una partícula infecciosa defectiva, carece de genes estructurales, que integrará el transgén en la célula diana.

los vectores basados en virus recombinantes, y sobre todo los retrovirus, los más utilizados.

### Retrovirus

Las propiedades que les hacen tan peligrosos desde el punto de vista patológico son precisamente las que les convierten en instrumentos muy atractivos como vectores en terapia génica: infectan las células muy eficazmente y una vez integrado su genoma, sobre todo si está desposeído de proteínas estructurales, su expresión es inmunológicamente muy silente. ¿Cómo se fabrica un retrovirus recombinante? El planteamiento inicial es sencillo, a partir de la estructura de un oncorretrovirus murino simple, el virus de la leucemia murina (MLV) (fig. 1), se eliminan la mayor parte de las secuencias *gag*, *pol* y *env*, que codifican sus productos estructurales, y se sustituyen por la secuencia del gen que queremos expresar. El resto de los componentes estructurales de la partícula viral se aportan en trans, dirigidos por un promotor heterólogo. De esta forma se pueden producir partículas retrovirales defectivas, con capacidad para infectar células e integrar su genoma, pero, al carecer este de los genes estructurales, sin la capacidad de producir un nuevo ciclo infeccioso.

### Vectores lentivirales

A pesar de la experiencia acumulada con los vectores basados en oncorretrovirus murinos, existe una importante limitación para su utilización con fines terapéuticos derivada de su incapacidad para transducir células que no se encuentren activamente dividiéndose, como células musculares, nerviosas o hematopoyéticas.

Esta es la principal razón para utilizar vectores basados en lentivirus que, debido a las propiedades carioplílicas de sus complejos preintegración, consiguen infectar con eficacia células en reposo<sup>28,29</sup>. Los primeros vectores lentivirales fueron los derivados del mismo VIH-1<sup>28,29</sup> y posteriormente se han utilizado otros lentivirus: VIH-2<sup>30</sup>, virus de la inmunodeficiencia del simio (SIV)<sup>31</sup> y virus de

la inmunodeficiencia en felinos (FIV)<sup>32</sup>. Evidentemente la utilización de vectores basados en agentes con capacidad patogénica debe realizarse bajo condicionantes de bioseguridad extrema que hagan imposible la recombinación y generación de variantes competentes<sup>33-35</sup>, por ejemplo el diseño de vectores lentivirales incluye en la actualidad un mínimo de secuencias originales, escasamente el 40%, e introduce mecanismos de seguridad como autoinactivación del promotor (LTR)<sup>33,36,37</sup>.

Una de las aplicaciones más atractivas de los vectores lentivirales es la transducción de precursores, células madre, con la mayor capacidad de autorrenovación y diferenciación posible. De esta manera se podría asegurar la expresión del transgén en células diferenciadas, por ejemplo linfocitos CD4+ resistentes al VIH en el caso del sida, que derivarían ilimitadamente de esta población de células madre. Los estudios en el modelo animal de reconstitución hematopoyética NOD/Scid, un ratón con inmunodeficiencia combinada grave y déficit de actividad *natural killer* (NK)<sup>38</sup>, son muy prometedores: se ha demostrado que la repoblación de todo el sistema hematopoyético humano a partir de precursores de sangre de cordón que han sido transducidos *ex vivo* con un marcador genético por medio de un vector lentiviral y que la expresión del marcador se mantiene durante meses<sup>39</sup>. Así mismo se ha podido demostrar transducción y expresión mantenida en otros tejidos con células quiescentes, cerebro<sup>28,29</sup> y retina<sup>40</sup> en otros modelos experimentales utilizando vectores lentivirales.

No obstante, la utilización de vectores basados en VIH-1 despierta una lógica prevención y es también comprensible que a pesar de los resultados conseguidos en los estudios preclínicos, las exigencias de bioseguridad retarden su aplicación en seres humanos. También es previsible que sean precisamente pacientes ya infectados con VIH-1 los primeros en los que se utilicen vectores lentivirales. Si bien el vector retroviral defectivo que expresa el marcador de resistencia puede de hecho ser rescatado por el virus natural, esto incluso podría tener el beneficio añadido de expandir el gen de resistencia<sup>33</sup>.

### Situación de los estudios de terapia génica en infección por VIH hasta el año 2000

Se han autorizado hasta esa fecha un número considerable de estudios clínicos que utilizan terapia génica para el tratamiento de la infección por VIH-1. Estos estudios han consistido en fases I y II en las que el objetivo fundamental ha sido confirmar la seguridad de los procedimientos y la ausencia de toxicidad de las intervenciones genéticas sobre células humanas. Los resultados de eficacia clínica que utilizan estos vectores retrovirales de primera generación han sido muy limitados. El estudio más significativo con resultados publicados hasta la fecha<sup>16</sup> ha permitido demostrar, en pacientes infectados con el VIH-1, una supervivencia más prolongada de los linfocitos CD4 que expresan el gen antiviral *RevM10* en comparación con aquellos que expresan un control no funcional. Sin embargo, esta ventaja selectiva de la población celular protegida no consiguió una reducción significativa de la carga viral, probablemente debido a que la cantidad de células CD4 transducidas, en torno al 0,1% de las circulantes, es demasiado pequeña para modular la expresión de la enfermedad.

## Problemas en la utilización de vectores retrovirales

En abril de 2000 se comunicó por el grupo de Alain Fischer y Marina Cavazzana-Calvo del Hospital Necker de París el primer estudio de terapia génica en el que se conseguía un éxito terapéutico inequívoco. El protocolo clínico se realizó sobre un grupo de 10 niños con una forma de inmunodeficiencia combinada grave ligada al cromosoma X (SCIDX1) por la ausencia de la subunidad  $\gamma$  de los receptores de IL-2, 4, 7, 9, 15 y 21. El tratamiento consistía en la reposición, mediante un vector retroviral del receptor deficitario (IL2Rgc) en células hematopoyéticas CD34 autólogas. Después de la reinfusión de las células modificadas, 9 de los 10 niños presentaron una rápida repoblación cuantitativa y funcional<sup>41</sup>. La curación por medio de terapia génica se había conseguido. Sin embargo, todo el extraordinario optimismo generado por estos resultados se transformó en decepción al comprobar que dos de los niños estaban desarrollando leucemia<sup>42</sup>. El estudio de la población de células leucémicas confirmó que en los 2 casos el retrovirus que expresaba el gen *IL2Rgc* se había integrado en las proximidades del promotor del oncogén linfocitario LMO2<sup>43</sup>. Estos graves efectos secundarios obligaron a una moratoria en la realización de ensayos con retrovirus en la mayor parte de los países. En el caso de la deficiencia de IL2Rg se puede haber dado una secuencia de desgraciadas circunstancias: la sobreexpresión de IL2Rg puede ser en sí misma oncogénica lo cual, unido al alto número de células modificadas, aumenta la probabilidad de inserción cerca de otro oncogén. Serían precisamente estas células las que tienen un mayor potencial de selección durante la repoblación y eventualmente podrían desarrollar leucemia<sup>44</sup>.

La integración de los retrovirus y el VIH en el genoma humano se consideraba aleatoria pero en la actualidad sabemos que se produce en zonas claramente preferentes (*hotspots*). La disponibilidad de la secuencia del genoma humano junto a una mayor capacidad de analizar regiones de inserción gracias a la amplificación y secuenciación robotizada ha permitido determinar que el VIH se inserta preferentemente en genes activos<sup>45</sup>. En el caso de los retrovirus murinos las zonas preferentes parecen ser regiones justamente en las proximidades de los promotores<sup>46</sup>, lo cual, indudablemente, introduce una mayor prevención en la utilización de estos vectores<sup>47</sup>.

## ARN de interferencia

La reciente descripción del mecanismo conocido como ARN de interferencia (ARNi) ha desencadenado un extraordinario interés y se ha convertido en un corto espacio de tiempo en una de las áreas más activas de investigación en biología. El fenómeno que tiene como protagonista al ARNi consiste en el silenciamiento específico de la expresión de determinados genes por fragmentos cortos de ARN de doble cadena (ARNdc). En 1998 Fire et al, utilizando como modelo experimental el nematodo *Caenorhabditis elegans*, confirmaron que un fenómeno curioso de silenciamiento postranscripcional, observado inicialmente en plantas<sup>48</sup>, estaba mediada por fragmentos de ARNdc complementarios al ARNm de los genes silenciados, y comprobaron que pequeñas cantidades de ARNdc pueden tener

efectos de inhibición muy significativos<sup>49</sup>. Tres años después, en 2001, Elbashir et al<sup>50,51</sup> demuestran que el protagonista fundamental del fenómeno de interferencia es un pequeño fragmento de ARNdc de 21 nucleótidos y presentan datos que confirman que estos fragmentos pequeños de ARN inhibidores (ARN de pequeña interferencia o ARNpi) son activos no sólo en células de plantas e invertebrados, sino también de vertebrados superiores y humanos. Este descubrimiento abre un campo totalmente nuevo en la comprensión de la regulación génica y al mismo tiempo permite vislumbrar la disponibilidad de una herramienta con un extraordinario potencial.

A diferencia del interferón (IFN), el ARNi es un proceso exquisitamente específico que actúa selectivamente sobre el ARN para el que es exactamente complementario. Adicionalmente, los fragmentos de ARNdc de pequeño tamaño (< 30 nucleótidos) mediadores de la interferencia parecen no inducir la maquinaria de activación del IFN.

El mecanismo general de la producción de interferencia mediada por ARN se describe en la figura 2. La presencia de ARNdc intracelular activa una endonucleasa específica de ARN de doble cadena denominada DICER. Esta enzima corta el ARNdc en fragmentos de 21-23 nucleótidos con extremos 3' libres que constituye el auténtico mediador del proceso de silenciamiento secuencia-específico<sup>52</sup>. A continuación los fragmentos de ARNpi forman un complejo activo con una serie de nucleasas y helicasas denominado RISC (*RNA-induced silencing complex*)<sup>53</sup>. Durante el ensamblaje de RISC, muy probablemente una sola de las hebras es capaz de desencadenar interferencia<sup>54</sup>. Utilizando esta hebra como guía, RISC se une al ARNm homólogo y cataliza el corte de la secuencia, por una ARNasa distinta de DICER, a una corta distancia del sitio de unión<sup>55</sup>. Los fragmentos de ARN son posteriormente degradados por exonucleasas celulares, completando así el proceso de silenciamiento. En algunos organismos, *C. elegans* y plantas, se ha propuesto la existencia de un ciclo de amplificación de silenciamiento, a partir de ARNpi secundario generado por DICER, sobre nuevo ARNdc sintetizado por una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP). Esta RdRP utiliza como molde el ARNm y como primer una de las hebras de los fragmentos de ARNpi<sup>56</sup>. Este mecanismo de amplificación se ha relacionado con la respuesta sistémica que exhibe el ARNi en plantas y *C. elegans* donde el silenciamiento se extiende a zonas lejanas e incluso se puede transmitir a la progenie<sup>49,57</sup>. Este efecto sistémico no se ha confirmado en vertebrados, probablemente por la ausencia de RdRP. El fenómeno de interferencia mediado por ARN es un proceso común a la mayor parte de las células eucarióticas (no existe en bacterias) y parece un antiguo mecanismo defensivo que antecede a la separación evolutiva entre animales y plantas. Sin embargo, el mecanismo básico de interferencia ha podido ir desarrollándose en distintos sentidos. En plantas cumple una función fundamentalmente defensiva frente a virus y tiroides, en vertebrados superiores y seres humanos parece tener una función más bien reguladora de la expresión génica. Esto se puso en evidencia con el descubrimiento de algunos genes cuyo producto no era una proteína, sino fragmentos cortos de ARN con interesantes propiedades reguladoras llamados microARN (miARN)<sup>58</sup>.

La maquinaria de silenciamiento parece estar conservada en mamíferos, como indican los experimentos de silen-

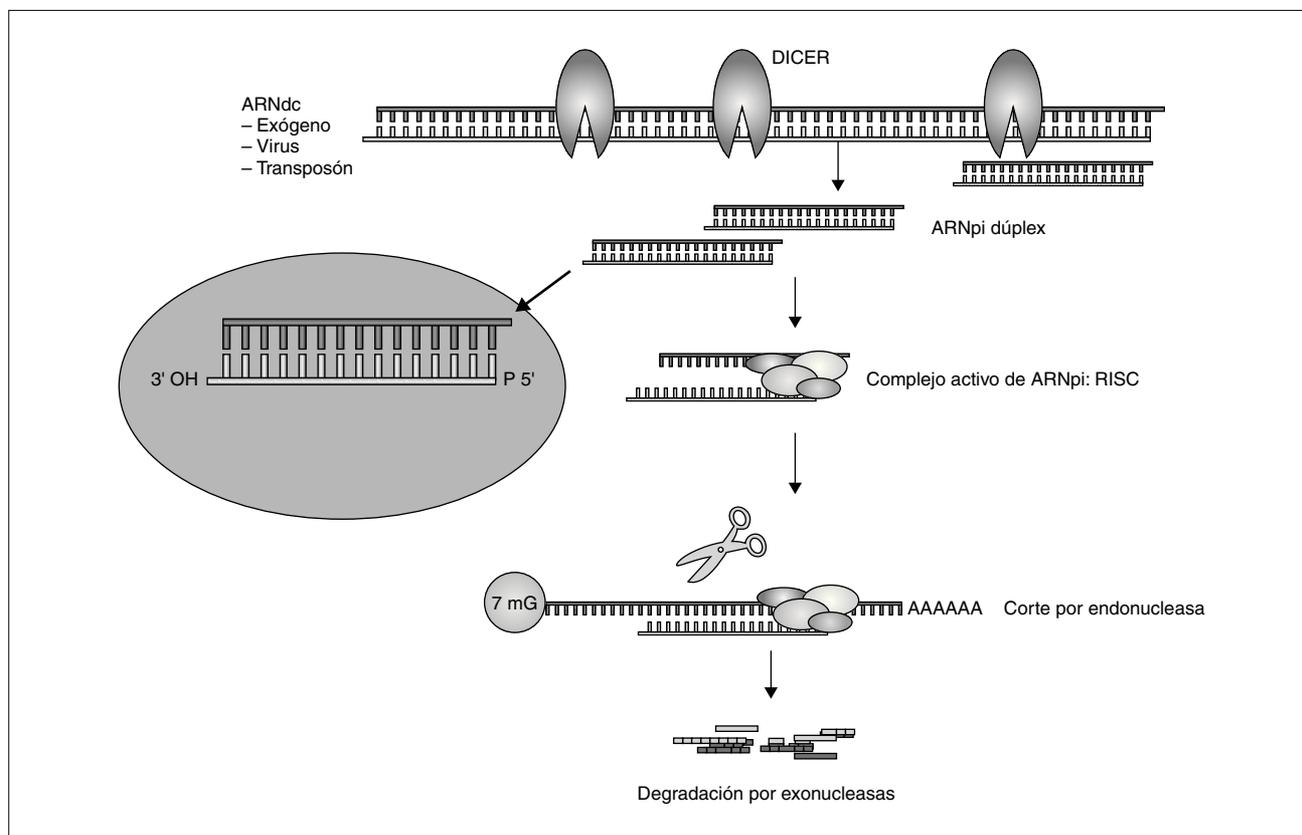


Figura 2. Mecanismo general de funcionamiento de ARNi.

ciamiento al introducir ARNpi sintético dentro de la célula; sin embargo, no tenemos pruebas que el fenómeno de interferencia tenga un importante papel antiviral en la infección natural, tal como sucede en plantas. Es posible que la inmunidad adaptativa basada en el reconocimiento de estructuras de proteínas haya podido suplantar al mecanismo de interferencia. Es así mismo llamativo que el ARNi funcione como sistema defensivo en plantas e invertebrados que precisamente carecen de inmunidad adaptativa.

### Aplicaciones del ARNi: ¿cómo se utiliza?

La forma más sencilla de introducir ARNi dentro de la célula es mediante un procedimiento relativamente sencillo de transfección utilizando ARN sintético. La mayor parte de los experimentos realizados hasta el momento han utilizado esta estrategia con células en cultivo, obteniendo resultados consistentes y reproducibles. Es también posible introducir dúplex de ARN sintético directamente en algunos organismos vivos como sucede en *C. elegans*<sup>59,60</sup>, en el que el fenómeno de interferencia se consigue por "ingestión", simplemente añadiendo el ARNpi en el medio de cultivo<sup>49</sup>. En vertebrados parece algo más complicado: utilizando grandes cantidades de ARN sintético es posible introducir ARNpi en ratones por vía intravenosa a través de un sistema de inyección hidrodinámica<sup>61,62</sup>. El ARNpi aplicado por este mecanismo en el ratón se localiza rápidamente dentro de células hepáticas y parece tener una sorprendente estabilidad de al menos 7-10 días<sup>62</sup>. Los inconvenientes de esta estrategia de administración directa son el elevado coste del ARN sintético (a

diferencia del ADN) y sobre todo la duración del silenciamiento que lógicamente es transitoria mientras se mantenga la presencia del dúplex de ARN intracelular. Una alternativa para conseguir más estabilidad es utilizar uno de los vectores genéticos, en forma de plásmidos, diseñados para expresar ARNdc. Por último, se ha demostrado que es posible generar vectores basados en retrovirus y lentivirus recombinantes que pueden integrar en la célula diana un casete que exprese ARNpi<sup>63-65</sup>. Este sistema, al integrar el provirus en el genoma celular, permite la expresión estable de ARNpi y sería por tanto uno de los más atractivos para aplicaciones terapéuticas.

### Aplicaciones terapéuticas del RNAi.

#### La prueba de concepto

Una de las aplicaciones más espectaculares con ARNi ha sido la realizada por el grupo de Judy Lieberman sobre un modelo de hepatitis fulminante en ratón inducida por Fas<sup>62</sup>. La administración de un anticuerpo agonista de Fas produce en ratón la muerte por apoptosis hepática masiva Fas-dependiente en 2-3 días. Utilizando ARNpi sintético y un sistema de inyección intravenosa hidrodinámico, que produce un incremento fugaz de la presión sanguínea<sup>66,67</sup> consiguieron proteger a los ratones a los que se inyectó ARNpi específico del ARN mensajero de Fas. Los ratones a los que se inyectó ARNpi inespecífico o modificaciones del ARNpi de Fas no fueron protegidos, demostrando así la especificidad del proceso. La prueba de concepto de que el ARNi puede curar parece establecida, sin embargo existen todavía importantes reservas sobre las can-

tidades de ARN sintético que serían necesarias y la posible aplicación del sistema hidrodinámico en humanos que exigiría la infusión intravenosa de más de un litro de fluido en pocos segundos<sup>66,67</sup>.

### El sistema inmunitario del genoma.

#### ARNi como antiviral

Con relación al posible papel del ARNi como antiviral en seres humanos existen todavía algunos puntos que deben ser mejor comprendidos para valorar el futuro de esta herramienta. ¿Se produce ARNpi durante una infección natural? aunque como hemos visto el ARNi en plantas se ha desarrollado evolutivamente, con toda probabilidad, como mecanismo defensivo frente a virus y transposones, todavía está por demostrar que en vertebrados el ARNi forma parte de la respuesta natural frente a la infección por virus<sup>68</sup>. Parece que la expresión de DICER puede ser muy baja en células diferenciadas y sólo en algunas células embrionarias se detectan elevadas concentraciones de DICER y se conservaría, por lo tanto, la función natural antiviral del ARNi<sup>69</sup>. Por otra parte, tampoco se han podido identificar genes virales cuya función sea evitar la acción del ARNi, en contraste con los numerosos ejemplos de virus que dedican muchos de sus genes a dificultar una adecuada respuesta de IFN, presentación de antígenos o respuesta inmunitaria adaptativa<sup>70-73</sup>. La maquinaria de silenciamiento está sin embargo conservada y la introducción de ARNi por diferentes técnicas se ha demostrado muy efectiva en diferentes modelos *in vitro* de infección por virus, entre los que se encuentran los virus de la hepatitis C<sup>74-77</sup> y B<sup>78</sup>, papiloma<sup>79</sup>, polio<sup>80</sup>, rotavirus<sup>81</sup> y otros virus ARN<sup>82</sup>.

Aunque el entusiasmo por la utilización de ARNi como antiviral es grande, existen algunos problemas que deben tenerse en cuenta. La extraordinaria especificidad del ARNi, que exige una casi perfecta homología entre los 21-23 nucleótidos que establecen la guía del silenciamiento, también puede ser un aspecto particularmente vulnerable a la hora de aplicarlo como herramienta antiviral, existe ya la observación realizada por Gitlin et al<sup>80</sup> trabajando con un modelo de ARNi para poliovirus en el que detectaron una variante que escapaba al mecanismo de interferencia. Esta variante presentaba una única sustitución en la zona central diana del ARNi.

#### El ARNi en la infección por VIH

La infección por VIH ha sido lógicamente uno de los primeros objetivos de aplicación de la tecnología de ARNi. No en vano es una de las infecciones en que se dispone de un conocimiento más preciso de los mecanismos moleculares y celulares implicados en el proceso. En el caso del VIH existen datos que indican que el ARN genómico puede ser inactivado por ARNi antes de la integración<sup>83</sup> e incluso se han conseguido evidenciar reducciones significativas del ARN de VIH antes de la primera hora postinfección en células transfectadas con ARNpi sintético frente a regiones de *vif* y *nef*<sup>84</sup>. La posibilidad de impedir la entrada del genoma de VIH en el núcleo de la célula es extraordinariamente importante y este aspecto debe ser ampliamente estudiado en modelos de infección más estables y utilizando células y aislamientos primarios.

Teóricamente, las mismas construcciones de ARNi activas frente al ARN genómico serían activas frente a los correspondientes ARNm que codifican las proteínas es-

tructurales y accesorias del VIH. Existen diferentes trabajos que confirman la utilidad del ARNi para bloquear el mensajero de proteínas accesorias: Rev<sup>85</sup>, Tat<sup>83</sup>, Vif<sup>84</sup> y estructurales, fundamentalmente CA<sup>86,87</sup>. Si como parece el ARNi es capaz de unirse y destruir tanto el ARN genómico del VIH, como el ARNm producido por el provirus integrado, nos encontraríamos con un método único con actividad frente a fases tempranas y tardías de la infección<sup>84,88</sup>.

Por último, se ha demostrado que es posible aplicar el ARNi para impedir la expresión de las moléculas receptoras del virus en la membrana celular. Utilizando ARNpi sintético se ha demostrado un efecto significativo sobre la infección al bloquear la expresión de CD4<sup>87</sup>, CXCR4 y CCR5<sup>86</sup>. La utilización de ARNi frente a productos celulares podría tener ventajas como sugiere un interesante trabajo en el que se estudió la estabilidad de ARNpi sintético en macrófagos humanos. El ARNpi de p24 tuvo una vida media de menos de 7 días en células no infectadas, frente a los más de 15 días de persistencia del dirigido frente a CCR5<sup>86</sup>, mientras que en células infectadas fue comparable, lo que sugiere que la presencia del ARN diana puede ser necesaria para la estabilidad del ARNpi.

La utilidad del ARNi parece confirmarse igualmente en modelos más fisiológicos utilizando células primarias<sup>86,89</sup> y modelos estables para la expresión mantenida de ARNpi<sup>86</sup>. En este último trabajo se ha utilizado un sistema de transducción mediante un lentivirus recombinante que expresa ARNpi anti-CCR5 en linfocitos primarios en los que se consiguió reducir la expresión de CCR5 por un factor de 10. Esto resultó en una disminución por un factor de 3-7 de la infección por VIH<sup>90</sup>. Igualmente se han comunicado resultados alentadores inhibiendo de forma estable la producción de tat y la expresión de CCR5 en macrófagos primarios mediante un vector lentiviral<sup>91</sup>.

Se conoce bien la extraordinaria capacidad del VIH para generar variabilidad y escapar de la presión selectiva inducida por la respuesta inmunitaria<sup>92,93</sup> y de los fármacos antirretrovirales<sup>94</sup>, incluyendo las diseñadas para antagonizar la función de los receptores<sup>95,96</sup>. No es sorprendente que se haya comunicado la aparición de mutantes de escape a la acción del ARNpi, en este caso por una variante de VIH que presentaba una mutación puntual en la zona diana del ARNi, 21 nucleótidos, correspondiente a la región de *tat*. Será por tanto necesario, para asegurar el éxito de la aplicación terapéutica del ARN de interferencia en la infección por VIH, utilizar la combinación de diferentes factores del virus y de la célula.

Nuestra capacidad para curar, o contribuir a la curación de una enfermedad como el sida con métodos moleculares depende por una parte de la disposición de una herramienta eficaz, y el ARNi parece serlo, pero también será necesario la puesta a punto de sistemas para hacer llegar el ARNi a las células susceptibles de forma eficaz y segura. Hoy somos más conscientes de las posibilidades y también de las limitaciones de un campo que debe avanzar apoyado en el conocimiento científico y en la consecuente búsqueda de soluciones para los problemas presentes.

#### Bibliografía

1. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD, Margolick JB, Chadwick K, Pierson T, et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med*. 1999;5:512-7.

2. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, Quinn TC, Chadwick K, Margolick JB, et al. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med.* 2003;9:727-8.
3. Morgan RA, Anderson WF. Human gene therapy. *Ann Rev Biochem.* 1993;62:191-217.
4. Morgan RA. Gene therapy for HIV infection. *Clin Exp Immunol.* 1997;107 Suppl 1:41-4.
5. Flowers CC, Woffendin C, Petryniak J, Yang S, Nabel GJ. Inhibition of recombinant human immunodeficiency virus type 1 replication by a site-specific recombinase. *J Virol.* 1997;71:2685-92.
6. Baltimore D. Intracellular immunization. *Nature.* 1988;335:395-6.
7. Leiden JM. Gene therapy-promise, pitfalls and prognosis. *N Engl J Med.* 1995;333:871-3.
8. Verma IM, Somia N. Gene therapy – promises, problems and prospects. *Nature.* 1997;389:239-42.
9. Marciniak RA, Calnan BJ, Frankel AD, Sharp PA. HIV-1 Tat protein trans-activates transcription *in vitro*. *Cell.* 1990;63:791-802.
10. Fraiser C, Irvine A, Wrighton C, Craig R, Dzierzak E. High level inhibition of HIV replication with combination RNA decoys expressed from an HIV-Tat inducible vector. *Gene Ther.* 1998;5:1665-76.
11. Robert-Guroff M, Popovic M, Gartner S, Markham P, Gallo RC, Reitz MS. Structure and Expression of tat-, rev-, and nef-Specific Transcripts of Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Infected Lymphocytes and Macrophages. *J Virol.* 1990;64:3391-8.
12. Malim MH, Freimuth WW, Liu J, Boyle TJ, Lyerly HK, Cullen BR, et al. Stable expression of transdominant Rev protein in human T cells inhibits human immunodeficiency virus replication. *J Exp Med.* 1992;176:1197-201.
13. Bevec D, Dobrovnik M, Hauber J, Bohnlein E. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells by retroviral-mediated gene transfer of a dominant-negative Rev trans-activator. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9870-4.
14. Haubrich R, McCutchan JA, Holdredge R, Heiner L, Merritt J, Merchant B. An open label, phase I/II clinical trial to evaluate the safety and biological activity of HIV-IT (V) (HIV-1IIIIBenv/rev retroviral vector) in HIV-1-infected subjects. *Hum Gene Ther.* 1995;6:941-55.
15. Woffendin C, Yang ZY, Ranga U, Xu L, Yang NS, Sheehy MJ, et al. Nonviral and viral delivery of a human immunodeficiency virus protective gene into primary human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:11581-5.
16. Woffendin C, Ranga U, Yang Z, Xu L, Nabel GJ. Expression of a protective gene prolongs survival of T cells in human immunodeficiency virus-infected patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:2889-94.
17. Hamm TE, Rekosh D, Hammaršköld M-L. Selection and characterization of human immunodeficiency virus type 1 mutants that are resistant to inhibition by the transdominant negative RevM10 protein. *J Virol.* 1999;73:5741-7.
18. Berger EA, Doms RW, Fenyo EM, Korber BT, Littman DR, Moore JP, et al. A new classification for HIV-1. *Nature.* 1998;391:240.
19. Dean M, Carrington M, Winkler C, Huttley GA, Smith MW, Allikmets R, 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.* 1996;273:1856-62.
20. Liu R, Paxton WA, Choe S, Ceradini D, Martin SR, Horuk R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell.* 1996;86:367-77.
21. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet.* 1997;16:100-3.
22. Smith O. HIV CCR5 resistance incomplete. *Nat Med.* 1997;3:372-3.
23. Biti R, Ffrench R, Young J, Bennetts B, Stewart G, Liang T. HIV-1 infection in an individual homozygous for the CCR5 deletion allele. *Nat Med.* 1997;3:252-3.
24. Chen JD, Bai X, Yang AG, Cong Y, Chen SY. Inactivation of HIV-1 chemokine co-receptor CXCR-4 by a novel intrakine strategy. *Nat Med.* 1997;3:1110-6.
25. Welch PJ, Barber JR, Wong-Staal F. Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA levels. *Curr Opin Biotechnol.* 1998;9:486-96.
26. González MA, Serrano F, Llorente M, Abad JL, García-Ortiz MJ, Bernad A. A hammerhead ribozyme targeted to the human chemokine receptor CCR5. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;251:592-6.
27. San José E, Muñoz-Fernández MA, Alarcón B. Retroviral vector-mediated expression in primary human T cells of an endoplasmic reticulum-retained CD4 chimera inhibits human immunodeficiency virus type-1 replication. *Hum Gene Ther.* 1998;9:1345-57.
28. Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, et al. *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science.* 1996;272:263-7.
29. Naldini L, Blomer U, Gage FH, Trono D, Verma IM. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:11382-8.
30. Corbeau P, Kraus G, Wong-Staal F. Transduction of human macrophages using a stable HIV-1/HIV-2-derived gene delivery system. *Gene Ther.* 1998;5:99-104.
31. White SM, Renda M, Nam NY, Klimatcheva E, Zhu Y, Fisk J, et al. Lentiviral vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol.* 1999;73:2832-40.
32. Poeschla EM, Wong-Staal F, Looney DJ. Efficient transduction of nondividing human cells by feline immunodeficiency virus lentiviral vectors. *Nat Med.* 1998;4:354-7.
33. Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, et al. Self-inactivating lentiviral vector for safe and efficient *in vivo* gene delivery. *J Virol.* 1998;72:9873-80.
34. Zufferey R, Nagy D, Mandel RJ, Naldini L, Trono D. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery *in vivo*. *Nat Biotechnol.* 1997;15:871-5.
35. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, et al. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 1998;72:8463-71.
36. Ailles LE, Naldini L, Galimi F, Verma IM. HIV-1-derived lentiviral vectors: Opportunities for the use of lentiviral vectors in human gene therapy. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;261:31-52.
37. Trono D. Lentiviral vectors: turning a deadly foe into a therapeutic agent. *Gene Ther.* 2000;7:20-3.
38. Bhatia M, Wang JCY, Kapp U, Bonnet D, Dick JE. Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:5320-5.
39. Miyoshi H, Smith KA, Mosier DE, Verma IM, Torbett BE. Transduction of human CD34+ cells that mediate long-term engraftment of NOD/SCID mice by HIV vectors. *Science.* 1999;283:682-6.
40. Miyoshi H, Takahashi M, Gage FH, Verma IM. Stable and efficient gene transfer into the retina using an HIV-based lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10319-23.
41. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, De Saint B, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science.* 2000;288:669-72.
42. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulfraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med.* 2003;348:255-6.
43. Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulfraat N, Leboulch P, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 2003;302:415-9.
44. Dave UP, Jenkins NA, Copeland NG. Gene therapy insertional mutagenesis insights. *Science.* 2004;303:333.
45. Schroder AR, Shinn P, Chen H, Berry C, Ecker JR, Bushman F. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell.* 2002;110:521-9.
46. Wu X, Li Y, Crise B, Burgess SM. Transcription Start Regions in the Human Genome Are Favored Targets for MLV Integration. *Science.* 2003;300:1749-51.
47. Cavazzana-Calvo M TAMF. The future of gene therapy. *Nature.* 2004;427:779-81.
48. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell.* 1990;2:279-89.
49. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391:806-11.
50. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411:494-8.
51. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 2001;15:188-200.
52. Zhang H, Kolb FA, Brondani V, Billy E, Filipowicz W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* 2002;21:5875-85.
53. Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* 2002;110:563-74.
54. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* 2003;115:199-208.
55. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 2000;101:25-33.
56. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, et al. On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell.* 2001;107:465-76.
57. Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet.* 1999;15:358-63.

58. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993; 75:843-54.
59. Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998;395:854.
60. Timmons L, Court DL, Fire A. Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 2001;263:103-12.
61. McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA. RNA interference in adult mice. *Nature*. 2002;418:38-9.
62. Song E, Lee SK, Wang J, Ince N, Ouyang N, Min J, et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med*. 2003;9: 347-51.
63. Wiznerowicz M, Trono D. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol*. 2003;77:8957.
64. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*. 2003;33:401-6.
65. Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, et al. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. *RNA*. 2003;9:493-501.
66. Liu D, Knapp JE. Hydrodynamics-based gene delivery. *Curr Opin Mol Ther*. 2001;3:192-7.
67. Zhang G, Budker V, Wolff JA. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. *Hum Gene Ther*. 1999;10:1735-7.
68. Gitlin L, Andino R. Nucleic acid-based immune system: the antiviral potential of mammalian RNA silencing. *J Virol*. 2003;77:7159-65.
69. Billy E, Brondani V, Zhang H, Muller U, Filipowicz W. Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:14428-33.
70. Nanche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *J Virol*. 2000;74: 7478-84.
71. Alcamí A, Smith GL. A soluble receptor for interleukin-1B encoded by vaccinia virus: A novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. *Cell*. 1992;71:153-67.
72. Hewitt EW. The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology*. 2003;110:163-9.
73. Evans DT, Desrosiers RC. Immune evasion strategies of the primate lentiviruses. *Immunol Rev*. 2001;183:141-58.
74. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2014-8.
75. Randall G, Grakoui A, Rice CM. Clearance of replicating hepatitis C virus replicon RNAs in cell culture by small interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:235-40.
76. Wilson JA, Jayasena S, Khvorova A, Sabatino S, Rodrigue-Gervais IG, Arya S, et al. RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:2783-8.
77. Seo MY, Abrignani S, Houghton M, Han JH. Small interfering RNA-mediated inhibition of hepatitis C virus replication in the human hepatoma cell line Huh-7. *J Virol*. 2003;77:810-2.
78. Shlomai A, Shaul Y. Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*. 2003;37:764-70.
79. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*. 2002;21:6041-8.
80. Gitlin L, Karelsky S, Andino R. Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. 2002;418:430-4.
81. Dector MA, Romero P, López S, Arias CF. Rotavirus gene silencing by small interfering RNAs. *EMBO Rep*. 2002;3:1175-80.
82. Bitko V, Barik S. Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol*. 2001;1:34.
83. Coburn GA, Cullen BR. Potent and specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference. *J Virol*. 2002;76: 9225-31.
84. Jacque JM, Triques K, Stevenson M. Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature*. 2002;418:435-8.
85. Lee NS, Dohjima T, Bauer G, Li H, Li MJ, Ehsani A, et al. Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nat Biotechnol*. 2002;20:500-5.
86. Song E, Lee SK, Dykxhoorn DM, Novina C, Zhang D, Crawford K, et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J Virol*. 2003;77:7174-81.
87. Novina CD, Murray MF, Dykxhoorn DM, Beresford PJ, Riess J, Lee SK, et al. siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med*. 2002;8:681-6.
88. Stevenson M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:851-8.
89. Park WS, Hayafune M, Miyano-Kurosaki N, Takaku H. Specific HIV-1 env gene silencing by small interfering RNAs in human peripheral blood mononuclear cells. *Gene Ther*. 2003;10:2046-50.
90. Qin XF, An DS, Chen IS, Baltimore D. Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:183-8.
91. Lee MT, Coburn GA, McClure MO, Cullen BR. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in primary macrophages by using Tat- or CCR5-specific small interfering RNAs expressed from a lentivirus vector. *J Virol*. 2003;77:11964-72.
92. Wei X, Decker JM, Wang S, Hui H, Kappes JC, Wu X, et al. Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*. 2003;422:307-12.
93. Richman DD, Wrin T, Little SJ, Petropoulos CJ. Rapid evolution of the neutralizing antibody response to HIV type 1 infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:4144-9.
94. Larder B. Mechanisms of HIV-1 drug resistance. *Aids*. 2001;15 Suppl 5:S27-34.
95. Schols D, Este JA, Cabrera C, De Clercq E. T-cell-line-tropic human immunodeficiency virus type 1 that is made resistant to stromal cell-derived factor 1alpha contains mutations in the envelope gp120 but does not show a switch in coreceptor use. *J Virol*. 1998;72:4032-7.
96. Trkola A, Kuhmann SE, Strizki JM, Maxwell E, Ketas T, Morgan T, et al. HIV-1 escape from a small molecule, CCR5-specific entry inhibitor does not involve CXCR4 use. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99:395-400.