

***Egy új, HIV replikációt gátló oligonukleotid szintézise, kémiai és
biológiai jellemzése***

Egyetemi doktori (Ph. D.) értekezés

Írta:
Horváth András

Témavezető:
Dr. Aradi János, egyetemi docens



DEBRECEN
2005

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	1
1 BEVEZETÉS.....	2
1.1. Oligonukleotidok szekvencia specifikus módon kifejtett lehetséges biológiai aktivitása.....	2
1.2. Oligonukleotidok nem szekvencia specifikus módon kifejtett lehetséges biológiai aktivitása.....	3
1.3. Nukleotidok kémiai módosítása.....	4
1.4. Az AIDS és a retrovírusok.....	5
1.5. A HIV-1 felépítése.....	6
1.6. A HIV replikáció ciklusa.....	9
1.7. A HIV-1 sejtbe jutása és gátlása.....	11
1.8. A sejtfelszíni redox folyamatok szerepe a HIV belépésében.....	14
1.9. HIV-1 replikáció gátlásának inhibitorai célpontok szerint.....	15
1.10. Exogén oligonukleotid inhibitorok.....	16
1.11. Az oligonukleotidok kémiai szintézise.....	17
1.12. Kéntartalmú nukleotidok és nukleinsavak szintézise.....	18
2 PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK.....	19
3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	20
3.1. Kémiai módszerek.....	20
3.1.1 <i>A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit előállításához szükséges anyagok szintézise.....</i>	<i>20</i>
3.1.1.1 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-2'-dezoxiuridin.....	20
3.1.1.2 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-2'-dezoxiuridin.....	20
3.1.1.3 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin.....	21
3.1.1.4 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin.....	21
3.1.1.5 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin-3'-(O-(2-cianoetil)-N,N-diizopropil)-foszforamidit.....	22
3.1.2 <i>A Suligovir szintéziséhez potenciálisan alkalmazható univerzális hordozók vizsgálata.....</i>	<i>22</i>
3.1.3 <i>A Suligovir A szintézise automata oligonukleotid szintetizáló készülékkel.....</i>	<i>23</i>
3.1.4 <i>A Suligovir B szintézise (dC)₃₅ H₂S-es kezeléssel.....</i>	<i>24</i>
3.1.5 <i>A Suligovir A és B anioncserélő kromatográfiás tisztítása.....</i>	<i>25</i>
3.1.6 <i>Biotinált, Cy-5 és Cy-3 jelzett Suligovir szintézise.....</i>	<i>25</i>
3.1.7 <i>A Suligovir A és B vizsgálata denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel.....</i>	<i>25</i>
3.2. Biokémiai, sejtbiológiai és virológiai módszerek.....	26
3.2.1 <i>Sejtek.....</i>	<i>26</i>
3.2.2 <i>A Suligovir A és B reverz transzkriptáz gátlásának vizsgálata.....</i>	<i>26</i>
3.2.3 <i>A Suligovir A és B HIV-1 replikáció gátlásának vizsgálata.....</i>	<i>26</i>
3.2.4 <i>A Suligovir és tioredoxin közötti kovalens kölcsönhatás kimutatása.....</i>	<i>26</i>
3.2.5 <i>Áramlási citometriai mérések, kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatok.....</i>	<i>27</i>
3.2.6 <i>A Suligovir A és B nukleázokkal szembeni stabilitása.....</i>	<i>27</i>
3.2.7 <i>Toxicitási vizsgálat humán csontvelő granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésén keresztül.....</i>	<i>28</i>

3.2.8	<i>Antitestek és sejtfelszíni molekulák jelölése, konfokális lézer szkennelés mikroszkópiás (CLSM) vizsgálatok</i>	28
4	EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	29
4.1.	A 4-tio-dezoxiuridilát tartalmú oligonukleotidok anti-HIV aktivitásának vizsgálata	29
4.2.	A Suligovir szintézise	30
4.2.1	<i>A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit szintézise</i>	31
4.2.2	<i>A 4-tio-dezoxiuridin-support szintézise</i>	32
4.2.3	<i>A Suligovir A és B szintézise</i>	33
4.3.	A két módszerrel előállított Suligovir jellemzése	34
4.3.1	<i>A Suligovir kémiai jellemzése</i>	34
4.3.2	<i>A Suligovir biokémiai jellemzése</i>	38
4.4.	A Suligovir gátló hatásának mechanizmusa	41
4.4.1	<i>A Suligovir gátló hatása a vírus-sejt kölcsönhatásra</i>	41
4.4.2	<i>A Suligovir kölcsönhatása a tioredoxinnal</i>	42
4.4.3	<i>A Suligovir kölcsönhatása a sejtfelszínnel</i>	43
4.4.3.1	A Suligovir sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata konfokális lézermikroszkópia alkalmazásával	46
4.5.	Suligovir antivirális aktivitása	49
5	ÖSSZEFOGLALÁS	51
6	SUMMARY	53
7	KÖZLEMÉNYEK	55
8	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	56
9	FELHASZNÁLT IRODALOM	57

RÖVIDÍTÉSEK

BSA	szarvasmarha szérumalbumin
CEDIPCI PA	2-cianoetil-N,N-diizopropilklór-foszforamidit
CLSM	konfokális lézer szkennig mikrószkópia
CNE	2-cianoetil
CPG	kontrollált pórusú üveg
Cy-3 és Cy-5	szulfoindocianin-szukcinimidil észter típusú festék származékok
DCM	diklór-metán
DIPEA	N,N-diizopropil-etilamin
DMF	N,N-dimetilformamid
DMT r	di(p-metoxifenil)fenilmetil
DTNB	5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoesav
DTT	ditiotreitol
s ⁴ dU	2'-dezoxi-4-tio-uridin
ESI-MS	elektron spray ionizációs tömegspektrometria
FCS	fötális borjú szérum
Fmoc	9-fluorenilmetoxikarbonil
FRET	fluoreszcencia rezonancia energiatranszfer (Fluoreszcence Resonance Energy Transfer)
HBTU	2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilurónium-hexafluorfoszfát
HOBt	1-hidroxibenzotriazol
mAt	monoklonális antitest
NMI	1-metilimidazol
NMR	mágneses magrezonancia
NRTI	nukleotizid reverz transzkriptáz inhibitor
NNRTI	nem nukleotizid reverz transzkriptáz inhibitor
MS	tömegspektrometria
PAGE	poliakrilamid gél elektroforézis
PDI	protein diszulfid izomeráz
py	piridin
rt	szobahőmérséklet
RT	reverz transzkriptáz
TCA	triklórecetsav
TLC	vékonyréteg kromatográfia
TMS-Cl	trimetilszilil-klorid
Tris	Trisz(hidroxi-metil)amino-metán
US II	univerzális CPG
US 500	univerzális CPG

1 BEVEZETÉS

Az oligonukleotidok értékes eszközök a kutatók kezében, melyekkel gének expresszióját, vagy proteinek aktivitását lehet gátolni. Széleskörű terápiás alkalmazásuk bevezetése szintén várható a közeljövőben. Az oligonukleotidok mint kísérleti eszközök vagy mint potenciális terápiás ágensek biológiai aktivitásukat két módon fejtik ki:

- a) Szekvencia specifikus módon (antiszensz oligonukleotidok, triplahélix képző oligonukleotidok, aptamerek, ribozimok, decoy oligonukleotidok, illetve kis interferáló RNS-ek)
- b) Nem szekvencia specifikus módon (interferon indukáló oligo- vagy polinukleotidok, antitemplátok, egyéb)

Meg kell jegyezni, hogy a két fenti típusú aktivitás nem mindig jelentkezik tisztán, kevert funkciójú biológiailag aktív oligonukleotidok is előfordulnak.

1.1. Oligonukleotidok szekvencia specifikus módon kifejtett lehetséges biológiai aktivitása

Antiszensz oligonukleotidok: Az antiszensz oligonukleotidok általában 15-20 nukleotidból állnak és a célzott mRNS komplementerei. Antiszensz aktivitásukban két fő mechanizmus játszik szerepet. A legtöbb antiszensz oligonukleotidot úgy tervezik, hogy aktiválódjon az RNáz H enzim, mely a DNS·RNS heteroduplex RNS részét hasítja, és ez a hasítás vezet a cél mRNS degradációjához. A riboszóma blokkolása révén transzláció gátlására lehet használni azokat az antiszensz oligonukleotidokat, melyek nem indukálnak RNáz H hasítást (Kurreck, 2003).

Triplahélix képző oligonukleotidok: A triplahélix képző oligonukleotidok homopurin vagy homopirimidin tartalmúak és harmadik szálként szekvenciaspecifikus módon kapcsolódnak a DNS duplexhez (Frank-Kamenetskii és Mirkin, 1995). Az oligonukleotid szálat a harmadik szál bázisai és a duplex purinjai között kialakuló Hoogsteen-hidrogén kötések stabilizálják (Radhakrishnan és Patel, 1994; Nagatsugi és Sasaki, 2004). A triplahélix DNS érdekes tulajdonsága, hogy nemcsak a célzott géneket gátolja, hanem meghatározott helyeken pontmutációkat indukál.

Aptamerek: Körülbelül 10 évvel ezelőtt írtak le először olyan oligonukleotidokat, melyek szekvencia specifikus módon, nagy affinitással kötődnek különböző célmolekulákhoz (kismolekulákhoz [aminosavak, nukleotidok, antibiotikumok], proteinekhez, nukleinsavakhoz, intakt vírusokhoz és élő sejtekhez). Ezeket az oligonukleotidokat

aptamereknek nevezték el (Ellington és Conrad, 1995; Famulok és Mayer, 1999; Jayasena, 1999; Toulmé és mtsai, 2003).

Ribozimok: A ribozimok katalitikus aktivitással rendelkező ribooligonukleotidok, melyek az RNS helyspecifikus hasítására képesek (Inoue és mtsai, 1985; Doudna és Cech, 2002). A ribozimokat hatásmechanizmusuktól függően különböző osztályokba sorolják.

Decoy (csalétek) oligonukleotidok: A decoy oligonukleotidok a transzkripció faktorokhoz szekvenciaspecifikus módon kapcsolódnak. Gátló hatásukat azáltal fejtik ki, hogy gyakorlatilag kivonják a rendszerből a transzkripció faktorokat (Tomita és mtsai, 2004; Morishita és mtsai, 2004).

RNS interferencia: A 21-22 nukleotid hosszúságú kis interferáló RNS-ek (siRNS) használatával szelektív gén „silencing” érhető el. A duplaszálú siRNS-ek beépülnek az RNS által indukált génelcsendesítő komplexekbe (RISC). A komplexben található enzimek egyszálúvá alakítják át az siRNS-t. Ezután ez az egyszálú siRNS irányítja a komplexet a vele homológ részeket tartalmazó mRNS-ekhez, amiket a komplex enzimek feldarabolnak (Kurreck, 2003; Manoharan, 2004).

Itt kell megjegyeznem, hogy az endogén ribozimok, illetve kis interferáló RNS-ek jelentős biológiai funkcióval rendelkeznek, hiszen az RNS helyspecifikus hasítása és az RNS interferencia alapvető jelenségek a sejten belül. Ezzel szemben a többi, fent ismertetett jelenség elsősorban vagy kizárólag exogén, mesterséges oligonukleotidok hatására mehet végbe.

1.2. Oligonukleotidok nem szekvencia specifikus módon kifejtett lehetséges biológiai aktivitása

Interferon indukáló oligonukleotidok: A nem szekvencia specifikus módon ható biológiailag aktív oligonukleotidok skálája nem olyan széleskörű, mint a szekvencia specifikus módon ható oligonukleotidoké. A duplaszálú RNS [mint amilyen a poli(rI)·poli(rC)] interferon indukáló ágens, melynek terápiás felhasználására korábban már folytattak kísérleteket (Pitha és mtsai, 1982; Chadha és mtsai, 2004; Raj és Pitha, 1983; De Clercq és mtsai, 1979).

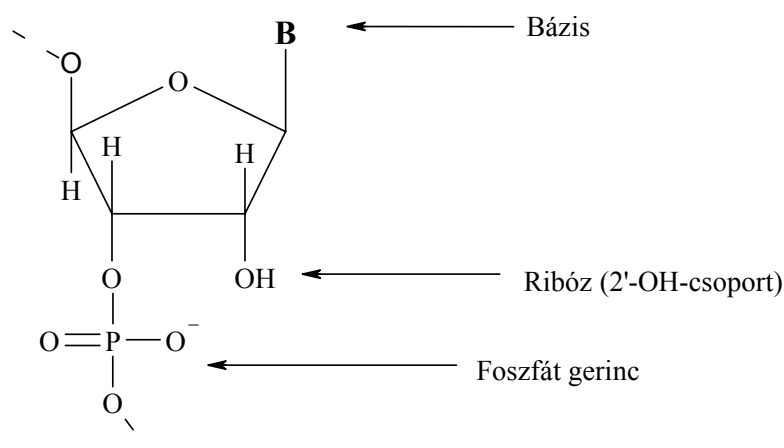
Antitemplát oligonukleotidok: A DNS-polimerázok működéséhez templát szükséges. Számos kémiai módosított polinukleotid (pl. 5-merkaptopirimidin), elfoglalva a templát kötő helyet, erőteljesen gátolja a templát függő nukleinsav polimerázokat, a DNS-polimerázt, RNS-polimerázt, vagy a reverz transzkriptázt (Bardos, 1974; Kung és mtsai, 1982; Aradi és

Ho, 1985). Ezeket a nukleinsav-polimeráz gátló, kémiailag módosított polinukleotidokat antitemplátoknak nevezzük.

A laboratóriumunkban kifejlesztett homo-oligomer, Suligovir $[(s^4dU)_{35}]$ is nem szekvencia specifikus módon fejt ki hatását.

1.3. Nukleotidok kémiai módosítása

A nukleotidok kémiai módosításával kedvező tulajdonságú oligonukleotidokat állíthatunk elő (megnövelt stabilitás, jobb farmakokinetikai tulajdonságok, nagyobb affinitás a célmolekulához, stb.). A nukleotidok kémiai módosítása történhet: 1. foszfát csoporton, 2. cukor komponensen, 3. bázison (**1. ábra**).



1. ábra A ribonukleotidok kémiai módosításainak lehetséges helyei

A kémiailag módosított nukleotid analógok száma óriási, ezért teljes ismertetésére ezen disszertáció keretében nem is vállalkozhatok.

Foszfát-csoport módosítás: A biológiailag aktív exogén oligonukleotidokat gyakran foszforotioát internukleotid kötéssel szintetizálják. Nagyon megemeli a vegyület nukleáz stabilitását, de növeli a nem szekvencia specifikus kölcsönhatásokat is, és ezáltal emeli az oligonukleotidok citotoxicitását (Amarzguioui és mtsai, 2003; Brown és mtsai, 1994).

Cukorgyűrű módosítás: A cukorkomponensen módosított nukleotidok sokfélék lehetnek. Legismertebb képviselőjük a 2'-O-metil és 2'-O-metoxi-etil RNS. Az így módosított oligonukleotidok kevésbé toxikusak és nagyobb stabilitású dupla-hélixet képeznek, mint a módosítatlanok (Kurreck és mtsai, 2002). Ez a módosítás megnöveli penetrációs képességüket is. Az utóbbi néhány évben fejlesztették ki az úgynevezett „locked” nukleotidokat, melyek oligomerekbe építve jelentősen emelik a duplaszálú hibridek (LNS·DNS) olvadáspontját (Elayadi és Corey, 2001; Braasch és Corey, 2001; Ørum és

Wengel, 2001). Az LNS·DNS kiméra hatékonyan gátolja a génexpressziót (Braasch és mtsai, 2002). A 4'-tio módosítás beépítése jelentősen növeli az olvadáspontot, illetve az így módosított nukleotid igen erőteljes nukleáz rezisztenciát mutat. Intenzíven tanulmányozott nukleinsav analóg a peptid nukleinsav. A peptid nukleinsavakban a dezoxiribóz foszfát gerinc poliamidkötésekre van kicserélve. Igen kedvezőek a hibridizációs tulajdonságaik, nagy biológiai stabilitással rendelkeznek (Nielsen, 1999; Elayadi és Corey, 2001).

Bázis módosítás: Az irodalomban található nagyszámú purin és pirimidinbázison módosított, illetve ezekkel analóg nukleotidok részletes ismertetésére disszertációmban nem térek ki. Példaként említeném közülük az 5-fluor-uracilt, melyet tumor terápiás célra használnak. A bázisra bevitt funkciós csoportok általában növelik a nem specifikus kölcsönhatást más nukleotidokkal, illetve proteinekkel (Manoharan, 2004). Jelen disszertációban a 4-tio-dezoxiuridint tartalmazó homo oligomer szintézisét, kémiai és biokémiai jellemzését mutatom be.

1.4. Az AIDS és a retrovírusok

Az 1980-as évek elején került az érdeklődés középpontjába egy fertőző betegség, az AIDS (Acquired Immune Deficiency Syndrome) (Gottlieb és mtsai, 1981; Masur és mtsai, 1981; Siegal és mtsai, 1981). 1983-ban izolálták a betegség kórokozóját, a Lentiviridae víruscsalád (Barre-Sinoussi és mtsai, 1983) egyik tagját, az azóta HIV-nek (Human Immune deficiency Virus) (Coffin és mtsai, 1986) nevezett retrovírust. A HIV vírusnak két típusát találták, a HIV-1 és HIV-2 vírusokat. A két típusnak 40-50%-ban hasonló az RNS szekvenciája és hasonló klinikai tünetegyüttest is okoznak, bár a HIV-2 kevésbé virulens, mint a HIV-1, és HIV-2 fertőzés esetén az AIDS betegség kialakulásáig tartó lappangási idő hosszabbnak bizonyult.

A vírusos megbetegedésektől eltérően a HIV fertőzés kezdetben észrevétlen marad, a beteg évekig panaszmentes lehet. Ez alatt az idő alatt a fertőzöttek, fertőzőségükről nem tudva adják át másoknak a vírust. A HIV fertőzéstől az AIDS diagnosztizálásáig tartó lappangási időszak hossza széles tartományban mozoghat, 2 hónaptól több mint 15 évig is terjedhet. Az iparosodott országokban ez az időszak általában 8-10 év (Alcabes és mtsai, 1993; Blattner, 1991). Végül a fertőződés az immunrendszer teljes összeomlását eredményezi.

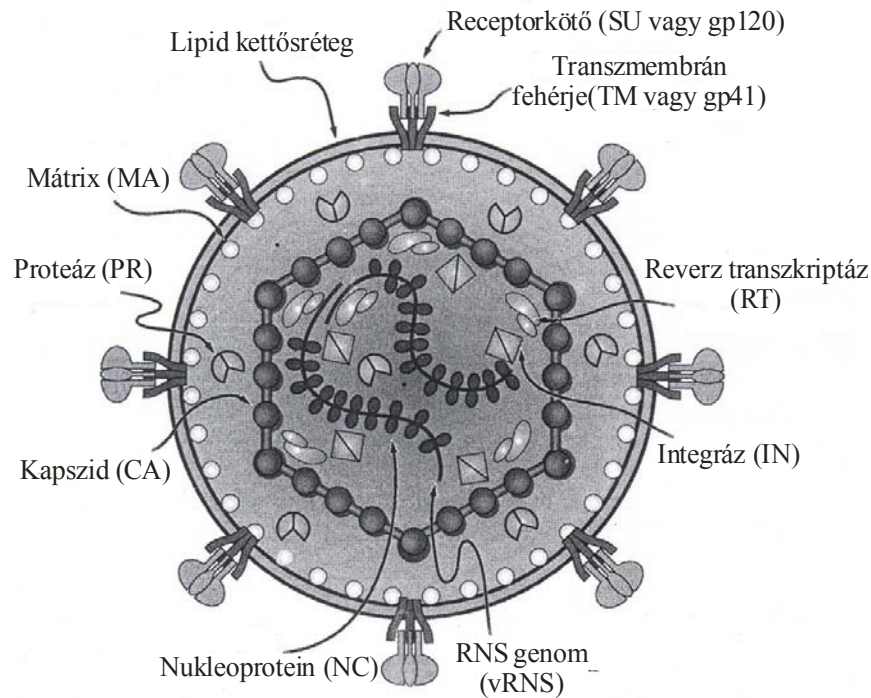
A HIV fertőzés és AIDS kezelésére számos olyan anyagot fejlesztettek ki, melyek késleltetik, akadályozzák a betegség kialakulását, növelik a túlélési időt. Hatásos vakcina előállítása mértéktartó vélemények szerint is leghamarabb csak 2010-2020 környékén

várható. Feltételezhető, hogy annak széleskörű elterjedése után még évekig lesznek megbetegedések.

A retrovírusok RNS genommal rendelkező vírusok. A Retroviridae családot három taxonómiai csoportra oszthatjuk (Weiss és mtsai, 1984; Fields és mtsai, 1990). Az Oncoviridae vagy RNS tumor vírusokat megtalálhatjuk mind a madarakban, mind az emlősökben. Ezen vírusok közé tartoznak az avian szarkóma és leukózis vírusok (ASLV), a murine leukémia vírusok (MLV), a murine mammary tumor vírusok (MMTV) és a humán T-sejt leukémia vírusok (HTLV-1 és 2). A második csoportba a Spumaviridae vagy foamy vírusok tartoznak, melyek sejtkultúrában a sejtek vakuolációját okozzák. A foamy vírusokat számos emlősfajból izolálták, pl. majmokból, szarvasmarhákból, macskákból és emberekből. A Lentiviridae tagjai, mint például a HIV, számos neurológiai és immunológiai betegséget okoznak az emlősökben. A lentivírusokhoz tartozik a Visna/Maedi vírus, Caprine Arthritis-Encephalitis vírus (CAEV), Equine Infectious Anemia vírus (EIAV) és néhány immundeficiencia vírus [szarvasmarhában (BIV), macskában (FIV), majmokban (SIV) és embereken (HIV-1 és HIV-2)].

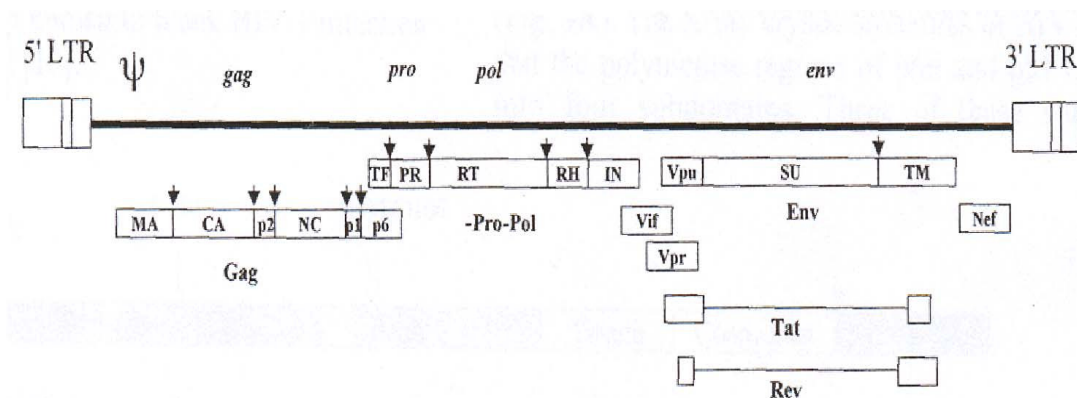
1.5. A HIV-1 felépítése

A HIV-1 hozzávetőlegesen 110 nm átmérőjű gömb alakú részecske, melyet kettős lipidrétégből álló burok vesz körül (**2. ábra**) (Coffin és mtsai, 1997a). Minden virion két genomális RNS molekulát tartalmaz. A virionokban hat szerkezeti, három regulátorfehérje és három enzim található. A HIV vírus extracelluláris membránja körülbelül 72 dudort vagy kiemelkedést tartalmaz, melyek elősegítik a gazdasejthez való kötődést. Ezek a dudorok háromszögyszerű szimmetriát mutatnak, vagyis a burokfehérjék három heterodimert tartalmaznak. Minden egyes heterodimer egy felszíni receptorkötő alegységből (SU vagy gp120) és egy, ezzel nem-kovalens kölcsönhatásban lévő transzmembrán alegységből (TM vagy gp41) áll. A lipid membrán egy tömör, kúp formájú magot vesz körbe, ami mátrix (MA) és kapszid (CA) proteinekből épül fel. A nukleokapszid (NC vagy p7) fehérje, a reverz transzkriptáz (RT vagy p66) és az integráz enzim (IN vagy p32) a virális genomhoz kapcsolódik. Ezzel a maggal állnak összefüggésben a Nef (p15) és Vif (p23) proteinek, azonban ezek pontos elhelyezkedése nem ismert még. A Vpr a p6 struktúrproteinhez kötődik.



2. ábra A HIV-1 virion szerkezete

A HIV-1 RNS genomja 9,8 kb. méretű és két pozitív-szálú RNS molekulát (vRNS) tartalmaz, melyek nem kovalens kölcsönhatással dimert alkotnak. A genom mindkét végén fehérjét nem kódoló regulátor szekvenciák találhatók. Ehhez az U5, illetve U3 régiók kapcsolódnak, melyek csak az egyik végén helyezkednek el az RNS-nek. Két nagy csoportját különböztetjük meg a géneknek: strukturális gének (gag, pol, env) és regulátor gének (tat, rev, nef, vif, vpr és vpu). A vírusgenom DNS másolatát provirális DNS-nek nevezzük. A reverz transzkripció során a terminálisan jelenlévő U5 és U3 szekvenciák megduplázódnak, így az U3-R-U5 szekvenciák a provirális DNS 5' és 3' végén jelen lesznek. Ez a 640 bp.-t tartalmazó „long terminal repeat” (LTR) elengedhetetlenül szükséges a vírus szaporodásához. Lehetővé teszi a provirális DNS integrálódását a gazdasejt genomjába, ugyanakkor ezáltal jön létre a provirális DNS-ben az a regulátor régió, mely a transzkripció startpontját, a promoter és az enhancer szekvenciákat tartalmazza. A vírus genomja (**3. ábra**) kilenc gént tartalmaz, melyek esszenciálisak a fertőzőképes vírusrészecskék összeszereléséhez. Hat gén egyedi, csak a HIV vírusra jellemző, a többi három a retrovírusoknál általános (Scarlati és mtsa, 2003). A genom tartalmazza a gag és pol-env nyitott leolvasási kereteket, melyek a retrovírusok fehérje alapkészletét alakítják ki. A pol gén a vírus enzimjeit kódolja, mint a reverz transzkriptázt (RT), integrázt (IN) és proteázt (PR).



3. ábra A HIV-1 genom sematikus ábrázolása

A reverz transzkriptáz feladata a vírus részecskében, hogy az RNS genomot duplaszálú DNS molekulává írja át a fertőzött sejtekben (Coffin és mtsai, 1997b). A reverz transzkripció kezdő lépéséhez egy $tRNA^{lys3}$ (3. számú lizin specifikus tRNA) molekula szükséges, mely a vRNS szálhoz kötődik a vírus részecskében (Goff, 1990; Hu és Temin, 1990; Katz és Skalka, 1990). A $tRNA^{lys3}$ molekulán a tRNA primer csomagolását a RT enzimmel való specifikus kölcsönhatás segíti elő (Oude Essink és mtsai, 1995). A proteáz enzim hasítja a gag és pol prekursor proteint. Az env gén azon glikoproteineket kódolja, melyek a vírus részecske felszínén fejeződnek ki. A gag gén a mátrix, kapszid és nukleokapszid szerkezetfehérjéket kódolja.

Összehasonlítva a Retroviridae más tagjaival, a lentivírusok nagyobb és komplexebb genommal rendelkeznek, melyek jó néhány további proteint kódolnak. A HIV-1 hat további proteint tartalmaz, a tat, nef, rev, vif, vpr és vpu (Trono, 1995; Frankel és mtsa, 1998) proteineket, amelyből a vif, vpr és nef a vírus részecskében vannak jelen. A vif, vpr, vpu és nef géntermékek néhány kísérleti modellrendszerben nem voltak feltétlenül szükségesek a sejtek megfertőzéséhez, de minden bizonnyal hozzájárulnak a vírus *in vivo* fertőzőképességéhez (Frankel és mtsa, 1998). A tat és rev proteinek a vírus replikációjához nélkülözhetetlenek. A tat protein homodimerként aktív. A tat a HIV transzkripció potens transzaktivátora, megnöveli mind a transzkripció iniciálásának, mind az RNS hosszabbításának a gyakoriságát (Bohan és mtsai, 1992; Jeang és mtsai, 1992, 1993; Kao és mtsai, 1987; Laspias és mtsai, 1989). A rev az éretlen RNS magi exportját egy specifikus RNS transzport útvonalon keresztül indítja be (Olsen és mtsai, 1990; Malim és mtsa, 1991; Meyer és mtsai, 1996; Najera és mtsai, 1999).

A HIV-1-et három csoportra, az M (main), az O (outlier) és N (non-M, non-O) csoportokra oszthatjuk (McCutchan, 2000; Simon és mtsai, 1998), melyek a vírus majomból emberre történt átvitelének három, egymástól független esetét reprezentálják. A HIV-1 gyors

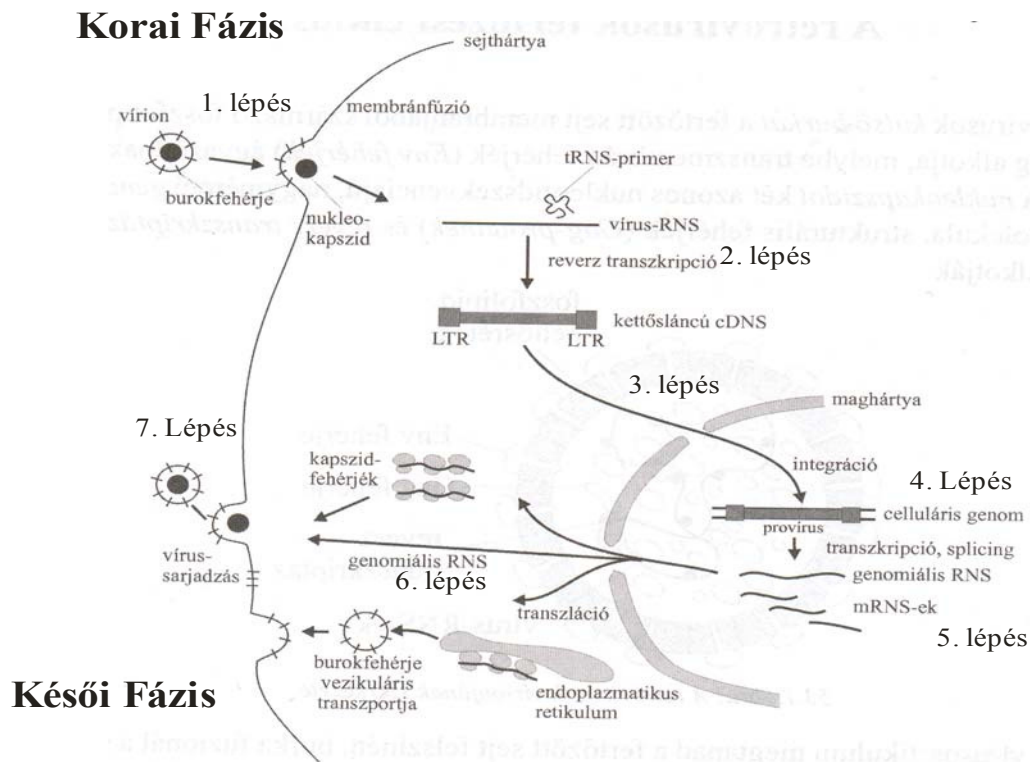
életciklusa a fertőzött egyedekben, az immunválasz, illetve az antivirális szerek használata mind hozzájárultak ahhoz, hogy a vírus genetikai állománya folyamatosan változzon. Ezek alapján jelenleg a HIV-1 M csoportján belül kilenc különböző altípust (A-J), két további altípust és számos cirkuláris rekombináns formát (CRF) különböztetünk meg (Thomson és mtsai, 2002; Perrin és mtsai, 2003; Delgado és mtsai, 2002). A kilenc altípus főleg az env génben különbözik egymástól. A HIV-1 O csoportjába tartozó típusokat mint az M csoportba nem illeszthető törzseket különítették el. Az N csoportba, melyet az utóbbi időben ismertek fel, mindössze két altípus tartozik. A világtérképen látható, hogy a legtöbb altípus és CRF Közép-Afrikában van jelen, ellentétben a többi kontinenssel, ahol egy vagy csak néhány altípus és CRF van jelen (4. ábra). Ez alapján feltételezhető, hogy a HIV-1 vírus szétterjedése a Földön Közép-Afrikából indult ki.



4. ábra A HIV-1 M csoport altípusainak és cirkuláris rekombináns formáinak világméretű elterjedése (Thomson és mtsai, 2002)

1.6. A HIV replikáció ciklusa

A HIV replikáció ciklusát egy kaszkád rendszernek tekinthetjük, melyet virális és celluláris fehérjék szabályoznak. A HIV-1 $CD4^+$ sejtekben (monociták, makrofágok, T-limfociták) sokszorozódik. A retrovírusok életciklusát, mint amilyen a HIV-1-é is, egy korai és egy késői fázisra oszthatjuk (LaBranche és mtsai, 2001; Tőzsér, 2003) (5. ábra).



5. ábra A HIV-1 replikációs ciklusa

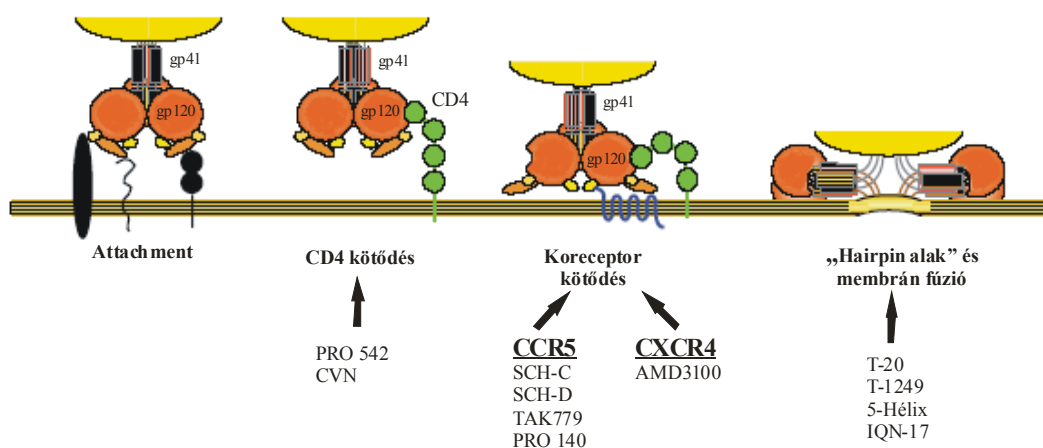
A korai fázis kezdőpontja az, amikor a vírus közvetlenül fúzió útján vagy receptorhoz kapcsolt endocitózissal lép be a sejtbe (1. lépés). A dekapszidáció során megtörténik a p24 kapszid fehérje eltávolítása. Szabaddá válik a vírus RNS és a reverz transzkriptáz enzim, mellyel kezdetét veszi a reverz transzkripció, amikor a vírus egyszálú RNS genomja duplaszálú DNS-re íródik át (2. lépés). Egy preintegrációs komplex alakul ki (PIC), mely a belépő kapszid néhány fehérje komponensét és a RT által szintetizált duplaszálú DNS-t tartalmazza (Coffin és mtsai, 1997c). A folyamat 3. lépése során a PIC belép a magba. A korai fázis utolsó lépésében (4. lépés) az integráz (IN) fehérje, mely a PIC-nek alapvető részét képezi, beépíti a gazdasejt genomjába a virális DNS-t.

A késői fázis a virális DNS RNS-re történő átírásával kezdődik a gazdasejt RNS polimeráz II enzimjének közreműködésével (5. lépés). A transzkripció hatékonysága nagymértékben megnövekszik a vírus tat transzaktivátor proteinjének hatására (Frankel és mtsai, 1998; Kao és mtsai, 1987; Feinberg és mtsai, 1991; Rana és Jeang, 1999). Néhány mRNS termék éretlenül elhagyja a magot és templátként szolgál a gag és gag-pro-pol poliproteineknek, vagy beépül a keletkező vírusok nukleokapszidjába. Az egyszálú érett RNS templátja az env szintézisnek az endoplazmatikus retikulumban és a Golgiban. A gag fehérjék a membránban szerelődnek össze, ahol az env proteinek felhalmozódnak (6. lépés) és az összeszerelt éretlen vírus részecskék lefűződnek a membránról (7. lépés), melyekből a további

érésük során kialakulnak az előző alaktól morfológiailag eltérő, elkülönült magot tartalmazó érett vírus részecskék.

1.7. A HIV-1 sejtbe jutása és gátlása

Mivel a disszertációmban jellemzett Suligovir egy „entry” inhibitor, ezért részletesebben ismertetem a HIV-1 sejtbe jutásának folyamatát, illetve az egyes lépéseket gátló anyagokat. A vírus sejtbe jutása alapvetően négy lépésből áll. Az első lépés a sejthez kapcsolódás, majd ezt követi a CD4 receptorhoz, majd a koreceptorhoz kötődés. Végül a negyedik lépés során a vírus a membránon keresztül fúzióval jut be a sejtbe (**6. ábra**). Jelenleg több olyan gátlószer fejlesztésén dolgoznak, melyek a HIV-1 sejtbe való bejutásának egyes lépéseit gátolják (Cooley és Lewin, 2003).



6. ábra A HIV-1 sejtbe jutásának és az egyes lépések gátlásának vázlatos ábrázolása (Cooley és Lewin, 2003)

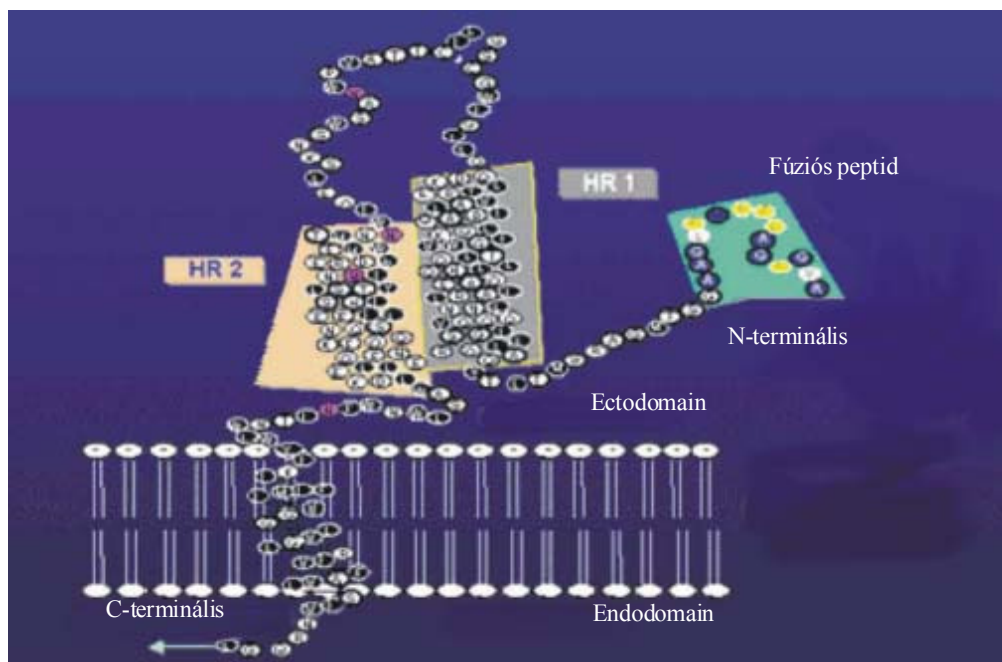
A folyamat során a HIV-1 vírus burka közeledni kezd egy olyan gazdasejthez, amely CD4 receptort tartalmaz a sejt felszínén, bár CD4-től független kötődést is leírtak (Geijtenbeek és mtsai, 2000). A HIV-1 vírus burok fehérjéje a gazdasejt sejtmembránjából származik, melyet a vírus sarjadzása során szerez, illetve még számos sejt felszíni glikoproteint is tartalmaz, amelyeket az env gén kódol. A gp160 polipeptid prekursor a celluláris proteázok hatására a gp120-ra és a gp41-re hasad el. A proteinek a Golgi készülékben glikozilálódnak és gp120-gp41 heterodimerekből álló trimerekké állnak össze, majd ezek a gazdasejt plazmamembránjába szállítódnak, ahol a gp41 citoplazmatikus része a virion nukleokapszidjához kötődik. A vírus részecskék sarjadzása a burok fehérjét tartalmazó plazmamembránon keresztül megy végbe, amiből aztán kialakulnak az érett vírus részecskék (Sattentau, 1998).

A gp120 a burok fehérje külső részén helyezkedik el. A gp120 képes kötődni a CD4-hez és azon sejtekhez (segítő T limfociták, makrofágok és dendritikus sejtek), melyek a sejt felszínükön kemokin receptorokat tartalmaznak (Wyatt és Sodroski, 1998; Wyatt és mtsai, 1998; Sakaida és mtsai, 1998). Globuláris szerkezete 25 β - és 5 α -helikális loopot tartalmaz. A protein felszínén öt változó régió (V1-V5) és belsejében öt konzervatív régió (C1-C5) található. A gp120 igen erőteljesen glikozilált (Leonard és mtsai, 1990), ami lehetséges, hogy a humorális immunválasz elleni pajzsként funkcionál (Wyatt és Sodroski, 1998). Bár a HIV-1 gp120 glikoproteinje jellemzően a CD4 receptorral rendelkező gazdasejtekhez tud kapcsolódni, de kis mennyiségben képes olyan sejteket is fertőzni a HIV-1, amelyek nem expresszálnak CD4-et. A gp120 alternatív receptoraként működhetnek a galaktozilceramidok vagy az összefüggő glikolipidek is (Turville és mtsai, 2001).

A CD4 receptorhoz tehát nagy affinitással kötődik a HIV-1 vírus. A CD4 és gp120 közötti kölcsönhatás a HIV-1 vírus sejthez kötődésének az első lépése. Ez a kötődés a gp120-ban konformációs változást okoz, amely szükséges a koreceptorhoz való kötődéshez. A kötődést követően a CD4 hajlékony része lehetővé teszi, hogy a gp120 lesüllyedjen a koreceptorhoz, így hozva közelebb a vírus és a sejt membránját egymáshoz (Sattentau, 1998). Jelenleg két ígéretes CD4 receptor gátlószerrel folytatnak kutatásokat: egy rekombináns antitestszerű fúziós fehérjével (PRO 542) és a 101 aminosavból álló Cyanovirin-N-nel (CV-N) (Cooley és Lewin, 2003; Pierson és Doms, 2003).

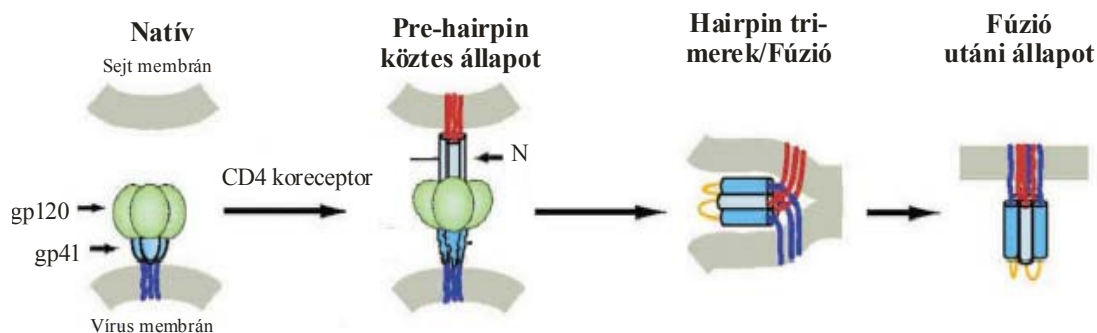
A folyamat következő lépése során a vírus kötődik a koreceptorhoz. Két kemokin koreceptor a vírus sejtbe lépését segíti elő: CCR5 és CXCR4 (Eckert és Kim, 2001; LaBranche és mtsai, 2001; Edinger és mtsai, 1999). A kemokinek a citokinek nagy családjába tartoznak és két csoportra (CXC vagy α -kemokinek és CC vagy β -kemokinek) osztjuk őket (Fernandez és Lolis, 2001, 2002). A gp120 erőteljesen konzervált V3-as régiójában helyezkedik el a kemokin koreceptor kötőhelye (CRbs) (Wu és mtsai, 1996). Ez a kötőhely az érintetlen gp120-ban a V1 és V2 loopok miatt szterikusan hozzáférhetetlen. A CD4-gp120 kölcsönhatás szabaddá teszi a kemokin receptorok kötőhelyét, és így lehetségessé válik a koreceptorokhoz kötődés (Cocchi és mtsai, 1996). Jelenleg több CCR5 (SCH-C, SCH-D, TAK779, PRO140) és CXCR4 (AMD3100) gátlószerrel vizsgálják (Cooley és Lewin, 2003; Pierson és Doms, 2003). Az SCH-C és SCH-D kis molekulájú CCR5 antagonisták, a TAK779 megakadályozza a kölcsönhatást a gp120 és a CCR5 extracelluláris része között, a PRO140 pedig egy monoklonális antitest. A CXCR4-et gátló AMD3100 egy kis molekulatömegű biciklám vegyület.

Az utolsó lépés során megy végbe a HIV-1 vírus membrán fúziója. A HIV-1 gp41 három gp41 oligomerből kialakult trimer szerkezet (Weissenhorn és mtsai, 1996), és minden egyes oligomer a gp120-hoz kapcsolódik nem kovalens kötődéssel. Minden egyes gp41 oligomer három domént tartalmaz: egy intracelluláris domént (endodomén), egy transzmembrán részt és egy extracelluláris domént (ectodomén). A membránfúzióban az ectodomén vesz részt aktívan, amelynek N-terminális része tartalmaz egy hidrofób fúziós peptid szakaszt, a C-terminális része pedig egy HR1 és HR2 szakaszt (**7. ábra**).



7. ábra A HIV-1 gp41 szerkezete (Cooley és Lewin, 2003)

A gp41 fúzióképes szerkezetét „trimer-of-hairpin”-ként ismerjük, melyet megelőz egy a koreceptorhoz kötődés után kialakult „pre-hairpin” köztes állapot (**8. ábra**) (Eckert és Kim, 2001; Root és mtsai, 2001). A „hairpin” alak megkönnyíti a vírus és a gazdasejt membránjának az egymás mellé kerülését és érintkezését, a membránok összeolvadnak és így a vírus a sejtbe jut. A jelenleg vizsgált, membrán fúziót gátló anyagok az Enfuvirtide (T20, 36 aminosavból álló szintetikus peptid), a T-1249 (T-20 szerű peptid), az 5-Helix (a gp41 ectodomén C-terminálisából származó rekombináns peptid) és az IQN17 (kiméra N-peptid származék) (Cooley és Lewin, 2003; Pierson és Doms, 2003).



8. ábra A HIV-1 sejtbe jutásának utolsó lépése (Cooley és Lewin, 2003)

1.8. A sejtfelszíni redox folyamatok szerepe a HIV belépésében

Az előzőekben bemutatott jól ismert konformációváltozásokat a felvételben részt vevő proteinek egy részének redox változása kíséri. A CD4 négy immunglobulinszerű domént (D1-D4) tartalmaz. Ezen domének közül a D1, D2, és D4 domének tartalmaznak intramolekuláris diszulfidkötést (Wang és mtsai, 1990; Ryu és mtsai, 1990; Brady és mtsai, 1993). Az utóbbi időkben bizonyították azt, hogy a CD4 receptor kettes doménjének (D2) diszulfid kötése redoxaktív. Ezt a folyamatot a T-sejteken kiválasztott sejtfelszíni tioredoxin szabályozza (Matthias és mtsai, 2002; Matthias és Hogg, 2003; Hogg, 2003). Az ok, amiért a D2 domén diszulfid kötésének redox aktivitása fontos a HIV-1 fertőzéshez, még ismeretlen; valószínű, hogy a CD4 konformációváltozásáért lehet felelős. Egy másik, redox folyamatot katalizáló sejtfelszíni fehérje, a protein-diszulfid izomeráz (PDI) szintén felelős lehet a sejtfelszíni redox állapot változásáért. A gp120 CD4⁺ sejtekhez kötődése a gp120 glikoproteinben lévő kilenc diszulfid kötés közül kettőnek a hasításához vezet, mely a PDI-nek tulajdonítható (Gallina és mtsai, 2002; Barbouche és mtsai, 2003). A gp120-ban lévő diszulfid kötés hasítása azonban a kemokin receptorokhoz való kötődés után is kialakulhat. A tioredoxinnak és a PDI-nek jól elkülönülő szerepe van, ugyanis a tioredoxin a CD4-ben lévő diszulfidkötéseket hasítja, de a gp120-ban lévőket nem (Matthias és mtsai, 2002), míg a PDI a gp120-ban lévőket hasítja és a CD4-ben lévőket nem (Gallina és mtsai, 2002). A vírus-sejt fúzió tehát a redox folyamatokért felelős sejtfelszíni proteinek diszulfid kötések hasítása során kialakuló konformációváltozásán alapszik. Ez a változás szükséges ahhoz, hogy a HIV-1 sikeresen bejuthasson a gazdasejtbe.

Számos vírusnak és baktériumnak koleszterinben gazdag membrán tutajokra („raft”-okra) van szüksége ahhoz, hogy be tudjon lépni a gazdasejtbe. A HIV-1 replikációs ciklus több helyén szerepet játszhatnak a lipid „raft”-ok. Az eredmények azt sugallják, hogy a koleszterol gazdag lipid „raft”-okban található CD4 receptorok vesznek részt a HIV sejtbe való jutásában (Popik és mtsai, 2002; del Real és mtsai, 2002), de ezzel ellentétes adatokat is

publikáltak (Percherancier és mtsai, 2003). Igen fontos szerepük van a gazdasejtek szignál transzdukciós útvonalában, az intracelluláris szállításban és a virális proteinek összeszerelésében is (Campbell és mtsai, 2001).

1.9. HIV-1 replikáció gátlásának inhibitorai célpontok szerint

NRT inhibitorok: A virális DNS szintézis gátlásával megelőzhető a vírus replikáció. Az első engedélyezett HIV ellenes gyógyszer egy nukleozid analóg, a 3'-azido-2',3'-didezoxitimidin (AZT) volt. A nukleozid analóg gyógyszerek 3'-OH csoportja vagy hiányzik, vagy valamilyen más funkciós csoporttal van helyettesítve, így gátolja meg a 3'-5' foszfodiészter kötés kialakulását a meghosszabbítandó DNS lánc és a nukleotid-trifoszfát között. Az alábbi nukleozid analógok használatosak a klinikai kezelés során: AZT (zidovudine), ddC (zalcitabine), ddI (didanosine), 3TC (lamivudine), d4T (stavudine), ABC (abacavir). Számos újabb analóg fejlesztése van folyamatban és klinikai kipróbálás alatt (De Clercq, 2002).

NNRT inhibitorok: A HIV-1 RT kis méretű gátlószereinek másik nagy csoportját a nem nukleozid reverz transzkriptáz (NNRT) típusú inhibitorok alkotják. Ezek a vegyületek igen specifikusan gátolják a HIV-1 RT-t. Specifitásukra jellemző, hogy más polimerázokkal nem figyeltek meg kölcsönhatást. Biokémiai és szerkezeti vizsgálatok azt mutatják, hogy ezek az inhibitorok a HIV-1 RT p66-os alegységének hidrofób zsebéhez kötődnek (Smerdon és mtsai, 1994; Arnold és mtsai, 1996). Az első HIV-1 ellen kifejlesztett inhibitor molekulák a HEPT (1-[(2-hidroxietoxi) metil]-6-(feniltio)timidin) (Miyasaka és mtsai, 1989) és a TIBO (tetrahidroimidazo[4,5,1-jk]-[1,4]-benzodiazepin-2-(1H)-tion) vegyületek (Pauwels és mtsai, 1990) voltak. Klinikai használatba először a nevirapin került (Merluzzi és mtsai, 1990). Ezeken kívül még számos NNRT inhibitort fejlesztettek ki, melyek közül a teljesség igénye nélkül adok meg néhány vegyületet: TMC-120, TMC-125, DPC082, DPC083, DPC961, DPC963 (Corbett és mtsai, 2000), delaviridin, efavirenz, capravirin (Menéndez-Arias, 2002).

Proteáz inhibitorok: Másik nagy család, a HIV proteáz inhibitorok megakadályozzák a gag és gag-pol prekursor poliproteinek funkcionális fehérjékké processzálását, így akadályozzák a vírus érését és a keletkező virionok fertőzőképességét (Flexner, 1998). A proteáz a gag és gag-pol poliproteinekben a 167-es és 168-as pozícióban lévő fenilalanin-prolin között hasít. A jelenleg klinikai alkalmazásban lévő proteáz gátlószereket úgy alakították ki, hogy szerkezetük hasonlítson erre a peptid szakaszra. A peptid kötéssel ellentétben, ezekben a proteáz inhibitorokban (saquinavir, ritonavir, indinavir, nelfinavir és amprenavir) hidroxietilén kötések találhatók (Flexner, 1998; Molla és mtsai, 1998). A

peptidmimetikus HIV proteáz inhibitorokkal szemben kifejlődött rezisztencia miatt új, nem peptidszerű HIV proteáz inhibitorokat is kifejlesztettek a kutatók. Ilyenek a 4-hidroxikumarin, 4-hidrox-2-piron (Thaisrivongs és mtsai, 1994), szulfonamid szubsztituált származékok (Skulnick és mtsai, 1995), ciklikus urea (Lam és mtsai, 1996; Hodge és mtsai, 1996), ciklikus cianoguanidin (Jadhav és mtsai, 1998), aza-dipeptid (Bold és mtsai, 1998) és tipranavir (Poppe és mtsai, 1997) származékok.

Integráz inhibitorok: Az integráz enzim a HIV-1 DNS-t inzertálja a gazdasejt genomjába. Az integráció a virális genom és a HIV-1 génexpresszió stabil fenntartásához szükséges, ezáltal az integráz enzim is fontos terápiás célpont. Számos integráz ellenes gátlószert írtak le. Ilyen inhibitorok pl. az (-)-arctigenin (Eich és mtsai, 1996), 2-merkaptobenzolszulfonamidok, quinalizarin, purpurin, tetraciklinek (Hong és mtsai, 1998), poliamidok, biszdisztamycinek, lexitropszinok (Neamati és mtsai, 1998), hidroxibenzoésav és hidroxifahéjsav származékok (Desideri és mtsai, 1998).

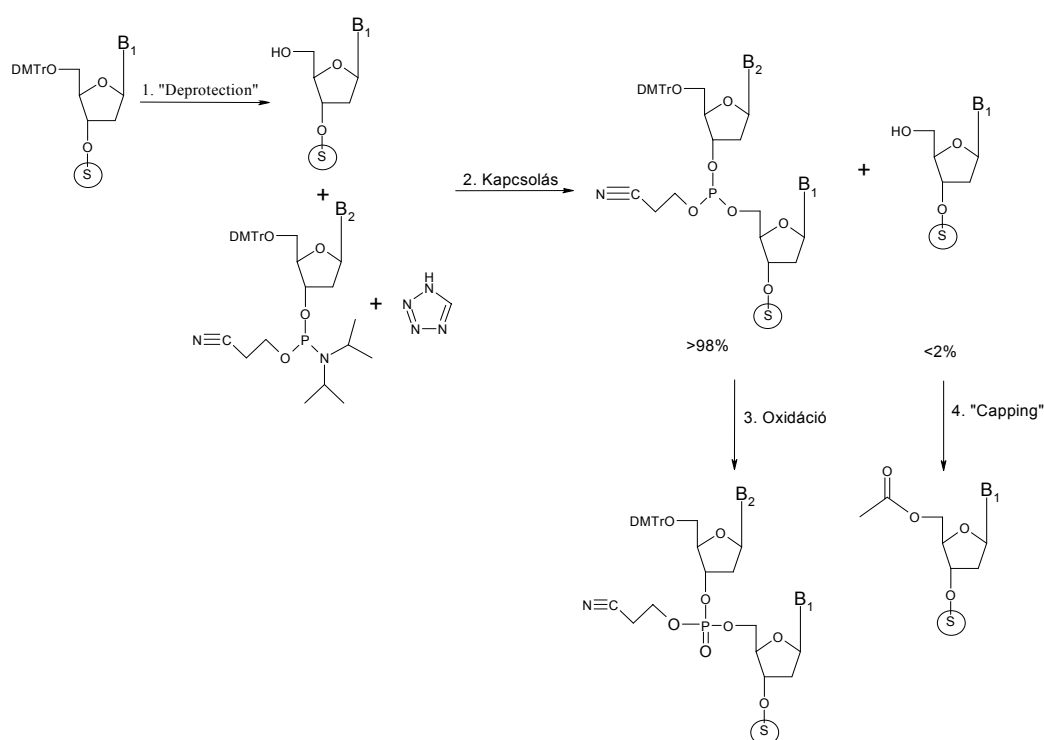
1.10. Exogén oligonukleotid inhibitorok

Az oligonukleotidok a virális replikáció különböző lépéseinek gátlására lehetnek alkalmasak (Galderisi és mtsai, 1999; Hélène, 1997). Zamecnik és munkatársai (1991) olyan antiszensz dezoxioligonukleotidokat állítottak elő, melyek különböző HIV-1 RNS szekvenciákkal voltak komplementerek. Ezek sejtkultúrában antivirális aktivitást mutattak (Matsukura és mtsai, 1987, 1989; Agrawal és mtsai, 1988, 1989; Goodchild és mtsai, 1988; Lisziewicz és mtsai, 1994). Nagyon sok gátló hatással rendelkező oligonukleotid esetében még nem határozták meg pontosan a gátlás molekuláris mechanizmusát. Mind az antiszensz, mind a tripla-hélixet képző oligonukleotidok szekvencia-specifikus nukleinsav-nukleinsav kölcsönhatással fejtik ki gátló hatásukat (Matsukura és mtsai, 1989). *In vitro* a foszforotioát internukleotid kötést tartalmazó oligodezoxicitidilát a CD4-hez kötődik, ahol gátolja a gp120/CD4 kölcsönhatást és a tisztított reverz transzkriptáz enzim polimeráz aktivitását is (Matsukura és mtsai, 1987; Majumdar és mtsai, 1989; Stein és mtsai, 1991; Yamaguchi és mtsai, 1997). HIV ellenes aktivitással rendelkeznek a foszforotioát kötést tartalmazó, főleg guanilátokból felépülő oligonukleotidok, bár más működési mechanizmussal (Buckheit és mtsai, 1994; Ojwang és mtsai, 1995; Jing és mtsai, 1998; Kuwasaki és mtsai, 2003). Korábban munkacsoportunk már kimutatta, hogy az 5-merkaptopirimidint tartalmazó oligo- és polinukleotidok igen erőteljesen gátolják a reverz transzkriptázt és *in vitro* a HIV-1 replikációt (Bardos és mtsai, 1992; Tőkés és Aradi, 1995).

1.11. Az oligonukleotidok kémiai szintézise

Az oligonukleotidok oldat- és szilárd fázisú kémiai szintézise egyaránt megvalósítható. A tíz nukleotidnál hosszabb oligonukleotidok előállítására a könnyű kezelhetőségű szilárd fázisú foszfit-triészter szintézis módszert használják. A módszer során dezoxiribonukleotid monomer egységek ismétlődő hozzáadásával (beépítésével) alakítható ki a kívánt oligonukleotid.

A szilárd fázisú foszfit-triészter szintézisnél (**9. ábra**) az első dezoxiribonukleozid általában a 3'-hidroxil csoporton keresztül egy oldhatatlan hordozóanyaghoz van kikötve, mely leggyakrabban ellenőrzött pórusú üveg (CPG).



9. ábra A szilárd fázisú oligo-dezoxiribonukleotid szintézis ciklusa foszfit-triészter módszerrel

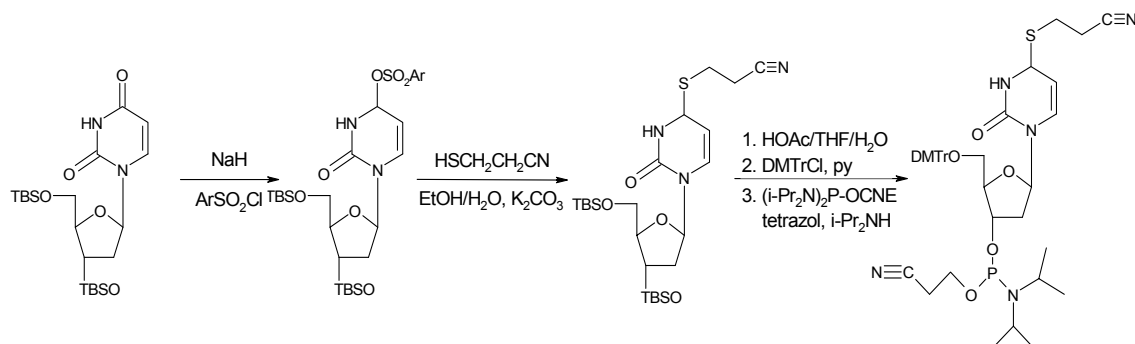
A folyamat első lépése során a hordozóra kikötött dezoxiribonukleozid 5'-hidroxil csoportjának védőcsoportja (dimetoxi-tritil csoport) lehasad, majd a kapcsolási lépésben (2. lépés) a tetrazollal aktivált 5'-O-dimetoxitritil-dezoxiribonukleozid-3'-foszforamidittal összekapcsolódik. A reakció során kialakult 3'-5' internukleotid foszfit-triészter kötés oxidálásával a sokkal stabilisabb és természetes 3'-5' foszfát-triészter kötés alakul ki (3. lépés). A hibás szekvenciák elkerülése végett szükséges az ún. „capping”. Ebben a lépésben a kis mennyiségű nem reagált szabad 5'-hidroxil csoport acetilálása történik, majd kezdődik előlről a szintetikus ciklus.

A szintézis végén a szilárd hordozón kikötve található meg a védőcsoportokkal ellátott teljes hosszúságú dezoxioligonukleotid a rövidebb, de korrekt szekvenciájú oligomerekkel együtt. Az oligonukleotidot 16 órán keresztül tömény NH_3 -val kezelve lehasadnak a védőcsoportok az oligonukleotidról, illetve az oligonukleotid a hordozóról (Gait, 1984).

1.12. Kéntartalmú nukleotidok és nukleinsavak szintézise

Bázison módosított kéntartalmú oligonukleotidok előállítása háromféle módszerrel lehetséges: 1. az elkészített oligonukleotid posztszintetikus módosításával, 2. a módosított monomer egység enzimatisz beépítésével vagy 3. módosított dezoxiribonukleotid kémiai beépítésével az oligonukleotidba.

Miura és mtsai (1973, 1980) az 1. módszer szerint dezoxicitidin átalakítását (nukleozidot, nukleotidot és nukleinsavat) folyékony kénhidrogénes kezeléssel végezték és így a bázis 4-es helyzetében lévő aminocsoportot tiokarbonil csoporttá alakították át. A tiokarbonil-csoport beépítése az uridin P_2S_5 kezelésével is megvalósítható (Kraszewski és mtsai, 1986). Enzimatisz, polinukleotid foszforilázsal Simuth és mtsai (1970) poli-4-tio-uridilátot szintetizáltak. A 3. módszerhez előállították a 4-tio-dezoxitimidint (Nikiforov és Conolly, 1992), illetve 4-tio-uridin- és 2'-dezoxi-4-tio-uridin-foszforamiditet (Coleman és Kesicki, 1994; Coleman és Siedlecki, 1992; McGregor és mtsai, 1996). Ez utóbbit az alábbiak szerint készítették el: 2'-dezoxiuridin 3' és 5' szabad hidroxil csoportját tercier-butil-dimetil-szilil csoporttal védtek, az így kapott vegyületet O^4 -2,4,6-triisopropil-fenilszulfonáttá alakították. 3-merkaptó-propionitrillel K_2CO_3 jelenlétében a szulfonát észtert, majd ecetsavas kezeléssel a szilil védőcsoportot távolították el. Ezt követően kialakították az 5'-hidroxil csoporton a dimetoxi-tritil, míg a 3'-hidroxicsoponton a foszforamidit csoportot (**10. ábra**).



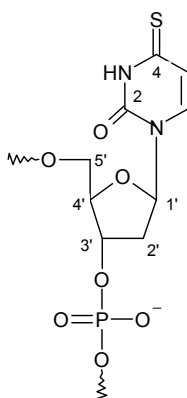
10. ábra A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit előállítása

2 PROBLÉMAFELVETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

Munkacsoportunk korábban már kimutatta, hogy a kizárólag 4-tio-dezoxiuridilátból felépülő 35-mer oligonukleotid, az $(s^4dU)_{35}$, potens inhibitora ($K_i = 3$ nM) a HIV-1 reverz transzkriptáznak (Tökés és Aradi, 1996). A munka logikus kiterjesztéseként ezután vizsgáltuk az oligonukleotid anti-HIV aktivitását, majd a biztató eredmények után két módszerrel a vegyület előállításának kémiáját, valamint antivirális hatásának mechanizmusát tanulmányoztuk. Céljainkat jelentősen segítette, és anyagilag is támogatta az Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézete (NIH) és egy gyógyszerfejlesztő cég, az OmniPharm Research Inc. (Buffalo, New York, USA). Doktori munkám során a fentiekben vázolt témában dolgoztam, a következő célkitűzésekkel:

1. Az $(s^4dU)_{35}$ anti-HIV aktivitásának vizsgálata (kooperációban a DEOEC Mikrobiológiai Intézetével).
2. Az $(s^4dU)_{35}$ szintézis körülményeinek precíz kidolgozása két módszerrel: előre elkészített oligonukleotid tiolálásával és tiolált monomerek kémiai kapcsolásával.
3. Nagymennyiségű (grammnyi) tiolált oligonukleotid előállítása mindkét módszerrel.
4. Kromatográfiás módszer kidolgozása az $(s^4dU)_{35}$ tisztítására.
5. Az $(s^4dU)_{35}$ kémiai analízise.
6. Az $(s^4dU)_{35}$ biokémiai jellemzése.
7. Az $(s^4dU)_{35}$ anti-HIV mechanizmusának tanulmányozása.

Itt kell megjegyeznem, hogy az $(s^4dU)_{35}$ szabatos megnevezése (35-tagú 4-tio-dezoxiuridilátból álló dezoxioligonukleotid) bonyolult és körülményes, ezért a vegyületet a munka során elneveztük „SULIGO VIR”-nek. A disszertációmban a továbbiakban ezt az elnevezést használom. Az $(s^4dU)_{35}$ elnevezése az NIH által irányított projektekben: NSC-722038. Az $(s^4dU)_{35}$ monomerének szerkezete (11. ábra):



11. ábra Az $(s^4dU)_{35}$ monomerének szerkezete

3 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Kémiai módszerek

3.1.1 A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit előállításához szükséges anyagok szintézise

3.1.1.1 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-2'-dezoxiuridin

2,81 g (12,3 mmol) 2'-dezoxiuridint 12 ml absz. piridinben oldottunk fel, majd hozzáadtunk részletekben 5 g (1,2 eq) bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil-kloridot. 40°C-on N₂ atmoszféra alatt 2 órán keresztül kevertük és jeges vízre öntöttük. A terméket kloroformmal extraháltuk, a szerves fázist 3x30 ml vízzel piridinmentesre mostuk, és magnézium-szulfát felett szárítottuk. A terméket oszlopkromatográfiásan kloroform-metanol (95:5) oldószerkeletben tisztítottuk. 5,808 g (89%). C₃₀H₃₀N₂O₇

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,72 (d, 1 H, C6-H); 7,32-7,07 (m, 8 H, ArH); 6,83-6,64 (m, 5 H, ArH); 6,32-6,25 (t, 1 H, C1'-H); 5,70 (d, 1 H, C5-H); 5,46-5,29 (m, 1 H, C3'-H); 4,11-4,00 (m, 1 H, C4'-H); 3,71 (s, 6 H, OCH₃); 3,51-3,36 (m, 1 H, C5'-H); 2,44-2,36 (m, 1 H, C2'-H); 2,36-2,29 (m, 1 H, C2'-H)

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 163,8; 150,5; 140,8; 129,7; 128,6; 127,1; 126,9; 104,3; 88,1; 84,9; 70,6; 62,8; 54,6; 42,3

3.1.1.2 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-2'-dezoxiuridin

1 g (1,885 mmol) 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-2'-dezoxiuridint 10 ml absz. piridinben oldottunk fel és 117 µl (1,1 eq) ecetsavanhidridet adtunk hozzá. 6 órán keresztül 40°C-on kevertük, majd jeges vízre öntöttük. A terméket kloroformmal extraháltuk, a szerves fázist 3x50 ml telített nátrium-hidrogénkarbonát oldattal semlegesítettük és 3x30 ml vízzel piridinmentesre mostuk. Magnézium-szulfát felett szárítottuk, a terméket oszlopkromatográfiásan kloroform-metanol (95:5) oldószerkeletben tisztítottuk. 982 mg (91%). C₃₂H₃₂N₂O₈

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,71 (d, 1 H, C6-H); 7,33-7,05 (m, 8 H, ArH); 6,79-6,68 (m, 5 H, ArH); 6,26-6,19 (t, 1 H, C1'-H); 5,69 (d, 1 H, C5-H); 5,48-5,25 (m, 1 H, C3'-H); 4,09-4,01 (m, 1 H, C4'-H); 3,71 (s, 6 H, OCH₃); 3,48-3,33 (m, 1 H, C5'-H); 2,43-2,37 (m, 1 H, C2'-H); 2,34-2,26 (m, 1 H, C2'-H); 2,05 (s, 3 H, COCH₃);

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 169,9; 159,2; 143,9; 129,8; 128,9; 127,7; 126,9; 113,2; 103,2; 87,3; 87,0; 84,6; 72,9; 63,4; 55,2; 43,2; 39,1; 33,2; 21,2;

3.1.1.3 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin

20 ml absz. acetonitrilben oldott 820 µl (10 mmol) N-metilimidazolhoz 0°C-on N₂ atmoszféra alatt 5 ml absz. acetonitrilben oldott 286 µl (3 mmol) POCl₃-t adtunk. Az elegyet 0°C-on 15 percig kevertük, majd eltávolítottuk a hűtőfolyadékot és 5 ml absz. acetonitrilben oldott 572 mg (1 mmol) 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-2'-dezoxiuridint adtunk hozzá. A szuszpenziót 3 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertük, ezalatt sárga csapadék vált ki az oldatból. TLC-n követve a reakciót, a keletkezett vegyület a startponton maradt. 261 µl (3 mmol) 3-merkaptó-propionitrilt 5 ml absz. acetonitrilben oldottan adtunk a reakcióelegyhez, majd 1,8 ml (10 mmol) diizopropil-etilamint is hozzáadtunk. A reakcióelegyet 3 órán keresztül szobahőmérsékleten kevertük, majd 150 ml vízre öntöttük és kloroformmal extraháltuk. Flash kromatográfiásan kloroform-etilacetát (8:2) oldószerkeletben tisztítottuk. 506 mg (79%). C₃₅H₃₅N₃O₇S

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,91 (d, 1 H, C6-H); 7,32-7,18 (m, 8 H, ArH); 6,72-6,61 (m, 5 H, ArH); 6,21-6,17 (t, 1 H, C1'-H); 5,89 (d, 1 H, C5-H); 5,36-5,22 (m, 1 H, C3'-H); 4,18-4,11 (m, 1 H, C4'-H); 3,85 (dd, 1 H, C5'-H); 3,73 (s, 6 H, OCH₃); 3,42-3,26 (m, 2 H, SCH₂); 2,86-2,74 (m, 2 H, CH₂-CN); 2,65-2,52 (m, 1 H, C2'-H); 2,29-2,19 (m, 1 H, C2'-H); 2,01 (s, 3 H, COCH₃);

¹³C NMR (90 MHz, CDCl₃) δ 175,4; 170,1; 158,8; 143,9; 140,1; 134,9; 129,8; 128,9; 127,7; 126,9; 117,8; 113,3; 103,2; 87,1; 86,9; 84,6; 73,8; 62,8; 55,2; 39,1; 33,2; 24,8; 20,8; 18,1; 17,8

3.1.1.4 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin

500 mg (0,78 mmol) 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-3'-O-acetil-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridint 5 ml absz. metanolban oldottunk fel, majd az oldat pH-ját 0,25 ml 0,1 M nátrium-metilát oldattal 8,0-8,5 közé állítottuk. A reakcióelegyet 24 órán keresztül 40°C-on refluxáltuk, majd 10 v/v % ecetsavat tartalmazó metanollal a pH-t 6,0-ra savanyítottuk. Az oldatot vákuumban bepároltuk és a terméket kloroform-metanol (95:5) oldószerkeletben Flash kromatográfiásan megtisztítottuk. 444 mg (95%). C₃₃H₃₃N₃O₆S

¹H NMR (360 MHz, CDCl₃) δ 7,26 (d, 1 H, C6-H); 6,58-6,34 (m, 8 H, ArH); 6,06-5,91 (m, 5 H, ArH); 5,38-5,32 (t, 1 H, C1'-H); 5,07 (d, 1 H, C5-H); 3,66-3,61 (m, 1 H, C3'-H); 3,28-3,21 (m, 1 H, C4'-H); 2,97 (s, 6 H, OCH₃); 2,71-2,48 (m, 3 H, C5'-H, SCH₂); 2,07-2,01 (m, 2 H, CH₂-CN); 1,86-1,76 (m, 1 H, C2'-H); 1,48-1,39 (m, 1 H, C2'-H)

^{13}C NMR (90 MHz, CDCl_3) δ 159,1; 144,8; 141,0; 143,9; 135,9; 130,8; 128,2; 127,1; 113,4; 104,1; 87,0; 86,5; 71,2; 62,8; 55,2; 42,2; 25,7; 18,9

3.1.1.5 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridin-3'-(O-(2-cianoetil)-N,N-diizopropil)-foszforamidit

400 mg (0,668 mmol) 5'-O-(Bisz-(4-metoxifenil)fenilmetil)-S-(2-cianoetil)-4-tio-2'-dezoxiuridint absz. diklór-metánban feloldottunk, majd hozzáadtunk 223 μl (2 eq) diizopropil-etilamint és utána 224 μl (1.5 eq) β -cianoetil-N,N-diizopropilamino-klór-foszforamidit és a reakcióelegyet 1 órán keresztül kevertük. A reakcióelegyet 2x50 ml 5%-os NaHCO_3 -tal semlegesre mostuk, majd diklór-metánnal extraháltuk. Flash kromatográfiásan trietilamin:etil-acetát:diklór-metán (10:45:45) oldószerkeletben tisztítottuk. A szerves fázist megszarítottuk MgSO_4 -on, bepároltuk és -20°C -on argon atmoszféra alatt tároltuk. 506 mg (79%). $\text{C}_{42}\text{H}_{50}\text{N}_5\text{O}_7\text{PS}$.

^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 8,09 (d, 1 H, C6-H); 7,36-7,24 (m, 9 H, ArH); 6,85-6,82 (m, 4 H, ArH); 6,2 (m, 1 H, C1'-H); 5,92 (d, 1 H, C5-H); 4,16-4,15 (m, 1 H, C3'-H); 4,11-4,08 (m, 1 H, C4'-H); 3,79 (s, 6 H, OCH_3); 3,52-3,38 (m, 7 H, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$, C5'-H, S- CH_2 , O- CH_2); 2,89-2,86 (m, 2 H, $\text{CH}_2\text{-CN}$); 2,77 (m, 1 H, C2'-H); 2,61-2,31 (m, 2 H, S- CH_2); 2,29 (m, 1 H, C2'-H); 1,33-1,21 (m, 12 H, $\text{NCH}(\text{CH}_3)_2$)

^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 174,9; 158,7; 153,5; 144,2; 140,7; 135,3; 130,1; 128,2; 127,9; 127,1; 118,1; 113,2; 103,1; 86,9; 85,7; 72,1; 62,1; 58,3; 55,2; 43,4; 41,1; 25,2; 24,6; 24,4; 18,2; 17,8;

^{31}P NMR (202 MHz, CDCl_3) δ 150,7; 150,3

ESI-MS m/z (relatív intenzitás) 806 ($100 \text{ M}^+ + \text{Li}$), számított: 799

3.1.2 A *Suligovir* szintéziséhez potenciálisan alkalmazható univerzális hordozók vizsgálata

Minden egyes hordozóból (Universal Support 500 (US 500) és Universal Support II (US II), Glen Research) 25 mg-ot tettünk egy-egy reaktor csőbe. A szintézist standard foszforamidit kémiával az 1,3 μmol -os oszlophoz való protokollt használva, a Pharmacia Gene Assembler Plus oligonukleotid szintetizáló készülékkel állítottuk elő. A védőcsoport eltávolítást és a hordozóról történő hasítást a Glen Research 4-tio-dezoxiuridin-foszforamidit termékéhez megadott feltételek betartásával végeztük (inkubálás: 50 mM NaSH cc. NH_3 -ban, 25°C -on 24 óráig). A védőcsoport eltávolítás után a megszintetizált $(\text{dT})_{16}$ oligonukleotidokat elsőként 14 térfogat normál-butanollal csaptuk ki, majd centrifugálást követően a csapadékot

desztillált vízben oldottuk fel, hogy újra kicsapjuk, mostmár 3 térfogat 96%-os -20°C-os etanollal. Az etanolos kicsapásnál a csapadék képződés elősegítése érdekében az oldat 10 mM MgCl_2 -t és 2M ammónium-acetátot tartalmazott. A kapott csapadékot 1 ml desztillált vízben oldottuk fel újra. A $(\text{dT})_{16}$ minták mennyiségét GeneQuant (Pharmacia) készülékkel határoztuk meg. A 3' terminálisan maradó foszfát csoportot foszfomonoészteráz enzimmal hasítottuk (60 nmol $(\text{dT})_{16}$, 100mM TrisHCl (pH 8,1), 5 mM MgCl_2) 100 μl -es reakcióelegyben 2 órán át 37°C-on. A reakcióelegyet jégen lehűtöttük és 100 μl 10%-os perklórsavval kevertük össze. A csapadékot centrifugálással távolítottuk el és a felülúszó anorganikus foszfát tartalmát meghatároztuk (Chen és mtsai, 1956). A foszfát tartalom meghatározása: a kapott 200 μl mintát vízzel 1 ml-re egészítettük ki és 1 ml Chen reagenst (600 μl 2M perklórsav, 200 μl 2,5% ammónium-molibdenát, 200 μl 10 % aszkorbinsav) adtunk hozzá. A reakcióelegyet 70 percig 37°C-on inkubáltuk és 820 nm-en spektrofotometriásan mértük. 2 nmol $(\text{dT})_{16}$ -ot roncsoltunk cc. perklórsavval az oligonukleotid teljes foszfát tartalmának meghatározásához. Összehasonlítottuk a teljes foszfát és a foszfomonoészterázzal hasítható 3' foszfát tartalmat és meghatároztuk a 3' foszforilált és nem foszforilált oligonukleotidok arányát. A $(\text{dT})_{16}$ -ot anioncserélő kromatográfiával az Äkta HPLC rendszeren is analizáltuk. Az elválasztást RESOURCE Q (6 ml) oszlopon végeztük 1 ml/ perc, 1 mM/perc NaClO_4 (5 mM TrisHCl (pH 8,2)) lineáris gradiens emelkedést alkalmazva.

3.1.3 A Suligovir A szintézise automata oligonukleotid szintetizáló készülékkel

A szintézist standard foszforamidit kémiával a 10 μmol -os oszlophoz való protokollt használva, a Pharmacia Gene Assembler Plus oligonukleotid szintetizáló készülékkel állítottuk elő. 330 mg 4-tio-dezoxiuridin-CPG szilárd hordozót használtunk minden egyes szintézis során. A foszforamidit koncentrációja 0,1 M és a tetrazol koncentrációja 0,45 M volt, összhangban a standard eljárással. Csak egy különbség volt a szokásos módszerrel összehasonlítva: kihagytuk a szabályos Capping oldatokat (Capping A és B) és helyette acetonnitrilt használtunk. Mivel a Suligovir egy homo-oligonukleotid, így az el nem reagált 5'-OH funkciós csoportokat nem kellett minden egyes szintézis ciklusban blokkolni (capping), hogy elkerüljük a hibás szekvencia keletkezését és ezáltal megnöveltük a szintézis során kapott oligonukleotid hozamát.

A védőcsoport eltávolítást és a hordozóról történő hasítást a Glen Research 4-tio-dezoxiuridin-foszforamidit termékéhez megadott feltételek betartásával végeztük (inkubálás: 50 mM NaSH cc. NH_3 oldatban, 25°C-on 24 óráig).

Minden egyes szintézisnél (10 μmol -os oszlop) 6 ml NaSH- NH_3 oldatot használtunk. 24 órás szobahőmérsékleten való állás után centrifugálással eltávolítottuk a szilárd hordozótól és a felülúszót összekevertük 600 μl 3 M nátrium-acetáttal (pH 5,2) és 30 μl 1 M MgCl_2 -dal, majd az oligonukleotidot kicsaptuk 17 ml -20°C-os etanollal. 30 perc -20°C-os állás után a kicsapódott oligonukleotidot centrifugálással (14000 rpm, 15 perc, Beckman JA20 rotor) összegyűjtöttük, vákuumban szárítottuk és -20°C-on tároltuk. Az egyszer kicsapott Suligovir mintákat desztillált vízben feloldva egyesítettük, szűrtük (Millex-GV PVDF 0,22 μm) és másodszor is kicsaptuk az előbb leírtak szerint, de most nem adtunk hozzá MgCl_2 -ot. A végül megkapott csapadékot kétszer mostuk 80%-os -20°C-os etanollal és az alkohol maradékot vákuumban távolítottuk el. A kapott terméket desztillált vízben feloldottuk, liofilizáltuk és lemért Wheaton csövekben argon atmoszféra alatt tároltuk.

^1H NMR (500 MHz, D_2O) δ 7,65 (1 H, C6-H); 7,48 (1 H, C6-H); 6,34 (1 H, C5-H); 6,03-6,01 (t, 1 H, C1'-H); 4,20 (1 H, C3'-H); 3,93 (3 H, C4',5'-H); 2,42-2,19 (dd, 2 H, C2'-H);

^{13}C NMR (125 MHz, D_2O) δ 174,9; 170,5; 148,6; 140,7; 103,1; 86,8; 85,6; 72,1; 62,1; 41,1

^{31}P NMR (202 MHz, D_2O) δ 0,1

3.1.4 A Suligovir B szintézise (dC)₃₅ H₂S-es kezeléssel

Ezen előállítási módszert munkacsoportunk korábban már kidolgozta Miura és munkatársai (1973, 1980) módszere alapján.

A (dC)₃₅ kémiai tiolálása: 80 mg (dC)₃₅-öt 5 ml víz-piridin (50:50) elegyben oldottunk fel és egy teflon betétet tartalmazó rozsdamentes acél bombába (PARR, 276 AC-T304-121698, Moline, IL) helyeztük. A bombát -70°C-ra hűtöttük le és 8 ml folyékony H_2S -t adtunk hozzá. A nagy nyomású bombát óvatosan lezártuk, majd 10 napig 55°C-on inkubáltuk. Ezután a bombát 4°C-ra hűtöttük és kinyitottuk. Szilárd anyagot is tartalmazó sárga színű oldatot kaptunk, melyet desztillált vízzel mostunk ki a teflon betétből, 7-8 ml zavaros oldatot kapva. Az oldatot 4°C-on tartottuk 1 óráig, majd a kivált finom szemcseméretű ként szűrővel (Millex-GV PVDF 0,22 μm) távolítottuk el és a filtert vízzel mostuk. A 8,5 ml tiszta sárga oldathoz 850 μl 3 M nátrium-acetátot és 42 μl 1 M MgCl_2 -t adtunk és 20 ml -20°C-os etanollal kicsaptuk. 30 perc -20°C-os állás után a kicsapódott oligonukleotidot

centrifugálással (14000 rpm, 15 perc, Beckman JA20 rotor) összegyűjtöttük, vákuumban szárítottuk és -20°C-on tároltuk. Az egyszer kicsapott Suligovir mintákat desztillált vízben feloldva egyesítettük, szűrtük (Millex-GV PVDF 0,22 µm) és másodszor is kicsaptuk az előbb leírtak szerint, de most nem adtunk hozzá MgCl₂-t. A végül megkapott csapadékot kétszer mostuk 80%-os -20°C-os etanollal és az alkohol maradékot vákuumban távolítottuk el. A kapott terméket desztillált vízben feloldottuk, liofilizáltuk és lemért Wheaton csövekben, argon atmoszféra alatt tároltuk.

¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 7,48 (1 H, C6-H); 6,34 (1 H, C5-H); 6,03-6,01 (t, 1 H, C1'-H); 4,20 (1 H, C3'-H); 3,93 (3 H, C4',5'-H); 2,42-2,19 (dd, 2 H, C2'-H);

¹³C NMR (125 MHz, D₂O) δ 190,3; 148,7; 140,7; 103,1; 86,8; 85,6; 72,1; 62,1; 41,1

³¹P NMR (202 MHz, D₂O) δ 0,1 ppm

3.1.5 A Suligovir A és B anioncserélő kromatográfiás tisztítása

A tiolált oligonukleotidot az Amersham-Pharmacia ÄKTA[®] PURIFIER kromatográfon RESOURCE[®] Q anion cserélő oszlopot (6 ml) használva tisztítottuk. 5 mM TrisClO₄-t (pH 8,2) tartalmazó NaClO₄ oldatot használtunk az elúcióra. 1 ml/perc áramlási sebességet és 1 mM/perc sókoncentráció növelést alkalmaztunk az elúció során. Egy tisztítás során 4 mg Suligovirt vittünk fel az oszlopra. A tisztítás után az oligonukleotid frakciókat liofilizáltuk, majd 100 µl desztillált vízben feloldottuk. 1 ml -20°C-os acetont adtunk az oligonukleotid oldathoz. 5 perc -20°C inkubálást követően az oldatot centrifugáltuk (14000 rpm, 10 perc, +4°C) és a keletkezett csapadékot mostuk kétszer 1 ml -20°C-os acetonnal.

3.1.6 Biotinált, Cy-5 és Cy-3 jelzett Suligovir szintézise

A jelzett oligonukleotidokat az A módszerrel állítottuk elő. Biotinnal a Suligovir 3' végét, míg a Cy-5 és Cy-3 jelzéssel az 5' végét láttuk el. A tisztítást a 3.1.5 pontban leírtak szerint végeztük.

3.1.7 A Suligovir A és B vizsgálata denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel

A Suligovir minták intaktságát denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel vizsgáltuk. Az oligonukleotidokat 15%-os denaturáló (7 M urea) poliakrilamid gélen választottuk el (500 V, 2 óra). Az oligonukleotid csíkokat ezüsfestéssel (PlusOne[®] „DNA

Silver Staining” kit, Amersham-Pharmacia) jelenítettük meg. Ez a festési eljárás különösen érzékeny kéntartalmú oligonukleotidok estében.

3.2. Biokémiai, sejtszbiológiai és virológiai módszerek

3.2.1 Sejtek

A Kit225 K6 human T lymphoma sejteket 10% FCS, penicillin, sztreptomycin antibiotikumok és rekombináns humán IL-2 jelenlétében RPMI 1640 mediumban tenyésztettük. Az N87 gyomor karcinóma sejteket 10% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 tápfolyadékban tenyésztettük.

3.2.2 A Suligovir A és B reverz transzkriptáz gátlásának vizsgálata

100 µl reakcióelegyet [(100 mM TrisHCl (pH 8,0), 6 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 100 µg/ml BSA, 5mM DTT, 10 µM [³H]dTTP (specifikus aktivitás 46 Ci/mmol), 0,1 µM templát-primer (a primer 3' végére számolva) és 0,1 U HIV-1 reverz transzkriptáz enzim)] 1 órán keresztül 37°C-on tartottunk. A Suligovir koncentrációjának változtatásával vizsgáltuk az enzimaktivásra kifejtett gátló hatását. A reakciót 100 mM Na-PPi-ot tartalmazó 10% 0°C-os TCA oldattal állítottuk le. A radioaktív terméket Whatman GF/C filterre szűrtük és mostuk négyszer 1 ml 50 mM Na-PPi-t tartalmazó 5% TCA oldattal, majd egyszer 96%-os etanollal. A filtereket szárítottuk és a nukleotid beépülést szcintillációs technikával mértük.

3.2.3 A Suligovir A és B HIV-1 replikáció gátlásának vizsgálata

Ezen vizsgálatokhoz HIV-1(IIIB) vírustörzset használtunk, mely tartósan fertőző H9 sejtkultúra sejtmentes felülszójából származott (Popovich és mtsai, 1984). Az MT-4 sejteket HIV-1(IIIB) vírus törzsszel fertőztük. A sejteket a fertőzés előtt 1 órával kezeltük oligonukleotid inhibitorral, majd 4 nap múlva meghatároztuk a felülszó reverz transzkriptáz aktivitását a már fentebb leírt assay-el (Hoffman és mtsai, 1985).

3.2.4 A Suligovir és tioredoxin közötti kovalens kölcsönhatás kimutatása

4 µg rekombináns tioredoxint (Sigma) és 2 µg biotinnal jelölt Suligovirt 12 µl ösztérfogató 10 mM TrisHCl-t (pH 7,5 és 8,5) tartalmazó elegyben 30 percig 37°C-on inkubáltunk. Az inkubálást követően 3 µl reakcióelegyet 7 M ureát tartalmazó 15%-os denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottunk. A termékeket PVDF membránra blottoltuk

(Millipore, Bedford, MA) (100 mA, 75 perc). A membrán szabad felületét 5% tejport tartalmazó TBST-vel [137 mM NaCl, 1% Tween 20, 20 mM TrisHCl (pH=7,6)] blokkoltuk, majd 1 órán keresztül 0,1% tejport és 1:750 arányban hígított torna peroxidázhoz kötött streptavidint (Amersham) tartalmazó TBST-vel inkubáltuk. A membránt 4x15 percig 20 ml TBST-vel mostuk és a biotinnal jelölt termékeket ECLTM-el (Amersham-Pharmacia) jelenítettük meg.

3.2.5 Áramlási citometriai mérések, kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatok

Az áramlási citometriai méréseket Becton Dickinson FACScalibur áramlási citométeren végeztük. A kompetíciós assay-ben fluoreszcensen jelölt monoklonális antitesttel és jelöletlen Suligovirt tartalmazó eleggyel inkubáltuk a sejteket. A kompetíció mértékét a jelölt antitest fluoreszcenciájának részleges csökkenéséből számoltuk.

A FRET mérések során Cy-3-mal jelölt monoklonális antitesttel (donor) és Cy-5-tel jelölt Suligovirrel (akceptor) jelöltük egyidejűleg a sejteket. Négy fluoreszcencia intenzitást detektáltunk. Hármát 488 nm-en gerjesztettünk és külön-külön 530 ± 30 nm-en, 585 ± 42 nm-en és 670 nm felett detektáltuk, míg a negyediket 635 nm-en gerjesztettük és 661 ± 16 nm-en detektáltuk. A különböző fluoreszcencia csatornák közötti spektrális átfedésre használt korrekciós faktorokat a jelöletlen és egyszeresen jelölt sejtekből származó mérési adatokból kaptuk meg. A számított energia transzfer hatékonyságot a következőképpen fejeztük ki: azon gerjesztett molekulák számát, melyek az akceptor molekuláknak átadták energiájukat, osztottuk az összes gerjesztett molekula számával.

3.2.6 A Suligovir A és B nukleázokkal szembeni stabilitása

A reakcióelegy összetétele: 100 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 1250 µg/ml oligonukleotid (Suligovir A vagy B vagy (dC)₃₅), 50 µg/ml kígyóméreg nukleáz [Crotalus durissus (Boehringer Mannheim)], 25 µg/ml dezoxiribonukleáz I [(3000 Kunitz U/mg protein (Sigma)] és 0,025% NaN₃ volt 500 µl össztérfogatban. A reakcióelegyet 37°C-on inkubáltuk és a jelzett időpontokban 40 µl térfogatokat vettünk ki. A nukleázos kezelést hőinaktiválással állítottuk le (5 perc, 95°C), és 2 µl (20 µg/µl) placenta foszfatáz oldatot adtunk hozzá. A reakcióelegyet 1 órán keresztül 37°C-on tartottuk. 5 perc 95°C-on való hőkezeléssel inaktiváltuk a foszfatáz enzimet és a reakcióelegyet 0°C-ra hűtöttük le. A denaturált proteint

centrifugálással távolítottuk el. A szervesen foszfát mennyiségét 30 µl felülúszóból a már fentebb leírt módszerrel határoztuk meg.

3.2.7 Toxicitási vizsgálat humán csontvelő granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésén keresztül

A Suligovir humán csontvelő granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésére kifejtett hatását egy már leírt módszer szerint végeztük el (Benkő és mtsai, 1999). Röviden: kolóniánként 10^5 db csontvelő sejtet tartalmazó agar táptalajt 5-180 µg/ml koncentráció tartományban kezeltük Suligovirrel. A sejteket 14 napig inkubáltuk 37°C-on 3 v/v% CO₂ jelenlétében. A protokollt a Debreceni Egyetem Területi és Intézeti Etikai Bizottsága hagyta jóvá (DEOEC RKEB/IKEB-2055/2003).

3.2.8 Antitestek és sejtfelszíni molekulák jelölése, konfokális lézer szkennning mikroszkópiás (CLSM) vizsgálatok

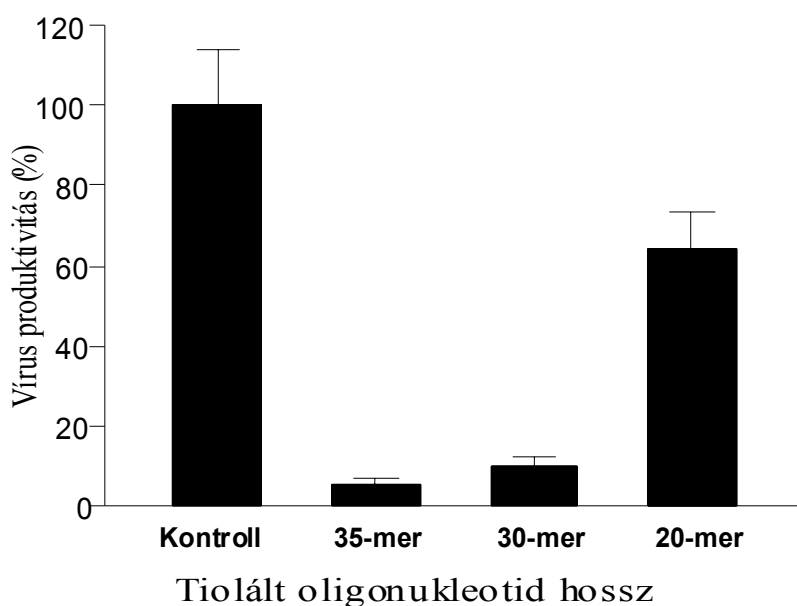
A CD4 molekula ellenes MEM115 és a CD48 molekula ellenes MEM102 monoklonális antitesteket Vaclav Horejssi-től kaptuk (Institute of Molecular Genetics, Prága, Csehország). A jelölésre használt antitestek vagy Alexa 546 szukcinimidil-észterrel (Molecular Probes, Eugene, OR) vagy a Cy-3 és Cy-5 szulfoindo-cianin szukcinimidil bifunkciós észter származékokkal voltak jelölve (Sebestyén és mtsai, 2002).

A sejt felszíni antigének jelölésére 50 µl össztérfogatú PBS-ben [137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA (pH=7,3)] 10^6 sejtet fluoreszcensen jelölt molekulákkal 30 percig sötétben inkubáltunk. Az összes lehetséges kötőhelyet 50-100 µg/ml antitest koncentrációt használva telítettük. A feleslegben maradt antitestet a sejtek kétszeri PBS-es mosásával eltávolítottuk.

4 EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

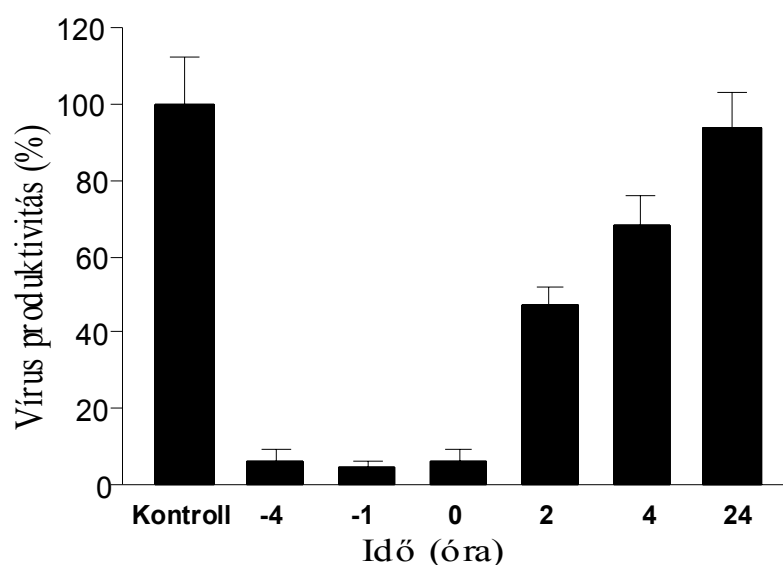
4.1. A 4-tio-dezoxiuridilát tartalmú oligonukleotidok anti-HIV aktivitásának vizsgálata

Különböző lánc hosszúságú 4-tio-dezoxiuridilátot tartalmazó oligonukleotidok anti-HIV aktivitását vizsgáltuk. A lánc hossz növekedésével nemlineáris módon növekedett a gátlás erőssége, a legmagasabb antivirális aktivitással a 35-tagú oligonukleotid, a Suligovir rendelkezett (**12. ábra**). A Suligovirt alkotó 4-tio-dezoxiuridilát tiono-tiol tautomer átalakuláson mehet keresztül. A kialakuló tiol forma diszulfid kötésekkel alakíthat ki más, -SH csoportokat tartalmazó anyagokkal, pl. ciszteint tartalmazó fehérjékkel. A 4-tio-dezoxiuridin szerepének fontosságát erősíti az a tény is, hogy ugyanilyen lánc hosszú dezoxiuridint tartalmazó homo-oligomer viszont nem gátolja a HIV replikációt. A tiolált oligonukleotid antivirális aktivitásának lánc hosszfüggése azt mutatja, hogy a 4-tiono vagy 4-merkaptó csoport jelenléte egyedül nem elégséges a vírus belépésének megakadályozására. Ez a lánc hosszfüggés egy aptamerszerű hatás vagy egy méretfüggő affinitás következménye lehet, ahol az antivirális célpont(ok)hoz kapcsolódás feltétele a hidrofób és/vagy az ionos kölcsönhatás. Hasonló lánc hosszfüggést figyeltek meg más oligonukleotid alapú vírus belépést gátló inhibitorok esetében is (Matsukura és mtsai, 1987; Bardos és mtsai, 1992).



12. ábra $(s^4dU)_n$ ($n=20, 30, 35$) molekulák HIV replikációra kifejtett gátlásának vizsgálata

Az antivirális aktivitás vizsgálatára ezért a továbbiakban már csak a 35-tagú molekulát, a Suligovirt használtuk. Ha a vírus infekcióval megegyező időben vagy a fertőzést megelőzően kezeltük a sejteket 1 µg/ml koncentrációjú Suligovirrel, akkor a vírus replikációt mintegy 90-98%-kal gátolta (**13. ábra**). Azonban ha a vírusfertőzés után adtuk az MT4 sejtekhez Suligovirt, akkor a gátlás hatékonysága jelentősen lecsökkent. Eredményeink azt mutatják, hogy a Suligovir a vírus replikációs ciklusát már egy korai fázisban, valószínűleg a vírus sejtbe való belépésekor gátolja. Későbbi biológiai vizsgálataink során arra kerestük a választ, hogy ez a vírusfertőzés korai szakaszára gyakorolt gátlás milyen mechanizmus szerint játszódik le.



13. ábra MT-4 sejtek 1 µg/ml koncentrációjú Suligovir kezelése a vírus infekciótól számított különböző időpontokban

4.2. A Suligovir szintézise

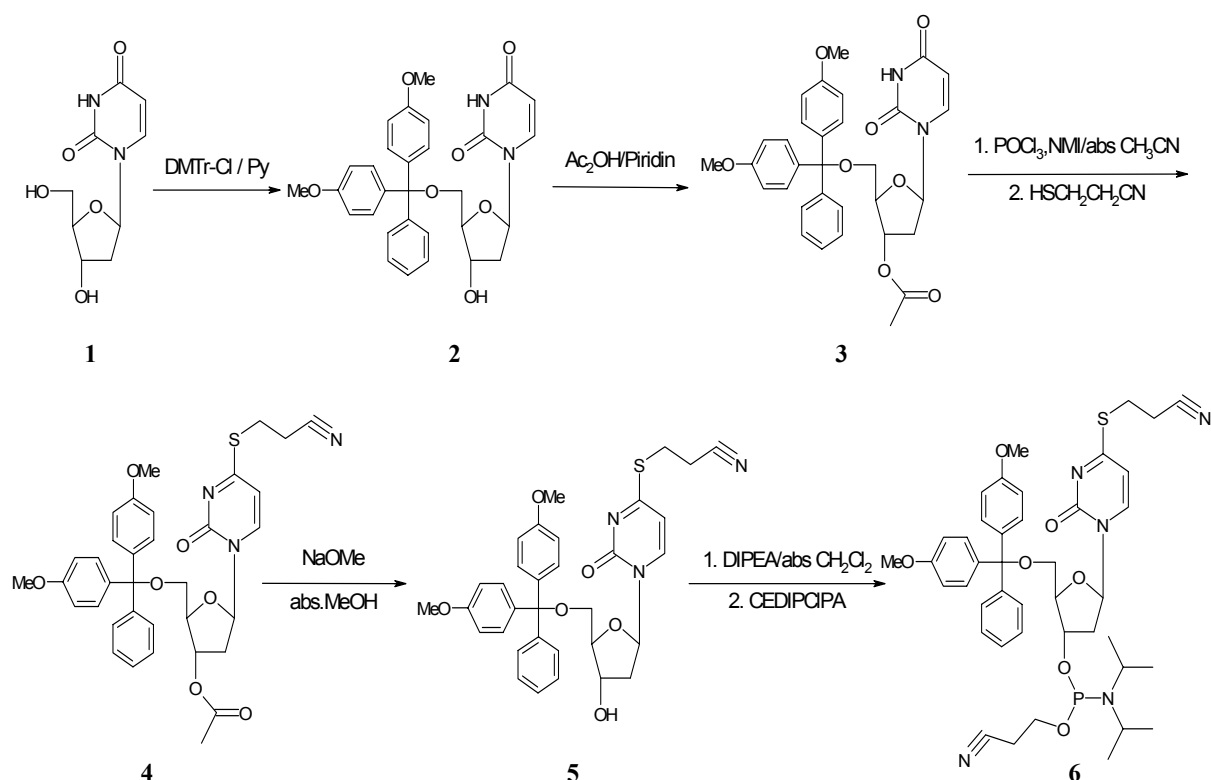
A további vizsgálatok elvégzéséhez szükséges volt olyan módszer(ek) kidolgozása, amely(ek) során a Suligovirt megfelelően nagy mennyiségben, kémiaiilag egységesen, tiszta állapotban tudjuk előállítani.

Kétféle módszert dolgoztunk ki a Suligovir előállítására:

- A. Automata oligonukleotid szintetizálóval, mely védett 4-tio-deoxiuridin-foszforamidit épít be (A módszer).
- B. (dC)₃₅ kémiai tiolálásával (B módszer)

4.2.1 A 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit szintézise

A Suligovirt az A módszernél standard foszforamidit kémiával (Gait, 1984) állítottuk elő. Ezen módszer kulcsvegyülete az 5'-dimetoxitritil-2'-dezoxi-4-(2-cianoetil-tio)-uridin-3'-[(2-cianoetil)-(N,N-diisopropil)]-foszforamidit (**6**) (röviden: 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit). A kereskedelmi forgalomban ugyan kapható a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit, de magas ára miatt (2700 \$/g) célszerűnek tűnt a vegyület laboratóriumi előállítása. Bár az irodalomban a vegyület előállítását már leírták (Coleman és mtsa, 1991, 1994), mi egy módosított, előnyösebb előállítási módszert dolgoztunk ki (**14. ábra**).



14. ábra 4-tio-dezoxiuridilát foszforamiditjének kémiai szintézise

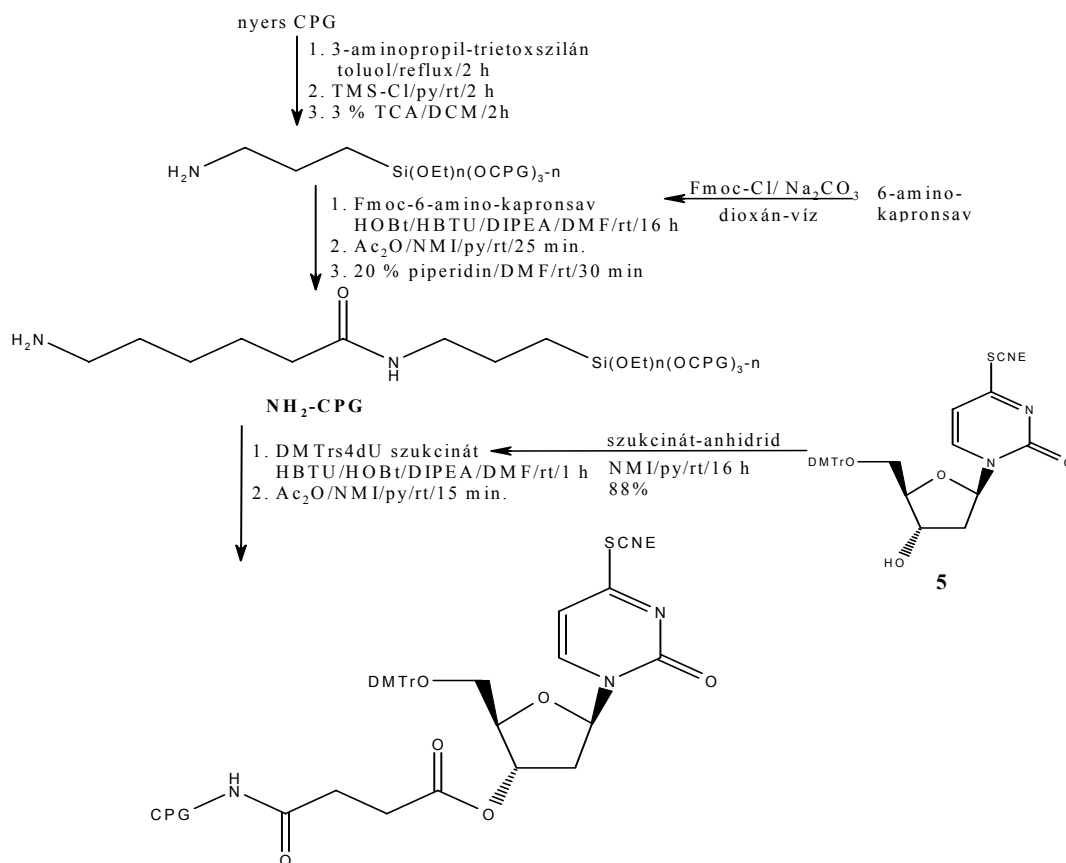
2'-dezoxiuridint (**1**) piridinben dimetoxitritil-kloriddal kezeltünk, majd a kapott 5'-dimetoxitritil-2'-dezoxiuridint (**2**) ecetsavanhidriddel acetilezve kaptuk a **3**-as terméket. Az acetil védőcsoport előnye az irodalomban leírt savérzékeny terc-butil-szilil védőcsoporttal szemben, hogy gyenge lúgos közegben (pH=7,5) könnyen lehasad, de a későbbiekben kialakított ciano-etil csoport ezen a pH-n stabilis. Így a 4-tio-dezoxiuridilát foszforamidit szintézisnek már az elején kialakíthattuk a savlabilis dimetoxitritil védőcsoportot. Az ezt követő „one-pot” reakcióban előállítottuk a számunkra fontos 2-cianoetil-tio funkciós csoportot tartalmazó **4**-es vegyületet. A **4** Zemplén szerinti dezacetilezését követően 2-

cianoetil-N,N-diizopropil-klór-foszforamidot reagenssel a megfelelő 4-tio-dezoxiuridin foszforamidot (6) kaptuk. A szintézis minden egyes lépését NMR és TLC módszerekkel követtük, a végső terméket tömegspektrometriával is karakterizáltuk (Anyagok és módszerek).

4.2.2 A 4-tio-dezoxiuridin-support szintézise

Amikor a Suligovirt az A módszerrel szintetizáljuk, az első 3' nukleozid szilárd hordozóra van kikötve. Az oligonukleotid szintézishez a kereskedelmi forgalomban kapható a 4 természetes és néhány módosított 3' nukleozidot tartalmazó szilárd hordozó. Mivel 4-tio-dezoxiuridint tartalmazó hordozó nincs forgalomban, ezért szükséges volt megvizsgálni, hogy potenciálisan alkalmasak-e az ún. univerzális hordozók a Suligovir szintézisére. Az univerzális hordozó anyagok nem tartalmaznak nukleotidokat, az első beépülő nukleotid egység foszfát csoporton keresztül kötődik hozzájuk. Vizsgálni kívántuk, hogy a foszfát csoport a „deprotection” eljárás során az oligonukleotid 3' hidroxil csoportján marad, vagy a hordozóval együtt leválik. A folyamat tanulmányozására modell vegyületként (dT)₁₆-ot szintetizáltunk, felhasználva a Glen Research két különböző univerzális hordozóját (US 500 és US II). Az US 500-as szilárd hordozón szintetizált (dT)₁₆ oligonukleotid 57,2 %-a az US II-n előállított oligonukleotid 97,2 %-a volt a 3' végén foszforilálva. Ezeket az eredményeket megerősítették az oligonukleotidok anioncserés kromatográfiás vizsgálatai is. Ugyan a 3' foszfát csoportot könnyen eltávolíthatjuk foszfomonoészteráz enzimmel végzett emésztéssel, de ez egy új enzimátikus és tisztítási lépést tenne szükségessé. Mivel a kapott eredmények alapján az univerzális hordozókat nem alkalmazhatjuk az oligonukleotid szintetizáló készülékben Suligovir előállítására, ezért szükség volt a 4-tio-dezoxiuridin-CPG előállítására.

A 4-tio-dezoxiuridin-CPG előállítását az **15. ábrán** mutatom be. A kapcsolásokat egymást követő lépésekben végeztük el, felhasználva a korábban kapott 4-tio-dezoxiuridin védett származékát (5) is. A szintézis egyes lépéseiben kapott termékeket nem karakterizáltuk külön-külön, csak a kívánt CPG végterméket.



15. ábra A 4-tio-dezoxiuridin-CPG előállítása

A 4-tio-dezoxiuridin-CPG-t acetonitrillel mostuk, majd meghatároztuk a 4-tio-dezoxiuridin CPG fedettségét. A mérés során 15 ml 70% perklórsavat és 50 ml etanolt tartalmazó oldattal hasítottuk a cukorgyűrű 5'-hidroxil csoportjához kapcsolódó dimetoxi-tritil csoportot (DMTr) és 495 nm-en fotometriásan mértük az abszorbanciát. 45 $\mu\text{mol/g}$ felületi fedettségű 4-tio-dezoxiuridin-CPG-t kaptunk.

4.2.3 A Suligovir A és B szintézise

A Suligovir A előállításánál 4-tio-dezoxiuridin-foszforamidit és 4-tio-dezoxiuridint tartalmazó supportot használtunk fel. 10 óra alatt 10 μmol -os reaktorcsőben 30 mg mennyiségű Suligovirt szintetizáltunk. A módszer hátránya, hogy a felhasznált anyagokat bonyolult kémiai szintézissel kaphatjuk csak meg (lásd az előző fejezetekben) és az előállítási költségük magas. A módszer előnye, hogy különböző kémiai jelzéseket (Cy-5, Cy-3, biotin, stb.) kapcsolhatunk a Suligovirhez.

A Suligovir előállítását a B módszer során a már készen lévő (dC)₃₅ folyékony kénhidrogénnel történő kémiai átalakítással végeztük (Miura és mtsa, 1980; Tőkés és Aradi, 1996). Itt be nem mutatott kísérletekben meghatároztuk, hogy a (dC)₃₅ teljes tiolálálására 10

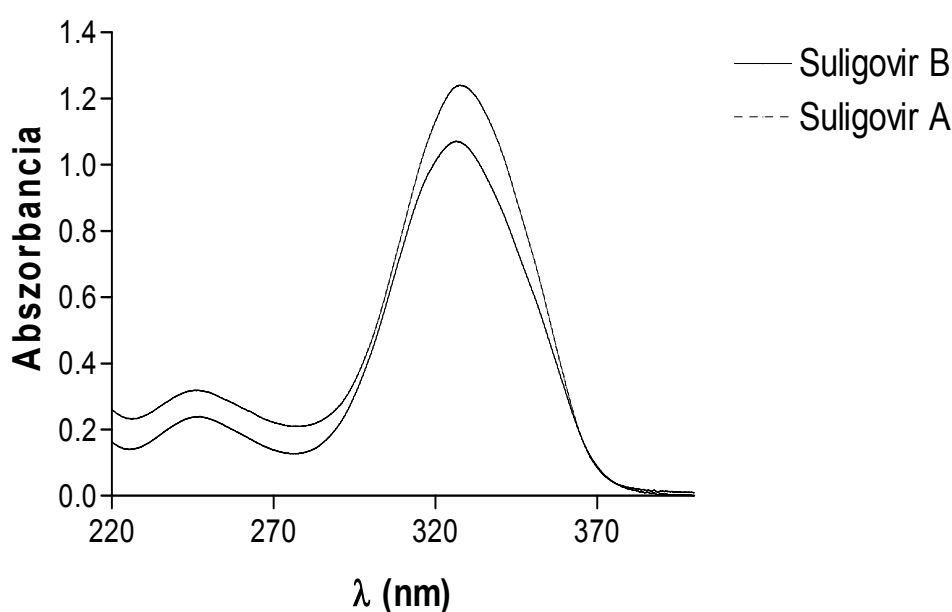
napos reakcióidőre van szükség. A módszer előnye, hogy az előállítási költség tizedakkora, illetve az, hogy a H₂S-es kezelés után csaknem teljesen tiolálódott Suligovir B-t kaptunk (lásd később). Így nagymennyiségű Suligovir előállításra ez a módszer sokkal alkalmasabb. Ezen módszer hátránya a meglehetősen lassú (10 napos) reakcióidő, illetve az, hogy az általunk használt bombában egy tiolálás során csak 80 mg (dC)₃₅-t tudtunk átalakítani.

4.3. A két módszerrel előállított Suligovir jellemzése

A szintézis módszerek különbözőségéből adódóan meg kellett vizsgálnunk, hogy az előállítások során kapott termékek (Suligovir A és B) kémiai és biokémiai tulajdonságai között van-e valamilyen különbség.

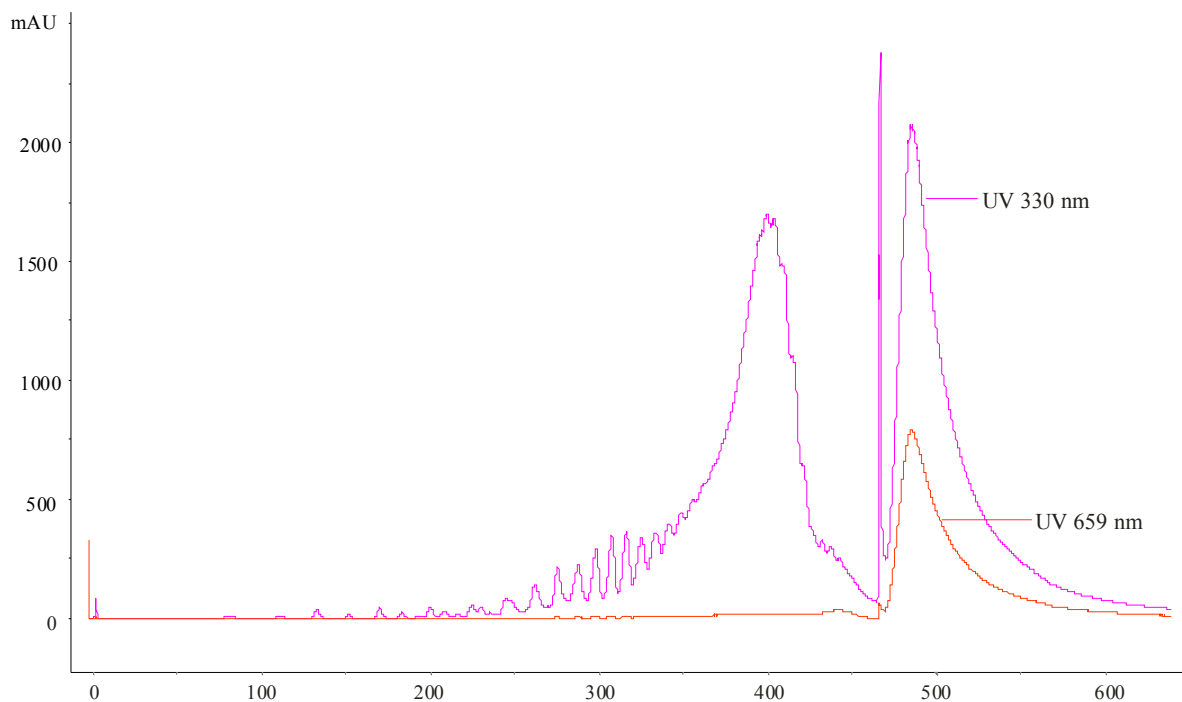
4.3.1 A Suligovir kémiai jellemzése

Összehasonlítottuk a két módszerrel kapott Suligovir A és B UV spektrumát (16. ábra), vizsgálva a 247 nm, 270 nm és 327 nm hullámhosszokon mért abszorpció arányukat. A dezoxicitidilátnak 270 nm-en, a 4-tio-dezoxiuridilátnak pedig 327 nm-en van abszorpciós maximuma (Scheit, 1968). Ha a tiolálás hatékonysága nem megfelelő, akkor 270 nm-es hullámhosszon a spektrum „völgye” kiegyenesedik az el nem reagált citidilát jelenléte miatt. A Suligovir A és B UV spektruma és az egyes hullámhosszokon mért abszorbanciák aránya lényegesen nem tért el egymástól, ezáltal a tioláltság mértékét is hasonlóra becsülhettük ezzel a módszerrel.



16. ábra A Suligovir A és B UV spektruma

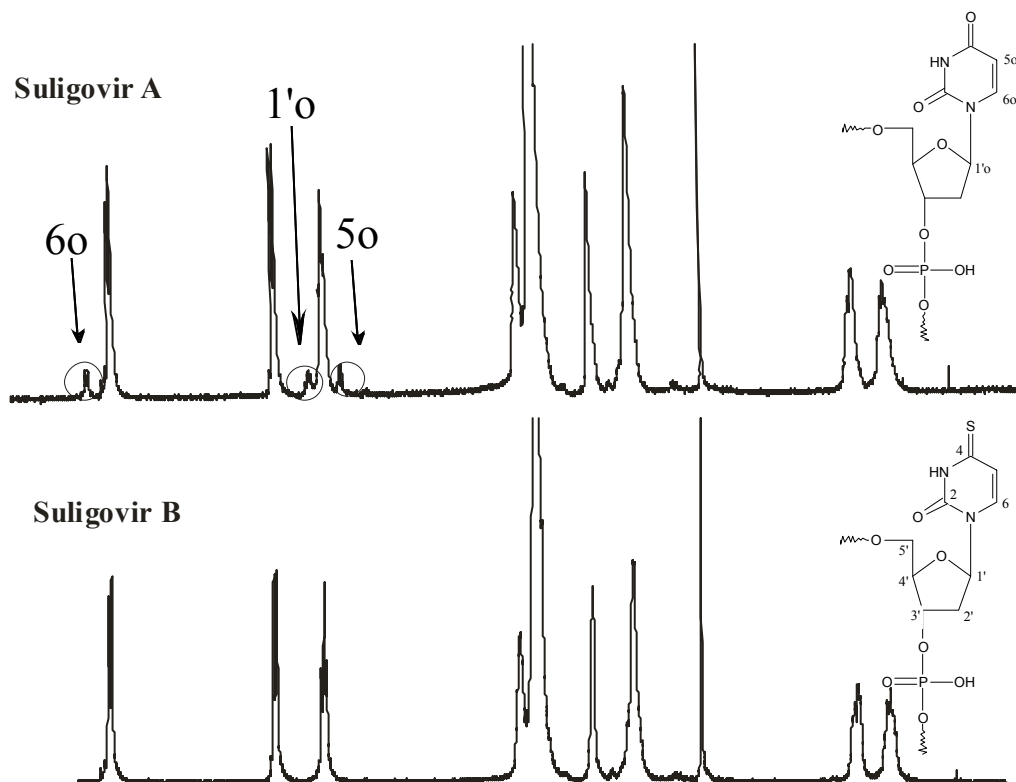
Az elkészült Suligovir A és B minták tisztaságát 15%-os denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel ellenőriztük. A kapott termékek nagy mennyiségben tartalmaztak rövidebb lánchosszú oligonukleotidot is. Szükséges volt ezért egy milligrammos léptékű oligonukleotid tisztítási eljárás kidolgozására, mert a poliakrilamid gél elektroforézis (PAGE) nem használható preparatív méretekben az oligonukleotid tisztítására a limitált mennyiség (kb. 500 μg), az alacsony hozam (20-30%) és a preparátum akrilamidgél szennyeződése miatt. Az anioncserélő kromatográfiás módszerrel nagy mennyiségű, kémiaiilag módosított oligonukleotidot is lehet tisztítani (Deshmukh és mtsai, 2000). A tisztítható mennyiséget csak az oszlop mérete limitálja. E módszer során a kívánt tisztított terméket magas sókoncentrációjú oldatban kaphattuk volna meg. A nagy mennyiségű sótól munkaigényes és drága tisztítási eljárással lehetne megszabadulni, mint amilyen a dialízis vagy a gél permeációs kromatográfia. A bonyolult sómentesítési lépést elkerülendő kidolgoztunk egy új eljárást (Horváth és Aradi, 2005), amelynél nagy ionerősséggel rendelkező nátrium-perklorát oldatot használtunk. Az anioncserélő kromatográfia során a tiszta oligonukleotidokat egy részleges bepárlást követően, az oligonukleotid acetonos kicsapásával kaphattuk meg, mivel a nátrium-perklorát acetonban jól oldódik. Így a Suligovir A-t és B-t tisztán, milligrammos mennyiségben kaptuk meg. A homogenitásukat 15%-os denaturáló poliakrilamid gél elektroforézissel ellenőriztük. Az általunk kidolgozott kromatográfiás eljárással tisztítottuk meg a Cy-5, Cy-3 és biotinnal jelölt Suligovirt is anélkül, hogy a jelölő anyagok szerkezetében valamilyen nem kívánt változás ment volna végbe. A módszer hatékonyságának demonstrálására bemutatom a Cy-5 jelzett Suligovir kromatográfia elúciós profilját (detektálás: Cy-5, 659 nm; $s^4\text{dU}$, 330 nm) (**17. ábra**). A Cy-5 jelzett Suligovir elúcióját követő bepárlást és az acetonos kicsapást gyorsan el kellett végezni, ugyanis ez az oligonukleotid sokkal erősebben kötődik az anioncserélő oszlophoz, így az csak magasabb nátrium-perklorát koncentrációnál eluálódott. A megnövekedett só azonban oxidálhatja a 4-tio-dezoxiuridin tio csoportját a nátrium-perklorát erős oxidálóképessége miatt, ha nem sietünk a só acetonos eltávolításával.



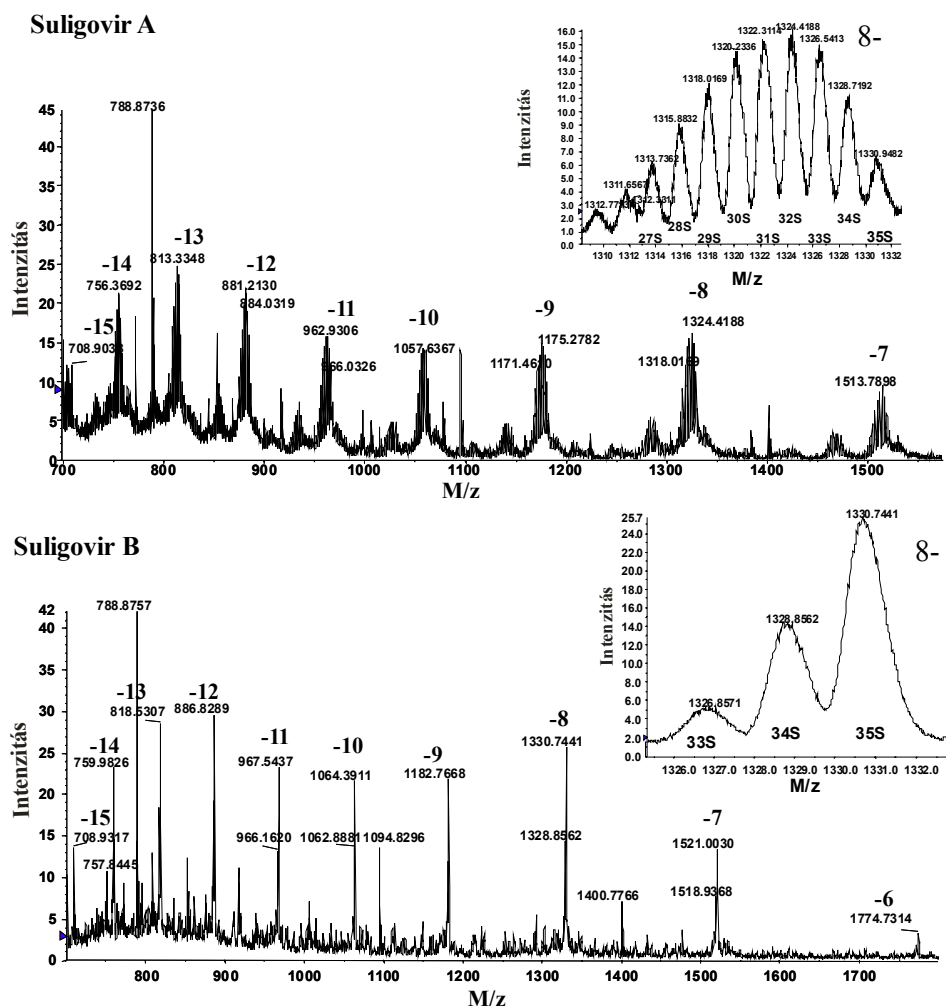
17. ábra Cy-5 Suligovir anioncsrlő kromatográfiás elúciós profilja

Szükséges volt eldönteni, hogy a kétféle módon készített Suligovir kémiai szerkezetében található-e különbség. Ezért Bruker Avance 360 NMR készülékkel ^{31}P -NMR, ^{13}C -NMR és ^1H -NMR spektrumokat vettünk fel. A ^1H -NMR spektrumban szobahőmérsékleten nyolc jel volt látható. A jelek azonosítását kétdimenziós ^1H - ^1H korrelációs spektroszkópiával végeztük (2D ^1H - ^1H COSY). A Suligovir A ^1H NMR spektrumában plusz jeleket detektáltunk, ami valamilyen melléktermék jelenlétét mutatta. A melléktermék egyes jelei (6,05 ppm; 6,27 ppm és 7,79 ppm), melyeket az $5'\text{O}$, $1'\text{O}$ és $6'\text{O}$ hidrogének ^1H jeleként azonosítottunk, jól láthatóan elkülönülnek a többi jeltől (**18. ábra**). Az egyes jelek integráljainak arányából megállapíthattuk, hogy a melléktermék és a kívánt vegyület aránya 1:10. A melléktermék többi jele átfedésben volt a főtermék jeleivel. A Suligovir B esetében ilyen, melléktermék jelenlétére utaló plusz jeleket nem detektáltunk a ^1H NMR spektrumában. A Suligovir A és B ^{13}C NMR spektrumában gyakorlatilag eltérést nem tapasztaltunk, sem a jelek számában (9), sem az egyes jelek kémiai eltolódásában. J-modulált ^{13}C spektrum és ^{13}C - ^1H heteronukleáris korrelációs spektroszkópia (HETCOR) segítségével beazonosítottuk az egyes jeleket. A Suligovir A J-modulált ^{13}C spektrumában a kisebb érzékenység miatt nem tudtuk kimutatni a melléktermék jeleit. Mindkét mintánál a ^{31}P -NMR spektrumában azonos kémiai eltolódásnál (0,1 ppm) kaptuk meg az oligonukleotidokra jellemző ortofoszfát csoport jelét.

A Suligovir A és B ^1H NMR spektrumában talált különbséget kiváltó okot közelebbről is tanulmányozni kívántuk, ezért tömegspektrometriás vizsgálatot végeztünk mindkét mintára. Kromatográfiásan tisztított Suligovir mintákat használtunk. A Suligovir A esetében részlegesen tiolált 35mer oligonukleotidokat nagy arányban detektáltunk, jelezve azt, hogy a „deprotection” lépés alatt „kénvesztés” történt. A megfelelő jelek között 16 tömegegységnyi különbségek voltak, ami azzal magyarázható, hogy a bázis 4-es helyzetében lévő kén jelentős része oxigénre cserélődött ki. Így molekulánként átlagosan 31-32 ként tartalmazott a 35 tagú oligonukleotid (**19. ábra**). A tömegspektrometriai vizsgálatok alátámasztották az NMR eredményeket és magyarázatot nyújtottak a melléktermék kialakulására és szerkezetére. A Suligovir A 11,7% deoxiuridint tartalmazott (az NMR-rel kapott arány 1:10), míg a $(\text{dC})_{35}$ tiolálása gyakorlatilag teljesnek tekinthető, hiszen az így kapott Suligovir B mindössze 1,34 %-ban tartalmazott deoxiuridint (NMR-rel nem volt detektálható a melléktermék jelenléte). A Suligovir molekulatömege: $M=10649$ g/mol. A Suligovir A és B tiolálása közötti kvantitatív különbséget az UV analízissel nem tudtuk kimutatni. Az NMR és MS vizsgálatok azonban rávilágítottak arra, hogy a két molekula kénezettségében számottevő különbség van.



18. ábra A Suligovir ^1H NMR spektruma



19. ábra A Suligovir tömegspektrometriás felvétele

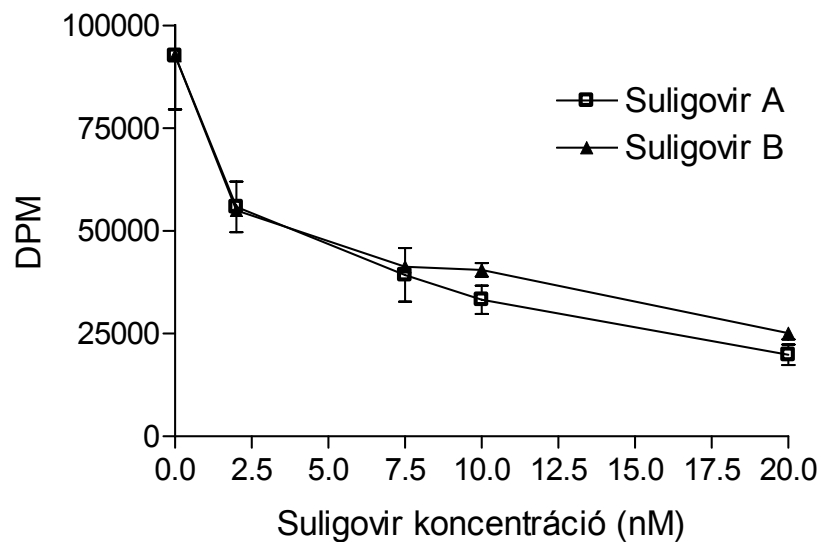
4.3.2 A Suligovir biokémiai jellemzése

A kémiai jellemzés során kapott különbségek miatt meg kívántuk vizsgálni, hogy az eltérés mennyiben befolyásolja a Suligovir A és B biológiai aktivitását. Ezért összehasonlítottuk a HIV-1 reverz transzkriptázra, a HIV-1 replikációra és nukleázokra kifejtett hatásukat.

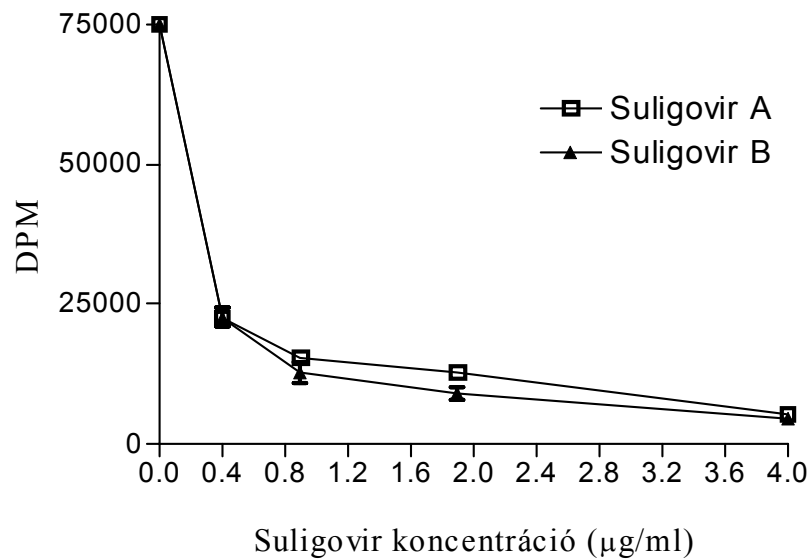
HIV-1 RT gátlás: Laboratóriumunkban korábban már kimutattuk, hogy a Suligovir potens gátlószere a HIV-1 RT-nak. Ezért meghatároztuk az anioncserélő kromatográfiával tisztított Suligovir A és B minták HIV-1 reverz transzkriptáz enzim gátló aktivitását. A két Suligovir minta $IC_{50}=6,2$ nM koncentrációban, egyenlő mértékben gátolta a HIV-1 reverz transzkriptáz enzim aktivitását (20. ábra).

HIV-1 replikáció gátlás: A Suligovir A vagy B mintákkal végzett HIV-1 replikáció gátlási vizsgálatainkra HIV-1(IIIB) vírus törzset használtunk. MT-4 sejtek HIV-1(IIIB)-vel fertőzését megelőzően 1 órával kezeltük a sejteket Suligovir A-val vagy B-vel, majd

meghatároztuk a reverz transzkriptáz aktivitást. Mindkét minta a HIV-1 replikációt $IC_{50}=0,3$ $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban gátolta (21. ábra).



20. ábra HIV-1 reverz transzkriptáz gátlása Suligovirrel



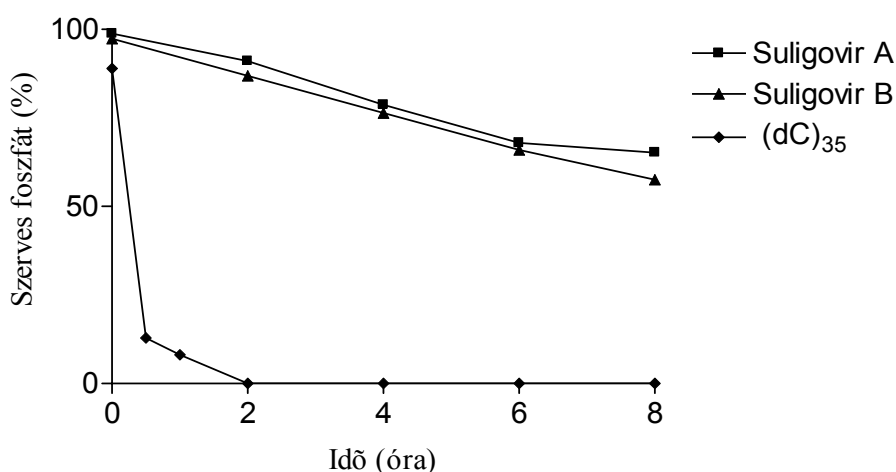
21. ábra HIV-1 replikáció gátlása Suligovirrel

A HIV-1 RT és HIV replikáció gátlásának vizsgálata azt mutatta, hogy a teljes tioláltság, ellentétben a lánchosszal, nem szükségszerűen fontos ahhoz, hogy a Suligovir kifejtse erős gátló hatását. Ez összhangban van a részlegesen tiolált 5-merkaptó-pirimidin

bázist tartalmazó oligonukleotidoknak a HIV-1 RT-ra és DNS polimerázokra kifejtett gátlásánál megfigyelt adatokkal (Bardos és mtsai, 1992).

Ahhoz, hogy a Suligovir sikeresen használható legyen egy esetleges antivirális terápia során, két fontos követelményt kell teljesítenie: az oligonukleotid nagy stabilitással kell hogy rendelkezzen és kicsi legyen a sejtekre kifejtett toxicitása.

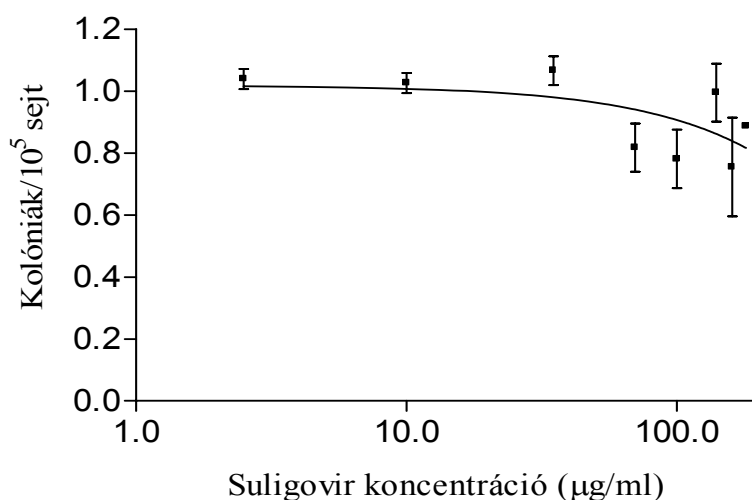
Nukleáz stabilitás: Az előzetes vizsgálatok során a sejteket tartalmazó tápfolyadékban és sejtextraktumban a Suligovir olyan stabilisnak mutatkozott, hogy célzott stabilitás vizsgálatokat végeztünk a Suligovir A-ra, B-re és a (dC)₃₅-re, kígyóméreg diészterázt (50 µg/ml) és DNase I-t (25 µg/ml) tartalmazó reakcióelegyben. A nukleázokkal való emésztés után az enzimeket hőkezeléssel inaktívtuk és a nukleáz kezeléssel keletkezett terminális foszfát-monoészter csoportokat foszfo-monoészteráz enzimmel hasítottuk le. A keletkezett szerves foszfát mennyiségét meghatároztuk (Chen és mtsai, 1956) (**22. ábra**). Az eredményeket a teljes foszfortartalom százalékában fejeztük ki.



22. ábra A (dC)₃₅, a Suligovir A és B nukleázokkal szembeni stabilitásának vizsgálata

A tiolált oligonukleotid (Suligovir A és B) hozzávetőlegesen negyvenszer stabilabbnak bizonyult, mint a nem tiolált (dC)₃₅. A Suligovir A és B stabilitása nem tért el egymástól. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a 4-tiono csoportot tartalmazó oligonukleotidok, a természetes oligonukleotidokkal ellentétben, igen nagy stabilitással rendelkeznek nukleázokkal szemben, anélkül, hogy a foszfáton vagy cukor komponensen módosítanánk.

Toxicitás: Bár az *in vitro* antivirális assay eredményei alapján már megállapítottuk, hogy a Suligovir nem toxikus, tovább vizsgáltuk az emberi csontvelőből származó humán granulocita progenitor sejtek kolónia képződésére kifejtett toxicitását. Az oligonukleotid a kolóniaképződést nem gátolta jelentősen még 180 µg/ml koncentrációban sem (**23. ábra**).



23. ábra A Suligovir hatása humán granulocita makrofág progenitor sejtek kolónia képződésére

4.4. A Suligovir gátló hatásának mechanizmusa

4.4.1 A Suligovir gátló hatása a vírus-sejt kölcsönhatásra

A Suligovir gátló mechanizmusának tanulmányozása során első kérdés volt, hogy a vírus-sejt kapcsolat kialakulását („attachment”) és/vagy a vírus belépését gátolja-e a Suligovir. Erre jól kidolgozott virológiai módszerek vannak, melyeket laboratóriumunkban nem tudtunk elvégezni. Ezért egy Egyesült Államokban működő cégnek megbízást adtunk a munka elvégzésére, saját terveink alapján. A vírus sejthez kötődésének gátlása során a sejthez kapcsolódott p24 mennyiségét mérték ELISA módszerrel, a vírus belépésének gátlását pedig 48 órával később, a β -galaktozidáz reporter expressziójának mérésével követték (Buckheit és mtsai, 1994). Mind a vírus kötődésének, mind a belépésnek Suligovirrel való gátlása azonos mértékű volt (IC_{50} : 0.003 és 0.002 μ g/ml). Meghatározták a Suligovir hatását a sejtfúzióra is, ahol CD4 és LTR- β -galaktozidáz reportert tartalmazó HeLa CD4 LTR β -gal és HIV tat és env proteint expresszáló HL2/3 sejteket használtak. A két sejtvonalat együtt tenyésztették 48 óráig, folyamatos Suligovir jelenlét mellett és meghatározták a β -galaktozidáz aktivitását. A Suligovir a gp120-CD4 fúziót $IC_{50}=8,75$ μ g/ml koncentrációban gátolta. Pozitív kontrollként Chicago Sky Blue-t használtak (Clanton és mtsai, 1992), mely egy elterjedt kontroll vegyület. Az eredmények azt mutatják, hogy a Suligovir antivirális aktivitását a vírus életciklusának egy korai szakaszában feje ki (**1. táblázat**), feltehetőleg az adszorpció vagy a belépés során.

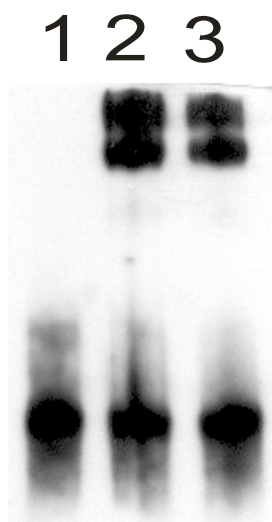
1. táblázat A Suligovir hatása a vírus-sejt kötődésére, a belépésére és a fúziójára

	IC ₅₀ Suligovir (µg/ml)	TC ₅₀	TI	IC ₅₀ Chicago	TC ₅₀ Sky Blue	TI (µg/ml)
Vírus-sejt kölcsönhatás	0,003	>100	>33 000	1,20	>10	>8,3
Vírus belépés	0,002	>100	>50 000	0,04	>10	>250
Sejt-sejt fúzió	8,750	>100	>12	0,67	>10	>15

4.4.2 A Suligovir kölcsönhatása a tioredoxinnal

Az eddigi eredményeink azt mutatják tehát, hogy a Suligovir gátló hatását a HIV vírus életsiklusának egy korai szakaszában fejt ki. A HIV-1 belépéséhez szükséges a CD4 receptor D2 doménjében levő diszulfid híd oxidoredukciós változása, melyet a tioredoxin mediál (Matthias és mtsai, 2002). Így a tioredoxin a Suligovir egyik potenciális célpontja.

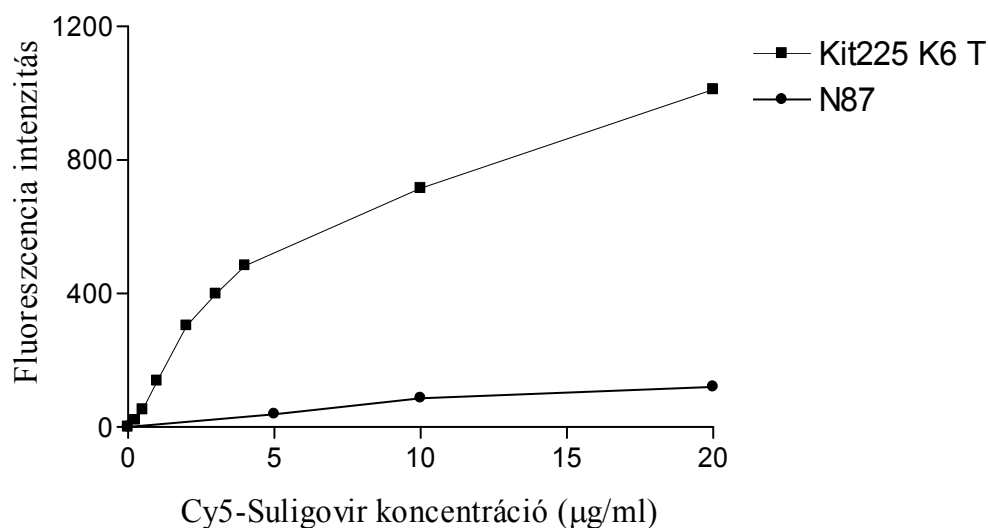
E kölcsönhatás vizsgálatához tisztított tioredoxint és biotinnal jelölt Suligovirt 30 percig együtt inkubáltunk, majd denaturáló poliakrilamid gélen elválasztottuk a reakcióelegyben keletkezett anyagokat. A biotinált termékeket streptavidinnel jelzett tormaperoxidázzal hívtuk elő. A reakció elegyben megjelent 2 újabb termék (lásd 2-es és 3-as reakció). pH=8,5-en erősebb sávokat kaptunk, ami jó egyezésben van azzal a ténnyel, hogy magasabb pH-án nagyobb mennyiségben lesz jelen a 4-tio-dezoxiuridin tiol alakja, mint pH=7,5-nél. A Suligovir és a tioredoxin között valószínűleg kovalens kötés alakult ki (**24. ábra**), hiszen az elektroforézis során a denaturáló gélben nagy valószínűséggel minden másodlagos kölcsönhatás megszűnik. Hogy az egyes sávok összetétele mi lehet, jelenleg még nem tudjuk, valószínű, hogy egy tioredoxin kapcsolódik egy Suligovirhez (középső sáv), illetve két tioredoxin egy Suligovirhez (felső sáv). Tömegspektrometriás vizsgálataink folyamatban vannak ennek meghatározására. A futtatás során nem volt értelme se protein, se DNS molekulásúly standardot alkalmazni a sávok molekulatömegének meghatározására, hiszen a protein-Suligovir komplex (kb. 50% protein és 50% nukleinsav) futási tulajdonsága jelentősen eltérhetnek bármelyik standardtól.



24. ábra A biotinnal jelzett Suligovir kölcsönhatása a tioredoxinnal 1: Suligovir, 2: Suligovir és tioredoxin (pH=8,5), 3: Suligovir és tioredoxin (pH=7,5)

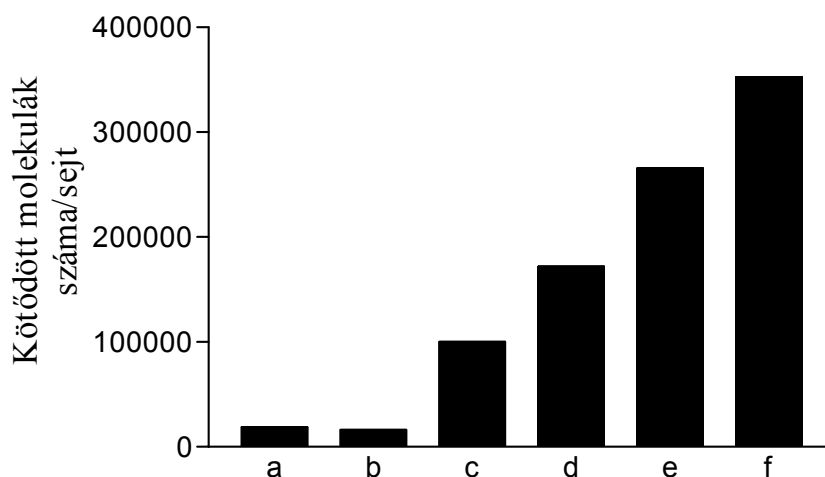
4.4.3 A Suligovir kölcsönhatása a sejtfelszínnel

CD4⁺ Kit225 K6 T limfóma és CD4⁻ N87 gyomor karcinóma sejt vonalakat Suligovirrel titráltunk, azt vizsgálva, hogy a Suligovir specifikusan kötődik-e a sejtekhez (**25. ábra**). A Suligovir a CD4⁺ sejtekhez kb. tízszer jobban kötődött, mint a CD4⁻ sejtekhez.



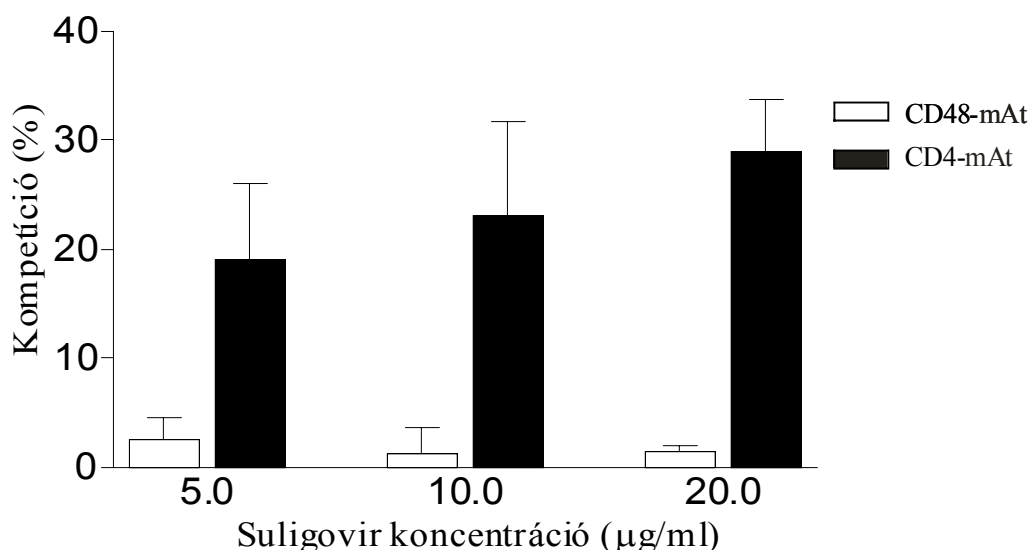
25. ábra A Suligovir kötődése a CD4⁺ Kit225 K6 T limfóma és CD4⁻ gyomor karcinóma sejtekhez

Az interleukin-2 receptor α -láncának (IL-2R α) expresszióját (sejtenként 10^5 IL-2R α) használtuk standardként (Matkó és mtsai, 2002) ahhoz, hogy a Kit225 K6 sejtek CD4 expresszióját meghatározzuk. A Kit225 K6 sejtek 20 000 CD4 molekulát tartalmaznak és sejtenként 170 000-350 000 Cy-5 jelölt Suligovir kötődik hozzájuk (**26. ábra**).



26. ábra Kit225 K6 T limfóma sejteken kötődött molekulák száma; a: CD4, b: CD48, c: IL2R α lánc, d: 5 μ g/ml Suligovir, e: 10 μ g/ml Suligovir, f: 20 μ g/ml Suligovir

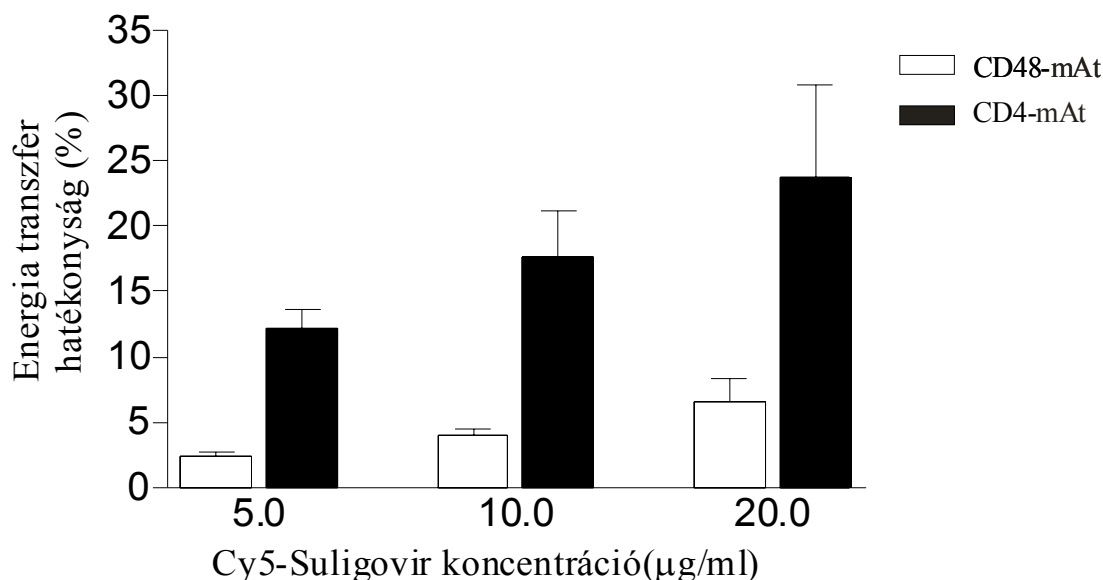
A HIV-1 gp120 glikoproteinjének elsődleges receptora a CD4 molekula. Ezért kompetíciós és fluoreszcencia rezonancia energia transzfer (FRET) vizsgálatokat végeztünk, hogy meghatározzuk a Suligovir kötődési helyét a CD4 lokalizációjára vonatkoztatva. Amikor jelöletlen Suligovirrel egyidejűleg fluoreszcensen jelölt CD4-ellenes mAt-et (MEM115) adtunk a sejtekhez, a Suligovir versengett a kötőhelyért az antitesttel. A CD48-ellenes mAt (MEM102) kötődött a sejtekhez, de a jelöletlen Suligovir hozzáadására sokkal kisebb kompetíciót figyeltünk meg (**27. ábra**), annak ellenére, hogy a CD48 receptorok száma közel azonos a CD4 receptorok számával (**26. ábra**).



27. ábra Kompetíció a Suligovir és a CD4- vagy CD48-ellenes antitest között (a kompetíciót a Suligovir jelenléte mellett az antitest fluoreszcenciájának részleges csökkenéséből számítottuk)

FRET analízissel vizsgáltuk a Suligovir molekulák lokalizációját a CD4 receptorhoz képest. A módszer segítségével eldönthető, vajon a donor Cy-3 jelölt monoklonális CD4-ellenes antitest és az akceptor Cy-5 jelölt Suligovir molekulák nagy számban fordulnak-e elő egymással szoros közelségben (10 nm). Az energia transzfer hatékonyságából kiszámíthatjuk a két festékmolekula közötti távolságot. 5%-os energia transzfer hatékonyság alatt lényegében nem beszélhetünk arról, hogy a donor és akceptor jelölt molekulák nagy része térben közel lennének egymáshoz. A 10 és 25% közötti számított energia transzfer értékek azt mutatják, hogy a CD4 és Suligovir molekulák jelentős része egymással szoros közelségben, 10 nm-nél közelebb helyezkedik el (**28. ábra**).

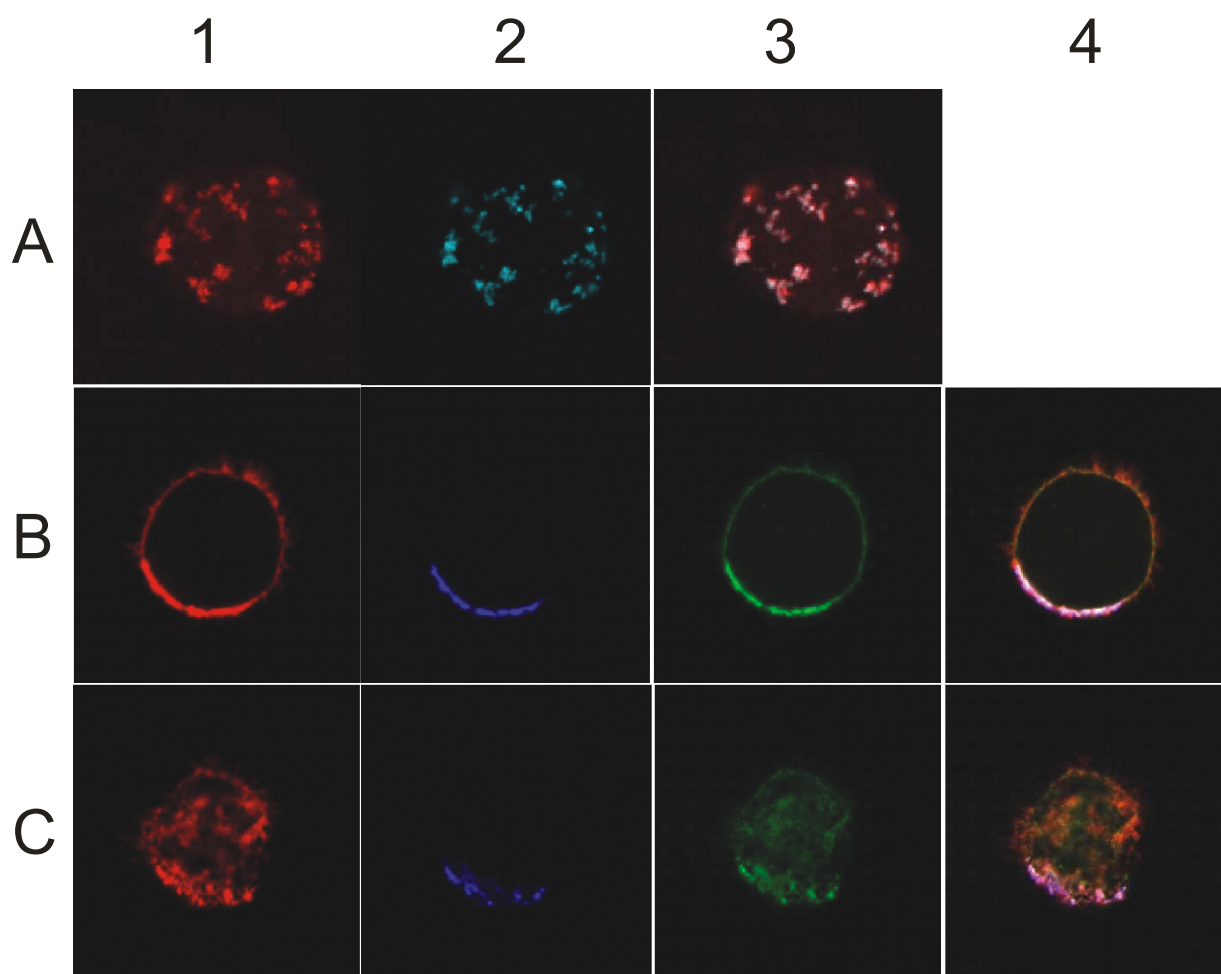
A Suligovir és a CD4 között specifikus kölcsönhatás bizonyításának érdekében FRET analízist végeztünk a Cy-3 jelzett CD48-ellenes mAt és a Cy-5 jelölt Suligovir között. A CD48-ellenes mAt és a Suligovir között kialakult alacsony (1-5%) energia transzfer hatékonyság (**28. ábra**) azt mutatja, hogy a molekulák nagy része nincs közel (10 nm-en belül) egymáshoz. A megfigyeléseink és a kapott kompetíciós adatok alapján azt mondhatjuk, hogy nagyszámú Suligovir molekula kerül kölcsönhatásba a CD4-gyel, de a CD48-cal nem, vagy sokkal kisebb mértékben. Ez azonban nem jelenti azt, hogy esetleg nem kötődhet más, itt nem azonosított, sejtfelszíni molekulához.



28. ábra FRET mérések a donor: Cy-3 CD4 mAt és az akceptor: Cy-5 Suligovir, illetve a donor: Cy-3 CD48 mAt és az akceptor: Cy-5 Suligovir között

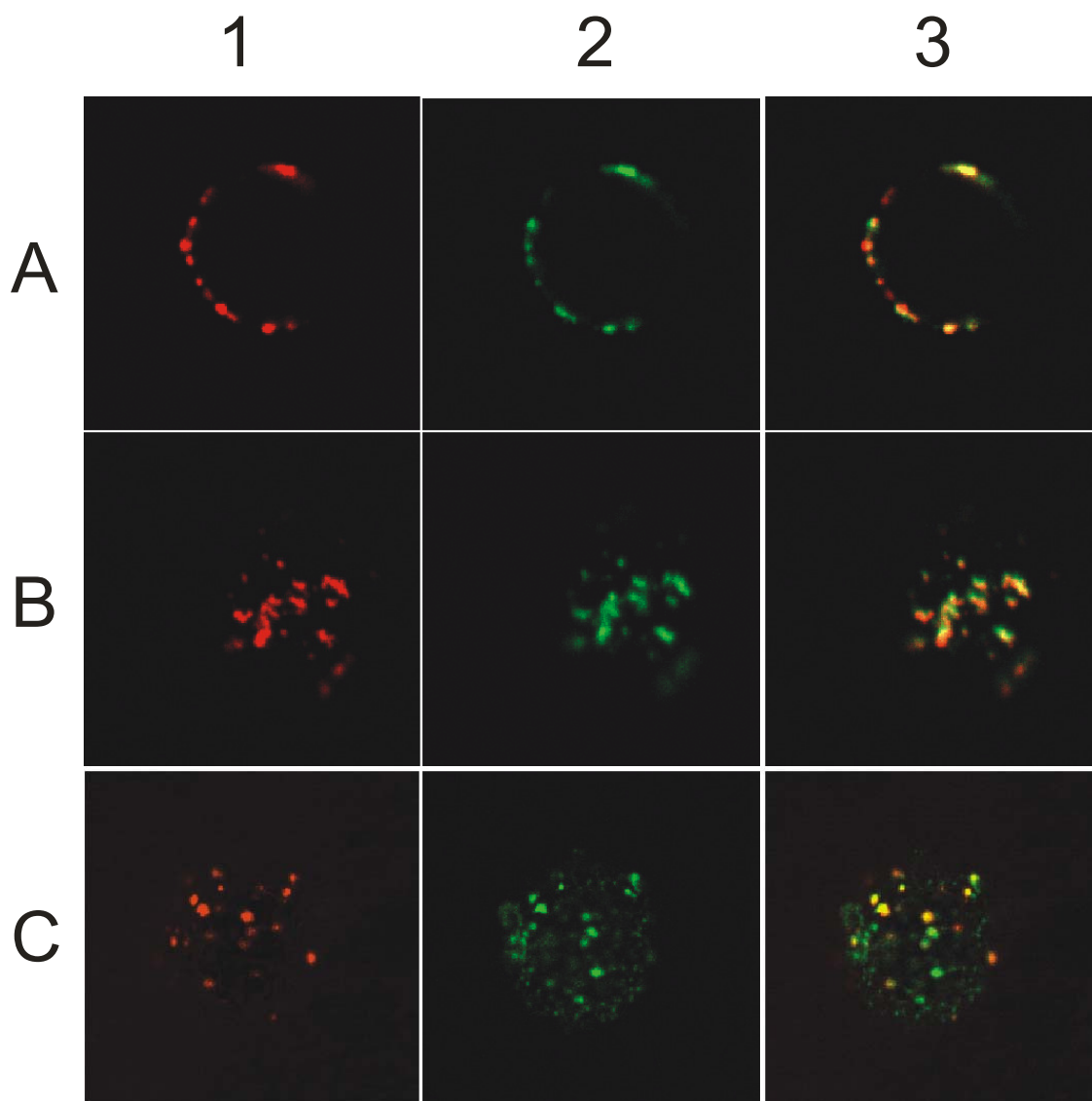
4.4.3.1 A Suligovir sejtfelszíni lokalizációjának vizsgálata konfokális lézermikroszkópia alkalmazásával

Mivel a Suligovir gátolja a vírus belépését a sejtbe és úgy tűnik, hogy a CD4-gyel is kölcsönhatásba lép, vizsgáltuk sejtfelszíni kolokalizációját összehasonlítva a CD4-el. Úgy találtuk, hogy a Suligovir a sejtfelszín jól definiált helyeihez kötődik (**29. A ábra**). Az oligonukleotid kötődését nem befolyásolja a jelölés típusa (Cy-3, Cy-5). A **29. B és C ábrán** látható, hogy igen nagy az átfedés a Suligovir, a CD4 és a lipid „raft”-ok sejtfelszíni elhelyezkedésében.



29. ábra CLSM vizsgálatok a Suligovir Kit225 K6 sejtek sejtfelszíni lokalizációjáról. (A) Különböző jelölések hatása a Suligovir lokalizációjára 1: Cy-3-Suligovir, 2: Cy-5-Suligovir, 3: átfedés. (B) A Suligovir kolokalizációja a CD4-gyel és a lipid „raft”-tal 1: CD4, 2: Suligovir, 3: kolera toxinnal jelzett lipid „raft”, b4: átfedés. (C) A Suligovir kolokalizációja a CD4-gyel és a lipid „raft”-al a sejt felső szeletéből 1: CD4, 2: Suligovir, 3: kolera toxinnal jelzett lipid „raft”, b4: átfedés.

Korábban már bemutattuk, hogy a Suligovir *in vitro* kovalens kötődéssel kapcsolódik a tioredoxinhoz, ezért a Suligovir és a sejtfelszíni tioredoxin elhelyezkedését is összehasonlítottuk. A Suligovir és a sejtfelszíni tioredoxin szinte teljesen azonos helyen található meg a sejt felszínén (**30. A, B ábra**). Hasonlóan a CD4-Suligovir kölcsönhatás vizsgálata során kapott eredményekhez, a tioredoxin és a Suligovir ebben az esetben is a lipid „raft”-tal azonos helyen jelenik meg a sejt felszínén (**30. C ábra**).



30. ábra CLSM vizsgálatok a Suligovir és lipid „raft”-ok kölcsönhatásáról a sejtfelszíni tioredoxinnal Kit225 K6 sejteken. (A) A Suligovir és sejtfelszíni tioredoxin kolokalizációja 1: tioredoxin, 2: suligovir, 3: átfedés. (B) A Suligovir és sejtfelszíni tioredoxin kolokalizációja a sejt felső szeletén 1: tioredoxin, 2: Suligovir, 3: átfedés. (C) A kolera toxinnal festhető lipid „raft” és tioredoxin kolokalizációja 1: tioredoxin, 2: lipid „raft”, 3: átfedés.

A konfokális lézer szkennning mikroszkópiával kapott képek jelzik, hogy a Suligovir mennyisége CLSM-mel nem detektálható intracellulárisan, hanem a sejt felszínén, a sejtmembránhoz kapcsolódik (**29. ábra**). Így igen valószínűtlen az, hogy a reverz transzkripció gátlásával (Tőkés és Aradi, 1996) fejtené ki antivirális aktivitását a molekula.

CLSM-mel kapott eredményünk szerint a sejt felszíni tioredoxin a lipid „raft”-okban lokalizált és a Suligovir is ezekben a pontokban dúsul fel. Másik kísérletünk szerint a Suligovir a lipid „raft”-okban található CD4 receptorral azonos helyen dúsul fel. Az irodalomban jelenleg vita tárgya, hogy a lipid raftokban lokalizált CD4 receptorok a HIV kizárólagos receptorai, vagy a lipid „raft”-okon kívüli receptorok is részt vesznek a HIV felvételében (Popik és mtsai, 2002; del Real és mtsai, 2002; Percherancier és mtsai, 2003).

Figyelembe véve a Suligovir potens HIV belépést gátló hatását (0,003 µg/ml), CLSM eredményeink inkább amellett szólnak, hogy a vírus lipid „raft”-okban lokalizált CD4 receptorokon keresztül kerül felvételre. További hangsúlyozandó és fentebb megjegyzett eredményünk az, hogy a tioredoxin a sejt felszínén elhelyezkedő lipid „raft”-okban fordul elő (**30. C ábra**). Ezt eddig nem írták le. Ha azt az irodalmi eredményt elfogadjuk, hogy a tioredoxin feltétlen kell a CD4 vírus belépés során bekövetkező konformációs változáshoz (Matthias és mtsai, 2002; Matthias és Hogg, 2003; Hogg, 2003), akkor egy újabb megerősítést kapjuk annak, hogy a HIV a lipid „raft”-okban lokalizált CD4 molekulákat hasznosítja a bejutáshoz.

Vizsgálataink nem terjedtek ki a Suligovir protein diszulfid izomerázzal és gp120-szal lehetséges kölcsönhatására. A vírus belépése során a gp120-ban a PDI felelős a diszulfid kötések változásáért (Gallina és mtsai, 2002; Barbouche és mtsai, 2003), mely a Suligovir egy további antivirális célpontja lehet. Az utóbbi időben írták azt le, hogy a gp120-t, PDI-t, CD4-et és CXCR4-et tartalmazó tetramolekuláris fehérje komplex kialakít egy (a vírus belépéséhez szükséges) „kaput” és a PDI redox aktivitása szükséges a gp120 nélkülözhetetlen konformációs változásához (Matthias és mtsai, 2002).

Eredményeink szerint a Suligovir egy nem toxikus HIV ellenes anyag, mely a vírus belépésénél fejti ki gátló hatását.

A Suligovirnak három, az antivirális hatás szempontjából fontos jellegzetessége van, melyek a kémiai módosításnak köszönhetőek, ezek:

1. a 4-tiono csoport megnöveli a bázis hidrofób jellegét (Tőkés és Aradi, 1996)
2. a 4-tiono csoport tautomer átrendeződésével a bázis 4-es helyén reaktív -SH csoport alakulhat ki (Simuth és mtsai, 1970)

3. a bázison történő tiolálás a foszfodiészter kötések módosítása nélkül is egy a nukleázokkal szemben igen ellenálló oligonukleotidot eredményez (**20. ábra**).

A Suligovir nem jut át a sejtmembránon, hanem a sejt felszínén helyezkedik el. Ez egy igen jelentős különbség a Suligovir és sok más, HIV-ellenes aktivitással rendelkező oligonukleotid között. Valószínűleg ez a tulajdonság lehet részben felelős az alacsony toxicitásért. Másrészt, a Suligovir nem toxikus természete azzal is magyarázható, hogy a sejt felszíni kölcsönhatás specifikus, a Suligovir csak bizonyos sejt felszíni célpontokat támad.

4.5. Suligovir antivirális aktivitása

Az alábbi táblázatokban szereplő adatokat a Southern Research Inc. (USA, Maryland) munkatársai mérték. Vad típusú, illetve nukleozid- (NRTI) és nem nukleozid reverz transzkriptáz inhibitorokra (NNRTI) rezisztens HIV-1 törzsek replikáció gátlását standard sejt alapú „assay”-vel mérték (**2. táblázat**). AZT-t és nevirapint használtak pozitív kontrollként, melyekre a mutáns vírus törzsek 16-333 szoros rezisztenciát mutattak. Ezek az adatok azt mutatják, hogy a Suligovir mind a vad típusú-, mind a mutáns törzsek replikációját gátolja. Továbbá megvizsgálták a HIV replikáció gátlását perifériális mononukleáris sejteken, különböző vírustörzsekkel (**3. táblázat**). Ebbe a táblázatba foglaltuk össze a Suligovir SIV replikáció gátlására kifejtett hatását. Ez utóbbi fontos eredmény a tervezett *in vivo* majomkísérletek szempontjából.

2. táblázat A Suligovir antivirális aktivitása.

VÍRUS IZOLÁTUM	IC ₅₀ Suligovir (µg/ml)	TC ₅₀	TI TC ₅₀ /IC ₅₀	Rezisztencia foka* IC ₅₀ mutáns/IC ₅₀ vad típus	Rezisztencia típusa
<i>Vad típus</i>					
RF	0,8	>50	>62		
IIIB	4,4	>100	>23		
NL4-3	7,8	>100	>13		
<i>NL4-3 mutáns</i>					
K103N	25,4	>100	>4	Szenzitív; 3,3	NNRTI
Y181C	6,7	>100	>15	Szenzitív; 0,9	NNRTI
4X AZT	24,5	>100	>4	Szenzitív; 3,1	NRTI
<i>IIIB mutáns</i>					
DPS-R	10,5	>100	>10	Szenzitív; 2,4	NNRTI

*Amennyiben a rezisztencia foka <5, akkor az adott potenciális gyógyszerre szenzitív a vírus

3. táblázat A Suligovir HIV replikációt gátló hatása perifériás mononukleáris sejtekben különböző vírustörzsekkel szembeni antivirális aktivitása.

VÍRUS IZOLÁTUM	IC ₅₀ Suligovir (µg/ml)	TC ₅₀	TI TC ₅₀ /IC ₅₀
<i>Humán virus törzsek</i>			
HIV-1 RW/92/016 (A altípus)	0,02	>100	>5000,0
HIV-1 BR/92/014 (B altípus)	0,3	>100	>333,3
HIV-1 BR/92/025 (C altípus)	0,05	>100	>2000,0
HIV-1 UG/92/046 (D altípus)	0,25	>100	>400,0
HIV-1 CMU02 (E altípus)	0,41	>100	>243,9
HIV-1 BR/93/020 (F altípus)	4,77	>100	>21,0
HIV-1 JV 1083 (G altípus)	0,54	>100	>185,2
HIV-1 BCF01 (O altípus)	4,29	>100	>23,3
<i>Majom virus törzsek</i>			
SIVmac25	11,50	>100	>66,6
SHIV89,6p	0,17	>100	>588,2
SIVPBj	0,26	>100	>384,6

IC₅₀, a vírus replikáció 50%-os gátlása; TC₅₀, a sejt életképességének 50%-os csökkenése;

In vitro a Suligovir IC₅₀=0,8-25,4 µg/ml koncentráció tartományban gátolja a különböző HIV- (beleértve a nukleozid- és nem nukleozid reverz transzkriptáz inhibitorokkal szemben rezisztens mutáns) törzseket. Ugyancsak potens gátlószere a HIV-1 (0,02-4,77 µg/ml) és a majmokat megbetegítő SIV (0,17-11,5 µg/ml) vírus különböző altípusainak is. Ez az antivirális aktivitás hasonló, vagy magasabb, mint az irodalomban már leírt oligonukleotid alapú HIV ellenes anyagok (Agraval és mtsai, 1989; Bardos és mtsai, 1992; Buckheit és mtsai, 1994; Inagawa és mtsai, 2002; Jing és mtsai, 1998; Kinchington és mtsai, 1992; Kuwasaki és mtsai, 2003; Matsukura és mtsai, 1987; Ojwang és mtsai, 1995; Tsukahara és mtsai, 1997; Yamaguchi és mtsai, 1997). A Suligovir IC₅₀ értékénél 50-1000-szer nagyobb koncentrációban sem toxikus a sejtekre és a humán granulocita progenitor sejtek kolónia képződésére sem fejt ki lényeges gátlóhatást (**21. ábra**).

5 ÖSSZEFOGLALÁS

Munkacsoportunk biológiailag aktív oligonukleotidok tanulmányozása és fejlesztése során egy potens anti-HIV aktivitással rendelkező oligonukleotidot állított elő, melyet Suligovirnak neveztünk el, kémiai szerkezete: (s⁴dU)₃₅. Doktori disszertációmban az (s⁴dU)₃₅ kémiai szintézisének optimalizálása, kémiai, biokémiai karakterizálása, valamint anti-HIV aktivitásának tanulmányozása során végzett munkámat mutatom be. Ismételten megjegyzem, hogy az anti-HIV aktivitás méréseket a DEOEC Mikrobiológiai Intézet munkatársai végezték velem szoros kooperációban.

1. Kidolgoztunk két módszert a Suligovir előállítására:

A módszer: előállítottuk a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit és CPG származékát és ezek felhasználásával a Suligovirt automata oligonukleotid szintetizálóban

B módszer: előállítottuk (dC)₃₅-ből folyékony H₂S kezeléssel a Suligovirt

2. ¹H-, ¹³C-, ³¹P-NMR spektroszkópiás és tömegspektrometriás módszerekkel meghatároztuk a két módon előállított Suligovir kémiai szerkezetét. Megállapítottuk, hogy a Suligovir A nem teljesen tiolált (31-32 kénatomot tartalmaz), míg a Suligovir B tiolása gyakorlatilag teljes (35 kénatomot tartalmaz molekulánként).
3. A két módszerrel előállított Suligovir biológiai aktivitásában nem találtunk lényeges eltérést. Megállapítottuk, hogy szerkezeti inhomogenitása és magas előállítási költsége miatt az A módszerrel nem célszerű nagyobb mennyiségben előállítani a Suligovirt, de kísérleti rendszerekben a Suligovir B-vel azonos biológiai aktivitása miatt fel lehet használni.
4. Kimutattuk, hogy a Suligovir nukleázokkal szemben a kiindulási, módosítatlan (dC)₃₅ oligonukleotidhoz képest negyvenszer stabilabb és a celluláris toxicitása nagyon alacsony (180 µg/ml koncentrációig humán granulocita makrofág progenitor sejtek kolóniaképződésére nincs jelentős gátló hatása).
5. Egy példán bemutattuk, hogy a Suligovir a CD4⁺ sejtekhez tízszer nagyobb mértékben kötődött, mint a CD4⁻ sejtekhez.
6. Konfokális mikroszkópiai vizsgálataink szerint a Suligovir a sejt belsejébe nem jut be, hanem a sejt felszínén a koleszterin gazdag lipid „raft”-okban elhelyezkedő CD4 molekulákhoz kötődik.

7. A sejt felszínén jelentősen kolokalizál a tioredoxinnal is és izolált tioredoxinnal kovalens kölcsönhatást is kialakíthat.
8. A Suligovir $IC_{50}=0,8-25,4$ $\mu\text{g/ml}$ koncentrációban gátolja a vad, a nukleozid és nem-nukleozid reverz transzkriptáz inhibitor rezisztens mutáns törzseket, illetve a HIV-1 (0,02-4,77 $\mu\text{g/ml}$) és SIV (0,17-11,5 $\mu\text{g/ml}$) különböző altípusait.

Összefoglalva: a Suligovir egy ígéretes terápiás ágens a HIV fertőzés vagy az AIDS kezelésére, egy a vírus bejutását gátló inhibitor. A folyamatban lévő in vivo kísérletek döntik majd el, hogy a Suligovir csupán egy elméleti szempontból érdekes molekula vagy további fejlesztés után esetleg gyógyszerként jelenhet meg egy súlyos, halálos kimenetelű betegség, az AIDS kezelésében.

6 SUMMARY

One of the future goals of our laboratory is to develop oligonucleotide HIV inhibitors. In this Thesis I present our results on the synthesis, the chemical and biochemical characterization and anti-HIV activity of a 35-mer deoxyoligonucleotide composed exclusively of 4-thio-deoxyuridylate [(s⁴dU)₃₅, Suligovir]. I need to add that the anti-HIV activity measurements were made in strong cooperation with the Institute of Microbiology at the University of Debrecen, Medical and Health Science Center.

1. We have worked out two methods for the synthesis of Suligovir:
 - a. Method A: Suligovir synthesis from 4-thio-deoxyuridin-phosphoramidite on CPG (Controlled-Pore Glass)
 - b. Method B: Suligovir synthesis through liquid H₂S treatment of (dC)₃₅
2. We have determined the chemical structure of Suligovir A and B by ¹H-, ¹³C- and ³¹P-NMR spectroscopy and mass spectrometry. It was shown that the Suligovir A is less thiolated than Suligovir B. As an average, Suligovir A contains 31-32, while Suligovir B contains the desired 35 sulphur atoms per molecule.
3. The biological activities of Suligovir A and B do not differ significantly. We have shown that the structural inhomogeneity and the high cost of production do not make the Suligovir A suitable for therapy. However, it can be used for the *in vitro* test systems because its biological activity is the same as the Suligovir B's.
4. We have shown that Suligovir A and B are equally stable in biological media and they are forty times more stable against nucleases than the starting compound, the unmodified (dC)₃₅ oligonucleotide. The cellular toxicities of both Suligovirs are very low (Suligovir had negligible effect even until 180 µg/ml concentration on the colony formation of human macrophage granulocyte progenitor cells).
5. The Suligovir binds strongly to CD4⁺ cells until saturation, while its binding is less to CD4⁻ cells.
6. Our CLSM (Confocal Laser Scanning Microscopy) studies showed that the Suligovir can't penetrate into the cell but it binds to the CD4 molecules localized in the cholesterol rich lipid rafts on the cell surface.

7. The Suligovir co-localizes with and it forms covalent binding to thioredoxin, therefore it inhibits the redox power of the cell surface. This redox change would be necessary for successful HIV-1 entry.
8. The Suligovir inhibits the replication of various laboratory strains of HIV, including resistant mutants to NRTI and NNRTI, with IC_{50} values in the range from 0.8 to 25.4 $\mu\text{g/ml}$. It also inhibits the replication of various subtypes of HIV-1 ($IC_{50} = 0.02\text{-}4.77$ $\mu\text{g/ml}$) and SIV (IC_{50} (0.17-11.5 $\mu\text{g/ml}$)).

As a conclusion, Suligovir is a new member of HIV-1 entry inhibitors, which acts through non-sequence specific mode of action. It inhibits the replication of HIV-1 in an early phase of the virus life cycle; apparently it can be used for the inhibition of HIV-1 infection.

7 KÖZLEMÉNYEK

Az értekezést megalapozó in extenso közlemények:

1. Horváth A. and Aradi J. (2005): Advantages of sodium-perchlorate solution as mobile phase for purification of synthetic oligonucleotides by anionexchange chromatography *Analitical Biochemistry* **338**(2), 341-343. IF: 2.174
2. Horváth, A., Tőkés S., Hartman, T., Watson, K., Turpin, J.A., Buckheit, R.W., Jr., Sebestyén, Z., Szöllősi, J., Benkő, I., Bardos, T.J., Dunn, J.A., Tóth, F.D., Fésüs, L., and Aradi, J. (2005): Potent inhibition of HIV-1 entry by (s⁴dU)₃₅ *Virology* **334**(2), 214-223 IF: 3.391
3. Horváth, A., Tőkés S., Beck, Z., and Aradi, J. (2005) Inhibition of HIV-1 replication by 4-thio-oligodeoxyuridylates (közlésre beküldve)

A disszertációhoz nem kapcsolódó egyéb in extenso közlemények:

1. Sztaricskai, F., Csorvási, A., Horváth, A., Batta, Gy. and Dinya, Z. (2000) Synthesis and conformational studies of unnatural pyrimidine nucleosides. *J. Carbohydrate Chemistry* **19**(9), 1223-1233. IF: 0.974
2. Tarkanyi, I., Horváth, A., Szatmari, I., Eizert, H., Vámosi, Gy., Damjanovich, S., Segal-Bendirdjian, E., Aradi, J., (2005) Inhibition of human telomerase by oligonucleotide chimeras, composed of an antisense moiety and a chemically modified homo-oligonucleotide *FEBS Lett.* **579**(6), 1411-1416. IF: 3.609

8 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném köszönetemet kifejezni **Dr. Fésüs László** professzor úrnak, a DE OEC Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet igazgatójának, amiért lehetővé tette számomra, hogy az intézet Nukleinsav Laboratóriumában végezhettem kísérleteimet.

Ezúton szeretném megköszönni **Dr. Aradi Jánosnak**, témavezetőmnek munkám során nyújtott útmutatásait, kiváló szakmai és baráti tanácsait.

Köszönettel tartozom **† Dr. D. Tóth Ferencnek** és **Dr. Benkő Ilonának** az antivirális aktivitás, illetve a toxicitási vizsgálatok elkészítéséért.

Köszönet illeti **Dr. Szöllősi Jánost** és **Dr. Sebestyén Zsoltot** a FRET és CLSM vizsgálatokban nyújtott jelentős segítséget.

Ugyancsak köszönettel tartozom **Dr. Kovács Lajosnak**, **Dr. Hornyák Miklósnak** és **Dr. Kupihár Zoltánnak** a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit és CPG nagy mennyiségű előállításáért és tömegspektrometriás vizsgálatáért.

Köszönet illeti **Dr. Csajbók Évát** a 4-tio-dezoxiuridin foszforamidit és a Suligovir minták NMR vizsgálatáért.

Köszönettel tartozom **Mező Irén** és **Szilágyi Szilvia** asszisztenseknek a munkámat segítő tevékenységükért.

Köszönöm feleségemnek, **Dr. Csajbók Évának** végtelen türelmét, szüntelen biztatását és hogy a munkámhoz elengedhetetlenül fontos családi háttérrel szakmai megértéssel és házastársi beletörődéssel biztosította.

9 FELHASZNÁLT IRODALOM

1. Agrawal S, Goodchild J, Civeira MP, Thornton AH, Sarin PS, Zamecnik PC (1988): Oligodeoxynucleoside phosphoramidates and phosphorothioates as inhibitors of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7079-83
2. Agrawal S, Ikeuchi T, Sun D, Sarin PS, Konopka A, Maizel J, Zamecnik PC (1989): Inhibition of human immunodeficiency virus in early infected and chronically infected cells by antisense oligodeoxynucleotides and their phosphorothioate analogues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:7790-4
3. Alcabes P, Munoz A, Vlahov D, Friedland GH (1993): Incubation period of human immunodeficiency virus. *Epidemiol. Rev.* **15**:303-18
4. Amarzguoui M, Holen T, Babaie E, Prydz H (2003): Tolerance for mutations and chemical modifications in a siRNA. *Nucleic Acids Res.* **31**:589-95
5. Aradi J, Ho YK (1985): Antitemplate effect of polynucleotides and their hybrid complexes. *Cancer Biochem. Biophys.* **7**:349-59
6. Arnold E, Das K, Ding J, Yadav PN, Hsiou Y, Boyer PL, Hughes SH (1996): Targeting HIV reverse transcriptase for anti-AIDS drug design: structural and biological considerations for chemotherapeutic strategies. *Drug Des. Discov.* **13**:29-47
7. Barbouche R, Miquelis R, Jones IM, Fenouillet E (2003): Protein-disulfide isomerase-mediated reduction of two disulfide bonds of HIV envelope glycoprotein 120 occurs post-CXCR4 binding and is required for fusion. *J. Biol. Chem.* **278**:3131-6
8. Bardos TJ (1974) Antimetabolites: molecular design and mode of action. *Top. Curr. Chem.* **52**:63-98
9. Bardos TJ, Aradi J, Ho YK, Kalman TI (1975): Biochemical properties of 5-sulfur-substituted pyrimidine nucleosides and nucleotides. *Ann. NY. Acad. Sci.* **255**:522-31
10. Bardos TJ, Schinazi RF, Ling KH, Heider AR (1992): Structure-activity relationships and mode of action of 5-mercapto-substituted oligo- and polynucleotides as antitemplates inhibiting replication of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **36**:108-14
11. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L (1983): Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* **220**:868-71
12. Benkő I, Hernádi F, Megyeri A, Kiss A, Somogyi G, Tegye Z, Kraicsovits F, Kovács P (1999): Comparison of the toxicity of fluconazole and other azole antifungal drugs to murine and human granulocyte-macrophage progenitor cells in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**:675-81

13. Blattner WA (1991): HIV epidemiology: past, present, and future. *FASEB J.* **5**:2340-8
14. Bohan CA, Kashanchi F, Ensoli B, Buonaguro L, Boris-Lawrie KA, Brady JN (1992): Analysis of Tat transactivation of human immunodeficiency virus transcription in vitro. *Gene Expr.* **2**:391-407
15. Bold G, Fassler A, Capraro HG, Cozens R, Klimkait T, Lazdins J, Mestan J, Poncioni B, Rosel J, Stover D, Tintelnot-Blomley M, Acemoglu F, Beck W, Boss E, Eschbach M, Hurlimann T, Masso E, Roussel S, Ucci-Stoll K, Wyss D, Lang M (1998): New aza-dipeptide analogues as potent and orally absorbed HIV-1 protease inhibitors: candidates for clinical development. *J. Med. Chem.* **41**:3387-401
16. Braasch DA, Corey DR (2001): Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA. *Chem. Biol.* **8**:1-7
17. Braasch DA, Liu Y, Corey DR (2002): Antisense inhibition of gene expression in cells by oligonucleotides incorporating locked nucleic acids: effect of mRNA target sequence and chimera design. *Nucleic Acids Res.* **30**:5160-7
18. Brady RL, Dodson EJ, Dodson GG, Lange G, Davis SJ, Williams AF, Barclay AN (1993): Crystal structure of domains 3 and 4 of rat CD4: relation to the NH2-terminal domains. *Science* **260**:979-83
19. Buckheit RW Jr, Roberson JL, Lackman-Smith C, Wyatt JR, Vickers TA, Ecker DJ (1994): Potent and specific inhibition of HIV envelope-mediated cell fusion and virus binding by G quartet-forming oligonucleotide (ISIS 5320). *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* **10**:1497-506
20. Campbell JM, Bacon TA, Wickstrom E (1990): Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **20**:259-67
21. Campbell SM, Crowe SM, Mak (2001): J Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* **22**:217-27
22. Chen PS Jr, Toribara TY, Warner H (1956): Microdetermination of Phosphorus. *Anal. Chem.* **28** 1756–58
23. Chadha KC, Dembinski WE, Dunn CB, Aradi J, Bardos TJ, Dunn JA, Ambrus JL Sr (2004): Effect of increasing thiolation of the polycytidylic acid strand of poly I:poly C on the alpha, beta and gamma interferon-inducing properties, antiviral and antiproliferative activities. *Antiviral Res.* **64**:171-7
24. Clanton DJ, Moran RA, McMahon JB, Weislow OS, Buckheit RW Jr, Hollingshead MG, Ciminale V, Felber BK, Pavlakis GN, Bader JP (1992): Sulfonic acid dyes: inhibition of the human immunodeficiency virus and mechanism of action. *J. Acquir Immune Defic. Syndr.* **5**:771-81

25. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P (1996): The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat. Med.* **2**:1244-7
26. Coffin J, Haase A, Levy JA, Montagnier L, Oroszlan S, Teich N, Temin H, Toyoshima K, Varmus H, Vogt P, et al. (1986): What to call the AIDS virus? *Nature* **321**:10
27. Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE (ed), (1997a): Retroviruses pp. 1-25, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
28. Coffin JM2, Hughes SH, Varmus HE (ed), (1997b): Retroviruses pp. 27-69, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
29. Coffin JM3, Hughes SH, Varmus HE (ed), (1997c): Retroviruses pp. 121-160, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
30. Coleman RS, Kesicki EA (1994): Synthesis and postsynthetic modification of oligodeoxynucleotides containing 4-thio-2'-deoxyuridine (ds4U). *J. Am. Chem. Soc.* **116**:11636-42
31. Coleman RS, Siedlecki JM (1991): Synthesis and stability of s-cyanoethyl-protected 4-thiouridine and 2'-deoxy-4-thiouridine *Tetrahedron Lett.* **32**:3033-34
32. Coleman RS, Siedlecki JM (1992): Synthesis of a 4-thio-2'-deoxyuridine-containing oligonucleotide. Development of the thiocarbonyl group as a linker element. *J. Am. Chem. Soc.* **114**:9229-30
33. Cooley LA, Lewin SR (2003): HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy. *J. Clin. Virol.* **26**:121-32
34. Corbett JW, Ko SS, Rodgers JD, Gearhart LA, Magnus NA, Bacheler LT, Diamond S, Jeffrey S, Klabe RM, Cordova BC, Garber S, Logue K, Trainor GL, Anderson PS, Erickson-Viitanen SK (2000): Inhibition of clinically relevant mutant variants of HIV-1 by quinazolinone non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J. Med. Chem.* **43**:2019-30
35. De Clercq E, Huang GF, Bhooshan B, Ledley G, Torrence PF (1979): Interferon induction by mismatched analogues of polyinosinic acid. polycytidylic acid [(Ix,U)_n.(C)_n]. *Nucleic Acids Res.* **7**:2003-14
36. De Clercq E, (2002): New developments in anti-HIV chemotherapy. *Biochim. Biophys. Acta* **1587**:258-75
37. Del Real G, Jimenez-Baranda S, Lacalle RA, Mira E, Lucas P, Gomez-Mouton C, Carrera AC, Martinez-A C, Manes S (2002): Blocking of HIV-1 infection by targeting CD4 to nonraft membrane domains. *J. Exp. Med.* **196**:293-301
38. Delgado E, Thomson MM, Villahermosa ML, Sierra M, Ocampo A, Miralles C, Rodriguez-Perez R, Diz-Aren J, Ojea-de Castro R, Losada E, Cuevas MT, Vazquez-de Parga E, Carmona R, Perez-Alvarez L, Medrano L, Cuevas L, Taboada JA, Najera R (2002): Identification of a newly characterized HIV-1 BG intersubtype circulating recombinant form

in Galicia, Spain, which exhibits a pseudotype-like virion structure. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **29**:536-43

39. Desideri N, Sestili I, Stein ML, Tramontano E, Corrias S, La Colla P (1998): Synthesis and anti-human immunodeficiency virus type 1 integrase activity of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acid flavon-3-yl esters. *Antivir. Chem. Chemother.* **9**:497-509
40. Deshmukh RR, Warner TN, Hutchison F, Murphy M, Leitch WE 2nd, De Leon P, Srivatsa GS, Cole DL, Sanghvi YS (2000): Large-scale purification of antisense oligonucleotides by high-performance membrane adsorber chromatography. *J. Chromatogr.* **890**:179-92
41. Doudna JA, Cech TR (2002): The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* **418**:222-8
42. Eich E, Pertz H, Kaloga M, Schulz J, Fesen MR, Mazumder A, Pommier Y (1996): (-)-Arctigenin as a lead structure for inhibitors of human immunodeficiency virus type-1 integrase. *J. Med. Chem.* **39**:86-95
43. Eckert DM, Kim PS (2001): Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:11187-92
44. Edinger AL, Blanpain C, Kunstman KJ, Wolinsky SM, Parmentier M, Doms RW (1999): Functional dissection of CCR5 coreceptor function through the use of CD4-independent simian immunodeficiency virus strains. *J. Virol.* **73**:4062-73
45. Elayadi AN, Corey DR (2001): Application of PNA and LNA oligomers to chemotherapy. *Curr. Opin. Investig. Drugs.* **2**:558-61
46. Ellington AD, Conrad R (1995): Aptamers as potential nucleic acid pharmaceuticals. *Biotechnol. Annu. Rev.* **1**:185-214
47. Famulok M, Mayer G (1999): Aptamers as tools in molecular biology and immunology. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **243**:123-36
48. Feinberg MB, Baltimore D, Frankel AD (1991): The role of Tat in the human immunodeficiency virus life cycle indicates a primary effect on transcriptional elongation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:4045-9
49. Fernandez EJ, Lolis E. (2001): Structural studies of chemokines that inhibit HIV-1 entry. *Antivir. Chem. Chemother.* **12**:43-9
50. Fernandez EJ, Lolis E. (2002): Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**:469-99
51. Fields BN, Knipe DM (ed) (1990): Virology pp. 1437-1500, Raven Press, New York
52. Flexner C (1998): HIV-protease inhibitors. *N. Engl. J. Med.* **338**:1281-92

53. Frankel AD, Young JA (1998): HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:1-25
54. Frank-Kamenetskii MD, Mirkin SM (1995): Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:65-95
55. Frankel AD, Young JA (1998): HIV-1: fifteen proteins and an RNA. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:1-25
56. Galderisi U, Cascino A, Giordano A (1999): Antisense oligonucleotides as therapeutic agents. *J. Cell Physiol.* **181**:251-7
57. Gait MJ (ed) (1984): Oligonucleotide synthesis: a practical approach pp. 35-39, IRL Press Limited, Oxford
58. Gallina A, Hanley TM, Mandel R, Trahey M, Broder CC, Viglianti GA, Ryser HJ (2002): Inhibitors of protein-disulfide isomerase prevent cleavage of disulfide bonds in receptor-bound glycoprotein 120 and prevent HIV-1 entry. *J. Biol. Chem.* **277**:50579-88
59. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y (2000): DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**:587-97
60. Goff SP (1990): Retroviral reverse transcriptase: synthesis, structure, and function. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **3**:817-31
61. Goodchild J, Agrawal S, Civeira MP, Sarin PS, Sun D, Zamecnik PC (1988): Inhibition of human immunodeficiency virus replication by antisense oligodeoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5507-11
62. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, Saxon A (1981): Pneumocystis carinii pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* **305**:1425-31
63. Hélène C (1997): [The "antisense" strategy: a new approach in the development of antineoplastic substances and gene therapy]. *J. Pharm. Belg.* **52**:79-85
64. Hodge CN, Aldrich PE, Bacheler LT, Chang CH, Eyermann CJ, Garber S, Grubb M, Jackson DA, Jadhav PK, Korant B, Lam PY, Maurin MB, Meek JL, Otto MJ, Rayner MM, Reid C, Sharpe TR, Shum L, Winslow DL, Erickson-Viitanen S. (1996): Improved cyclic urea inhibitors of the HIV-1 protease: synthesis, potency, resistance profile, human pharmacokinetics and X-ray crystal structure of DMP 450. *Chem. Biol.* **3**:301-14
65. Hoffman AD, Banapour B, Levy JA (1985): Characterization of the AIDS-associated retrovirus reverse transcriptase and optimal conditions for its detection in virions. *Virology* **147**:326-35

66. Hong H, Neamati N, Winslow HE, Christensen JL, Orr A, Pommier Y, Milne GW. (1998): Identification of HIV-1 integrase inhibitors based on a four-point pharmacophore. *Antivir. Chem. Chemother.* **9**:461-72
67. Hogg PJ (2003): Disulfide bonds as switches for protein function. *Trends. Biochem. Sci.* **28**:210-14
68. Horváth A, Aradi J (2005): Advantages of sodium-perchlorate solution as mobile phase for purification of synthetic oligonucleotides by anionexchange chromatography *Analytical Biochemistry* **338**, 341-343
69. Hu WS, Temin HM (1990): Genetic consequences of packaging two RNA genomes in one retroviral particle: pseudodiploidy and high rate of genetic recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:1556-60
70. Inagawa T, Nakashima H, Karwowski B, Guga P, Stec WJ, Takeuchi H, Takaku H (2002): Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by P-stereodefined oligo(nucleoside phosphorothioate)s in a long-term infection model. *FEBS Lett.* **528**:48-52
71. Inoue T, Sullivan FX, Cech TR (1985): Intermolecular exon ligation of the rRNA precursor of Tetrahymena: oligonucleotides can function as 5' exons. *Cell* **43**:431-7
72. Jadhav PK, Woerner FJ, Lam PY, Hodge CN, Eyermann CJ, Man HW, Daneker WF, Bacheler LT, Rayner MM, Meek JL, Erickson-Viitanen S, Jackson DA, Calabrese JC, Schadt M, Chang CH (1998): Nonpeptide cyclic cyanoguanidines as HIV-1 protease inhibitors: synthesis, structure-activity relationships, and X-ray crystal structure studies. *J. Med. Chem.* **41**:1446-55
73. Jayasena SD (1999): Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clin. Chem.* **45**:1628-50
74. Jeang KT, Berkhout B (1992): Kinetics of HIV-1 long terminal repeat trans-activation. Use of intragenic ribozyme to assess rate-limiting steps. *J. Biol. Chem.* **267**:17891-9
75. Jeang KT, Berkhout B, Dropulic B (1993): Effects of integration and replication on transcription of the HIV-1 long terminal repeat. *J. Biol. Chem.* **268**:24940-9
76. Jing N, Hogan ME (1998): Structure-activity of tetrad-forming oligonucleotides as a potent anti-HIV therapeutic drug. *J. Biol. Chem.* **273**:34992-9
77. Kao SY, Calman AF, Luciw PA, Peterlin BM (1987): Anti-termination of transcription within the long terminal repeat of HIV-1 by tat gene product. *Nature* **330**:489-93
78. Katz RA, Skalka AM (1994): The retroviral enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 133-7
79. Kinchington D, Galpin S, Jaroszewski JW, Ghosh K, Subasinghe C, Cohen JS (1992): A comparison of gag, pol and rev antisense oligodeoxynucleotides as inhibitors of HIV-1. *Antiviral Res.* **17**:53-62

80. Kraszewski A, Delort AM, Teoule R (1986): Synthesis of N⁴-mono- and dialkyl-2'-deoxycytidines and their insertion into an oligonucleotide. *Tetrahedron Lett.* **27**:861-864
81. Kung MP, Ho YK, Bardos TJ (1982): 5-Mercaptopolyuridylic acid (MPU), a potent inhibitor of the reverse transcriptase from avian myeloblastosis virus. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **36**:215-28
82. Kurreck J (2003): Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* **270**:1628-44
83. Kuwasaki T, Hatta M, Takeuchi H, Takaku H (2003): Inhibition of human immunodeficiency virus 1 replication in vitro by a self-stabilized oligonucleotide with 2'-O-methyl-guanosine-uridine quadruplex motifs. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**:813-9
84. LaBranche CC, Galasso G, Moore JP, Bolognesi DP, Hirsch MS, Hammer SM (2001): HIV fusion and its inhibition. *Antiviral Res.* **50**:95-115
85. Lam PY, Ru Y, Jadhav PK, Aldrich PE, DeLucca GV, Eyermann CJ, Chang CH, Emmett G, Holler ER, Daneker WF, Li L, Confalone PN, McHugh RJ, Han Q, Li R, Markwalder JA, Seitz SP, Sharpe TR, Bacheler LT, Rayner MM, Klabe RM, Shum L, Winslow DL, Kornhauser DM, Jackson DA, Erickson-Viitanen S, Hodge CN (1996): Cyclic HIV protease inhibitors: synthesis, conformational analysis, P2/P2' structure-activity relationship, and molecular recognition of cyclic ureas. *J. Med. Chem.* **39**:3514-25
86. Laspia MF, Rice AP, Mathews MB (1989): Tat protein increases transcriptional initiation and stabilizes elongation. *Cell* **59**:283-92
87. Leonard CK, Spellman MW, Riddle L, Harris RJ, Thomas JN, Gregory TJ (1990): Assignment of intrachain disulfide bonds and characterization of potential glycosylation sites of the type 1 recombinant human immunodeficiency virus envelope glycoprotein (gp120) expressed in Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* **265**:10373-82
88. Lisziewicz J, Sun D, Weichold FF, Thierry AR, Lusso P, Tang J, Gallo RC, Agrawal S (1994): Antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioate complementary to Gag mRNA blocks replication of human immunodeficiency virus type 1 in human peripheral blood cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:7942-6
89. Majumdar C, Stein CA, Cohen JS, Broder S, Wilson SH (1989): Stepwise mechanism of HIV reverse transcriptase: primer function of phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *Biochemistry* **28**:1340-6
90. Malim MH, Cullen BR (1991): HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* **65**: 241-48
91. Manoharan M (2004): RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**:570-9
92. Masur H, Michelis MA, Greene JB, Onorato I, Stouwe RA, Holzman RS, Wormser G, Brettman L, Lange M, Murray HW, Cunningham-Rundles S. (1981): An outbreak of

community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular immune dysfunction. *N. Engl. J. Med.* **305**:1431-38

93. Matkó J, Bodnár A, Vereb G, Bene L, Vámosi G, Szentesi G, Szöllősi J, Gáspár R, Horejsi V, Waldmann TA, Damjanovich S (2002): GPI-microdomains (membrane rafts) and signaling of the multi-chain interleukin-2 receptor in human lymphoma/leukemia T cell lines. *Eur. J. Biochem.* **269**:1199-208

94. Matsukura M, Shinozuka K, Zon G, Mitsuya H, Reitz M, Cohen JS, Broder S (1987): Phosphorothioate analogs of oligodeoxynucleotides: inhibitors of replication and cytopathic effects of human immunodeficiency virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7706-10

95. Matsukura M, Zon G, Shinozuka K, Robert-Guroff M, Shimada T, Stein CA, Mitsuya H, Wong-Staal F, Cohen JS, Broder S (1989): Regulation of viral expression of human immunodeficiency virus in vitro by an antisense phosphorothioate oligodeoxynucleotide against rev (art/trs) in chronically infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:4244-8

96. Matthias LJ, Hogg PJ (2003): Redox control on the cell surface: implications for HIV-1 entry. *Antioxid. Redox. Signal.* **5**:133-8

97. Matthias LJ, Yam PT, Jiang XM, Vandegraaff N, Li P, Pombourios P, Donoghue N, Hogg PJ (2002): Disulfide exchange in domain 2 of CD4 is required for entry of HIV-1. *Nat. Immunol.* **3**:727-32

98. McCutchan FE (2000): Understanding the genetic diversity of HIV-1. *AIDS* **14**: S31-44

99. McGregor A, Rao MV, Duckworth G, Stockley PG, Connolly BA (1996): Preparation of oligoribonucleotides containing 4-thiouridine using Fmp chemistry. Photo-crosslinking to RNA binding proteins using 350 nm irradiation. *Nucleic Acids Res.* **24**:3173-80

100. Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH (1996): Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* **70**:2350-9

101. Menéndez-Arias L (2002): Molecular basis of fidelity of DNA synthesis and nucleotide specificity of retroviral reverse transcriptases. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**:91-147

102. Menéndez-Arias L (2002): Targeting HIV: antiretroviral therapy and development of drug resistance. *Trends Pharmacol. Sci.* **23**:381-8

103. Merluzzi VJ, Hargrave KD, Labadia M, Grozinger K, Skoog M, Wu JC, Shih CK, Eckner K, Hattox S, Adams J, et al. (1990): Inhibition of HIV-1 replication by a nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor. *Science* **250**:1411-3

104. Meyer BE, Meinkoth JL, Malim MH (1996): Nuclear transport of human immunodeficiency virus type 1, visna virus, and equine infectious anemia virus Rev proteins: identification of a family of transferable nuclear export signals. *J. Virol.* **70**:2350-9

105. Miura K, Shiga M, Ueda T (1973): Nucleosides and nucleotides. VI. Preparation of diribonucleoside monophosphates containing 4-thiouridine. *J. Biochem.* **73**:1279-84
106. Miura K, Ueda T (1980): Modification of cytosine moieties of nucleic acid with hydrogen sulfide (nucleosides and nucleotides. XXXIV). *Chem. Pharm. Bull.* **28**:3415-8
107. Miyasaka T, Tanaka H, Baba M, Hayakawa H, Walker RT, Balzarini J, De Clercq E (1989): A novel lead for specific anti-HIV-1 agents: 1-[(2-hydroxyethoxy)methyl]-6-(phenylthio)thymine. *J. Med. Chem.* **32**:2507-9
108. Molla A, Granneman GR, Sun E, Kempf DJ (1998): Recent developments in HIV protease inhibitor therapy. *Antiviral Res.* **39**:1-23
109. Morishita R, Tomita N, Kaneda Y, Ogihara T (2004): Molecular therapy to inhibit NFkappaB activation by transcription factor decoy oligonucleotides. *Curr. Opin. Pharmacol.* **4**:139-46
110. Nagatsugi F, Sasaki S (2004): Chemical tools for targeted mutagenesis of DNA based on triple helix formation. *Biol. Pharm. Bull.* **27**:463-7
111. Najera I, Krieg M, Karn J (1999): Synergistic stimulation of HIV-1 rev-dependent export of unspliced mRNA to the cytoplasm by hnRNP A1. *J. Mol. Biol.* **285**:1951-64
112. Neamati N, Hong H, Owen JM, Sunder S, Winslow HE, Christensen JL, Zhao H, Burke TR Jr, Milne GW, Pommier Y (1998): Salicylhydrazine-containing inhibitors of HIV-1 integrase: implication for a selective chelation in the integrase active site. *J. Med. Chem.* **41**:3202-9
113. Nielsen PE (1999): Peptide nucleic acids as therapeutic agents. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**:353-7
114. Nikiforov TT, Conolly BA (1992): Straightforward preparation and use in oligodeoxynucleotide synthesis of 5'-O-(4,4'-dimethoxitriyl)-4-[S-(2-cyanoethyl)]-thiothymidine. *Tetrahedron Lett.* **33**:2379-82
115. Ojwang JO, Buckheit RW, Pommier Y, Mazumder A, De Vreese K, Este JA, Reymen D, Pallansch LA, Lackman-Smith C, Wallace TL, De Clercq E, McGrath MS, Rando RF (1995): T30177, an oligonucleotide stabilized by an intramolecular guanosine octet, is a potent inhibitor of laboratory strains and clinical isolates of human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **39**:2426-35
116. Olsen HS, Cochrane AW, Dillon PJ, Nalin CM, Rosen CA (1990): Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Rev protein with a structured region in env mRNA is dependent on multimer formation mediated through a basic stretch of amino acids. *Genes Dev.* **4**:1357-64
117. Ørum H, Wengel J (2001): Locked nucleic acids: a promising molecular family for gene-function analysis and antisense drug development. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **3**:239-43

118. Oude Essink BB, Das AT, Berkhout B (1995): Structural requirements for the binding of tRNA Lys3 to reverse transcriptase of the human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **270**:23867-74
119. Pauwels R, Andries K, Desmyter J, Schols D, Kukla MJ, Breslin HJ, Raeymaeckers A, Van Gelder J, Woestenborghs R, Heykants J, Schellekens K, Janssen MAC, De Clercq E, Janssenet PAJ (1990): Potent and selective inhibition of HIV-1 replication in vitro by a novel series of TIBO derivatives. *Nature* **343**:470-4
120. Percherancier Y, Lagane B, Planchenault T, Staropoli I, Altmeyer R, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F, Hoessli DC, Bachelier F (2003): HIV-1 entry into T-cells is not dependent on CD4 and CCR5 localization to sphingolipid-enriched, detergent-resistant, raft membrane domains. *J. Biol. Chem.* **278**:3153-61
121. Perrin L, Kaiser L, Yerly S (2003): Travel and the spread of HIV-1 genetic variants. *Lancet Infect. Dis.* **3**:22-7
122. Pierson TC, Doms RW (2003): HIV-1 entry and its inhibition. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **281**:1-27
123. Pitha PM, Ciufo DM, Kellum M, Raj NB, Reyes GR, Hayward GS (1982): Induction of human beta-interferon synthesis with poly(rI . rC) in mouse cells transfected with cloned cDNA plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**:4337-41
124. Popik W, Alce TM, Au WC (2002): Human immunodeficiency virus type 1 uses lipid raft-colocalized CD4 and chemokine receptors for productive entry into CD4(+) T cells. *J. Virol.* **76**:4709-22
125. Poppe SM, Slade DE, Chong KT, Hinshaw RR, Pagano PJ, Markowitz M, Ho DD, Mo H, Gorman RR 3rd, Dueweke TJ, Thaisrivongs S, Tarpley WG (1997): Antiviral activity of the dihydropyrene PNU-140690, a new nonpeptidic human immunodeficiency virus protease inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1058-63
126. Radhakrishnan I, Patel DJ (1994): Hydration sites in purine.purine.pyrimidine and pyrimidine. purine.pyrimidine DNA triplexes in aqueous solution. *Structure* **2**:395-405
127. Raj NB, Pitha PM (1983): Two levels of regulation of beta-interferon gene expression in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:3923-7
128. Rana TM, Jeang KT (1999): Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch. Biochem. Biophys.* **365**:175-85
129. Root MJ, Kay MS, Kim PS (2001): Protein design of an HIV-1 entry inhibitor. *Science* **291**:884-8
130. Ryu SE, Kwong PD, Truneh A, Porter TG, Arthos J, Rosenberg M, Dai XP, Xuong NH, Axel R, Sweet RW, Hendrickson WA (1990): Crystal structure of an HIV-binding recombinant fragment of human CD4. *Nature* **348**:419-26

131. Sakaida H, Hori T, Yonezawa A, Sato A, Isaka Y, Yoshie O, Hattori T, Uchiyama T (1998): T-tropic human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-derived V3 loop peptides directly bind to CXCR-4 and inhibit T-tropic HIV-1 infection. *J. Virol.* **72**:9763-70
132. Sattentau QJ (1998): HIV gp120: double lock strategy foils host defences. *Structure* **6**:945-9.
133. Scarlata S, Carter C (2003): Role of HIV-1 Gag domains in viral assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **1614**:62-72
134. Scheit KH (1968): Über die Synthese und Eigenschaften von 4-thiouridylyl-(3'-5')-4-thiouridin, 4-thiouridylyl-(3'-5')-uridin und uridylyl-(3'-5')-4-thiouridin. *Biochim. Biophys. Acta* **166**:285-293
135. Sebestyén Z, Nagy P, Horváth G, Vámosi G, Debets R, Gratama JW, Alexander DR, Szöllösi J (2002): Long wavelength fluorophores and cell-by-cell correction for autofluorescence significantly improves the accuracy of flow cytometric energy transfer measurements on a dual-laser benchtop flow cytometer. *Cytometry* **48**:124-35
136. Siegal FP, Lopez C, Hammer GS, Brown AE, Kornfeld SJ, Gold J, Hassett J, Hirschman SZ, Cunningham-Rundles C, Adelsberg BR (1981): Severe acquired immunodeficiency in male homosexuals, manifested by chronic perianal ulcerative herpes simplex lesions. *N. Engl. J. Med.* **305**: 1439-44
137. Simon F, Mauciere P, Roques P, Loussert-Ajaka I, Muller-Trutwin MC, Saragosti S, Georges-Courbot MC, Barre-Sinoussi F, Brun-Vezinet F (1998): Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group. O. *Nat. Med.* **4**:1032-37
138. Simuth J, Scheit KH, Gottschalk EM (1970): The enzymatic synthesis of poly 4-thiouridylic acid by polynucleotide phosphorylase from Escherichia coli. *Biochim. Biophys. Acta.* **204**:371-80
139. Skulnick HI, Johnson PD, Howe WJ, Tomich PK, Chong KT, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Dolak LA, McGrath JP, Lynn JC, Horng MM, Hinshaw RR, Zipp GL, Ruwart MJ, Schwende FJ, Zhong WZ, Padbury GE, Dalga RJ, Shiou L, Possert PL, Rush BD, Wilkinson KF, Howard GM, Toth LN, Williams MG, Kakuk TJ, Cole SL, Zaya RM, Lovasz KD, Morris JK, Romines KR, Thaisrivongs S, Aristoff PA (1995): Structure-based design of sulfonamide-substituted non-peptidic HIV protease inhibitors. *J. Med. Chem.* **38**:4968-71
140. Smerdon SJ, Jager J, Wang J, Kohlstaedt LA, Chirino AJ, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA (1994): Structure of the binding site for nonnucleoside inhibitors of the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3911-5
141. Stein CA, Neckers LM, Nair BC, Mumbauer S, Hoke G, Pal R (1991): Phosphorothioate oligodeoxycytidine interferes with binding of HIV-1 gp120 to CD4. *J. Acquir. Immune. Defic. Syndr.* **4**:686-93

142. Thaisrivongs S, Tomich PK, Watenpaugh KD, Chong KT, Howe WJ, Yang CP, Strohbach JW, Turner SR, McGrath JP, Bohanon MJ, Lynn JC, Mulichak AM, Spinelli PA, Hinshaw RR, Pagano PJ, Moon JB, Ruwart MJ, Wilkinson KF, Rush BD, Zippy GL, Dalga RJ, Schwende FJ, Howard GM, Padbury GE, Toth LN, Zhao Z, Koeplinger KA, Kakuk TJ, Cole SL, Zaya RM, Piper RC, Jeffrey P (1994): Structure-based design of HIV protease inhibitors: 4-hydroxycoumarins and 4-hydroxy-2-pyrones as non-peptidic inhibitors. *J. Med. Chem.* **37**:3200-4
143. Thomson MM, Perez-Alvarez L, Najera R (2002): Molecular epidemiology of HIV-1 genetic forms and its significance for vaccine development and therapy. *Lancet Infect. Dis.* **2**:461-71
144. Tomita N, Azuma H, Kaneda Y, Ogihara T, Morishita R (2004): Application of decoy oligodeoxynucleotides-based approach to renal diseases. *Curr. Drug. Targets.* **5**:717-33
145. Toulmé JJ, Darfeuille F, Kolb G, Chabas S, Staedel C (2003): Modulating viral gene expression by aptamers to RNA structures. *Biol. Cell.* **95**:229-38
146. Tőkés S, Aradi J (1995): Inhibition of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase by partially 5-thiolated polyuridylic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1261**:115-20
147. Tőkés S, Aradi J (1996): (s4dU)35: a novel, highly potent oligonucleotide inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *FEBS Lett.* **396**:43-6
148. Tözsér J (2003): Stages of HIV replication and targets for therapeutic intervention. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**:1447-57
149. Trono D (1995): HIV accessory proteins: leading roles for the supporting cast. *Cell* **82**:189-92
150. Tsukahara S, Suzuki J, Hiratou T, Takai K, Koyanagi Y, Yamamoto N, Takaku H (1997): Inhibition of HIV-1 replication by triple-helix-forming phosphorothioate oligonucleotides targeted to the polypurine tract. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **233**:742-7
151. Turville SG, Arthos J, Donald KM, Lynch G, Naif H, Clark G, Hart D, Cunningham AL (2001): HIV gp120 receptors on human dendritic cells. *Blood* **98**:2482-8
152. Wang JH, Yan YW, Garrett TP, Liu JH, Rodgers DW, Garlick RL, Tarr GE, Husain Y, Reinherz EL, Harrison SC (1990): Atomic structure of a fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature* **348**:411-8
153. Weiss R, Teich N, Varmus H, Coffin J (ed), (1984): RNA tumor viruses pp. 25-207, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
154. Weissenhorn W, Wharton SA, Calder LJ, Earl PL, Moss B, Aliprandis E, Skehel JJ, Wiley DC (1996): The ectodomain of HIV-1 env subunit gp41 forms a soluble, alpha-helical, rod-like oligomer in the absence of gp120 and the N-terminal fusion peptide. *EMBO J.* **15**:1507-14

155. Wu L, Gerard NP, Wyatt R, Choe H, Parolin C, Ruffing N, Borsetti A, Cardoso AA, Desjardin E, Newman W, Gerard C, Sodroski J (1996): CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* **384**:179-83
156. Wyatt R, Kwong PD, Desjardins E, Sweet RW, Robinson J, Hendrickson WA, Sodroski JG (1998): The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein. *Nature* **393**:705-11
157. Wyatt R, Sodroski J (1998): The HIV-1 envelope glycoproteins: fusogens, antigens, and immunogens. *Science* **280**:1884-8
158. Yamaguchi K, Papp B, Zhang D, Ali AN, Agrawal S, Byrn RA (1997): The multiple inhibitory mechanisms of GEM 91, a gag antisense phosphorothioate oligonucleotide, for human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*. **13**:545-54
159. Zamecnik PC, Agrawal S (1991): Oligodeoxynucleotide hybridization inhibition of HIV and influenza virus. *Nucleic Acids Symp. Ser.* **24**:127-31