



Latency-reversing agents as part of the strategies to cure HIV infection

Title in Spanish: *Agentes reversores de latencia como parte de las estrategias para curar la infección HIV*

M.^a del Carmen Avendaño López^{1,*}

¹Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: There is no cure yet for HIV-1, but therapeutic research based on the elimination of the latent viral reservoir by pharmacologic strategies is going on. We summarize here the molecular mechanisms implied in the viral infection and latency, as well as those of the latency-reversing agents so far studied.

RESUMEN: Aunque todavía no hay curación para la infección por HIV-1, hay varias estrategias farmacológicas en desarrollo que tienen como objetivo eliminar el reservorio de los virus latentes. Se analizan aquí los mecanismos moleculares implicados en la infección y latencia de los virus HIV, así como aquellos por los que actúan los agentes reversores de latencia estudiados hasta el momento.

*Corresponding Author: avendano@ucm.es

Received: April 5, 2017 Accepted: April 5, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 2 (2017), pp. 211-223

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (AIDS),¹ detectado por primera vez en 1981, es el desenlace final de una infección originada por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1) que favorece el desarrollo de enfermedades oportunistas y de procesos oncogénicos y autoinmunes. Gracias a la actividad de anticuerpos específicos neutralizantes y de los linfocitos T CD8+ citotóxicos (CTLs), la respuesta inmune controla la replicación viral en las fases iniciales de la infección, y en algunos infectados no progresa la enfermedad sin tratamiento con terapia antirretroviral (ART). Sin embargo, en la inmensa mayoría la infección progresa y genera un estado de activación del sistema inmune que contribuye a la eliminación de las células diana, los linfocitos T CD4+, y de las vecinas no infectadas. Los órganos linfoides se deterioran y los mecanismos efectores de dicho sistema se alteran, desencadenando la inmunodeficiencia característica de esta enfermedad. Según estimaciones de las Naciones Unidas, en el año 2015 había en el mundo 37 millones de personas infectadas, alrededor de 2 millones se habían infectado por vez primera, y 1,1 millones murieron por problemas relacionados con esta infección.

2. EFICACIA Y PROBLEMAS DE LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL Y DE LA PREVENCIÓN DE LA INFECCIÓN

A finales de los años 1990 se descubrió que los virus

HIV-1 pueden permanecer muchos meses o incluso años latentes (ocultos e inactivos), integrados en el genoma de ciertas células del sistema inmune del hospedador, sin ser atacados por las terapias antirretrovirales. Gracias a la eficacia de los antivirales actualmente disponibles administrados en distintas combinaciones, se ha conseguido reducir espectacularmente las tasas de enfermedad y muerte de personas por esta infección, que ha pasado de considerarse una de las pandemias más devastadoras de la historia de la humanidad a convertirse en una enfermedad crónica. Sin embargo, los fármacos antirretrovirales sólo actúan contra los virus que se alojan en células activadas, siendo inactivos contra los reservorios de virus latentes. Por esta razón, la interrupción del tratamiento conduce a un rápido repunte de la viremia, haciendo necesaria la administración de estos fármacos durante toda la vida. Este requisito supone un coste elevado imposible para muchos enfermos, y una obligada adhesión a la terapia con los consiguientes efectos secundarios y la aparición de resistencias.

Por otra parte, aunque la mejor manera de frenar esta enfermedad sería la administración de vacunas preventivas, encontrar una vacuna HIV eficaz es uno de los mayores desafíos a los que se enfrenta la medicina. Esta dificultad se debe fundamentalmente a la heterogeneidad de los virus HIV, con gran diversidad de subtipos y una alta tasa mutacional que favorece la aparición de variantes virales de escape; a la dificultad para encontrar buenos modelos de animales para su ensayo; y a que las vacunas mimetizan la respuesta inmune de los pacientes que superan una enfermedad, pero los anticuerpos que produce la persona infectada por HIV no

¹ En este trabajo se utilizan todas las siglas según la denominación inglesa a excepción de los ácidos nucleicos ADN y ARN.

son capaces de acabar con ella.

En el año 2003 se abandonó por falta de eficacia un ensayo clínico bastante avanzado con la primera vacuna que se probó en humanos. Desarrollada por la empresa VaxGen, se basaba en la proteína de la envuelta vírica gp120, y utilizaba alúmina como adyuvante. El hecho de que la proteína gp120 se administrara en forma monomérica, mientras que en el virus se encuentra como trímero asociada al dominio de transmembrana gp41, se sugirió como posible causa de su fracaso. Otra vacuna denominada V500, basada en un adenovirus de serotipo 5 que poseía fragmentos genéticos de HIV procedentes de varios subtipos, se estudió durante unos 10 años por la compañía Merck en colaboración con un consorcio internacional, pero su desarrollo se suspendió por falta de eficacia en 2007 (1).

En 2009 se atisbó que eran posibles las vacunas HIV preventivas al publicarse los resultados del ensayo clínico RV144 realizado en Tailandia. En él se administró conjuntamente el vector ALVAC-HIV (basado en un vector *canarypox*), proteínas víricas como gp120, y un adyuvante para potenciar la respuesta inmunitaria. El riesgo de adquirir la infección pasó a ser de un 31,2 %, una cifra baja pero estadísticamente significativa. Actualmente se está poniendo en marcha en África del Sur el ensayo HTVN 702 con una versión modificada de esta vacuna, cuyos resultados se esperan a finales de 2020. El proyecto, financiado por la *Pox Protein Public Private Partnership* (P5) de la que forma parte la Fundación Bill & Melinda Gates, ha motivado que la investigación sobre vacunas preventivas anti HIV se contemple con un nuevo optimismo, como se reflejó en la 21^a *International AIDS Conference* celebrada en Durban en 2016. Los primeros datos sobre seguridad e inmunogenicidad de la vacuna preventiva SAV001, que utiliza un virus genéticamente modificado y desactivado, han sido prometedores (2). También se estudian nuevas aproximaciones, entre las que se encuentra la inmunoprofilaxis con vector (*vectored immunoprophylaxis*). En ésta, se administran virus diferentes al HIV para que en el interior de las células generen anticuerpos ampliamente neutralizantes que podrían atacar a todos los tipos HIV.

En el año 2015, ensayos clínicos con la vacuna terapéutica MVA-B administrada en combinación con antirretrovirales, demostraron que es un buen candidato para mejorar las respuestas inmunes frente al HIV en individuos infectados (3). Esta vacuna se desarrolla dentro del proyecto Eurovac, financiado por la UE desde 1999, con la participación de un equipo dirigido por el Dr. M. Esteban en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC. En ella se utilizan poxvirus, en particular los vectores atenuados MVA-B y NYVAC (MVA, hace referencia a *Modified Vaccinia Ankara* y B al subtipo HIV-B el más frecuente en Europa, mientras que NYVAC hace referencia a *New York vaccinia virus*) (4).

3. MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN LA INFECCIÓN Y LATENCIA DE LOS VIRUS HIV

A pesar de los progresos logrados, conseguir la erradicación del virus HIV con fármacos y/o vacunas profilácticas o terapéuticas sigue siendo un objetivo muy difícil, si no imposible. Como ya hemos dicho, HIV es una infección que progresa hasta originar una enfermedad (AIDS), pero antes de que esto ocurra existe un largo periodo “durmiente” (de latencia) en el que el virus se esconde en el ADN de la persona infectada. Como todos los virus, HIV necesita utilizar la maquinaria que contienen determinadas células del hospedador para realizar la mayor parte de los pasos de su ciclo vital. En este caso, las principales células diana son los linfocitos T CD4⁺, que presentan en su superficie una proteína receptora miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas llamada CD4 (*cluster of differentiation* 4). Aunque el virus también afecta a otras células del sistema inmune innato, exhibe en ellas una menor capacidad de replicación.

El tropismo del HIV está gobernado fundamentalmente por la expresión de un complejo receptor en la superficie de las células diana, a través del cual se produce la interacción entre la membrana viral y la celular y la subsiguiente entrada de subpartículas virales por fusión. Este complejo está formado por la proteína viral gp120, la proteína CD4 anteriormente mencionada y los correceptores CXCR4 ó CC que se encuentran en las células diana. Estos últimos pertenecen a la familia de receptores de citocinas, siendo los más importantes CXCR4 y CCR5. Cuando los linfocitos T CD4⁺ están activados, tiene lugar en ellos la replicación vírica que, cuando es masiva, lleva aparejada su destrucción y la inactivación del sistema inmune del hospedador.

La entrada del HIV en los linfocitos T CD4⁺ activados origina distintos procesos bioquímicos: elevación de los niveles del correceptor CCR5 (5), activación de la transcripción reversa mediante un aumento de los depósitos de desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTP), liberación de factores de transcripción como NF-κB (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) y P-TEFb (*positive transcription elongation factor-b*) (6), y promoción de algunas modificaciones epigenéticas como la desacetilación o metilación de histonas y la metilación del ADN. Tras su entrada por fusión, las subpartículas virales se liberan en el citoplasma y se inicia la transcripción inversa (RT) del ARN viral en ADN parcialmente bicatenario que, junto con ciertas proteínas virales y factores celulares, se transporta al núcleo donde copias completas de ADN de doble cadena se integran en el genoma celular. Estas copias sirven de molde a la ARN polimerasa II que, con la colaboración de ciertas proteínas y factores, producen los ARNs virales. Éstos se exportan después al citoplasma, donde forman estructuras virales inmaduras que se liberan y transforman al mismo tiempo o inmediatamente después en virus maduros.

Una pequeña población de aproximadamente $1/10^6$ de las células infectadas permanece en un estado durmiente o de reposo (rCD4+), y en ellas, el virus no puede completar la retrotranscripción de su genoma ARN a ADN ni la integración de éste en el del hospedador, por lo que el genoma vírico persiste en su núcleo durante largos periodos de tiempo sin que pueda generarse ni expandirse una progenie viral (7,8). Este fenómeno ocurre muy pocas veces y es más bien un hecho accidental, pero afecta a todos los infectados por HIV siendo la causa más importante que impide su curación.

Los linfocitos rCD4 generan una barrera física de actina cortical que dificulta la entrada de nuevos virus y producen muy pocas proteínas virales o ninguna debido a que en ellos están inactivos muchos programas de transcripción. También es posible que estos linfocitos se sitúen en lugares anatómicos inaccesibles a las TCLs (9,10). Uno de los mecanismos por los que se bloquea la replicación viral consiste en una disminución de los depósitos de dNTP disponibles para que la transcriptasa inversa catalice la síntesis del ADN complementario (cDNA) viral. Esta circunstancia se produce por la activación del factor de restricción SAMHD1, que produce una enzima que hidroliza los desoxirribonucleósido trifosfatos (dNTPs) y los convierte en fosfato inorgánico (iPPP) y 2'-desoxirribonucleósidos (11).

4. BÚSQUEDA DE AGENTES REVERSORES DE LATENCIA. ESTRATEGIAS *SHOCK AND KILL*

Desde hace algunos años se ha explorado la reactivación del reservorio de HIV-1 latente mediante la administración de fármacos dirigidos a contrarrestar los mecanismos por los que éste se genera. Se trata de promover la expresión génica viral en los linfocitos rCD4+ con la esperanza de que estas células infectadas mueran como consecuencia de los efectos citopáticos de los virus y de la respuesta inmune específica natural o inducida (12). La activación global de las células T revierte la latencia, pero es tóxica (13), por lo que se buscan moléculas que no activen a las células T en su conjunto. Si estos nuevos fármacos, denominados agentes reversores de latencia (*latency-reversing agents*, LRA), se combinan con terapias antivirales o con vacunas terapéuticas, los virus reactivados podrían ya multiplicarse, pero no podrían infectar nuevas células (14).

Estas estrategias se denominan *shock and kill* porque tratan de despertar al enemigo, hacerlo salir de su

escondite y matarlo. Con ellas podría ser posible eliminar las cepas resistentes y curar la infección, o al menos lograr remisiones prolongadas libres de tratamiento terapéutico.

Debido a que los linfocitos rCD4+ son muy poco frecuentes in vivo, se han utilizado en estos estudios diversos modelos de latencia HIV-1 in vitro (15); quizás por ello, bastantes resultados han resultado inconsistentes (16,17). Se estima que si no se llega a conseguir la reversión de la latencia se tardarán muchos años en lograr la deseada erradicación del virus (18) por lo que, a pesar de las dificultades, se han estudiado clínicamente varios compuestos para conseguir este propósito. Entre ellos se incluyen inhibidores de desacetilasas de histonas (HDAC) como vorinostat y romidepsina, que funcionan fundamentalmente por mecanismos epigenéticos; disulfiram (Antabuse®), cuyo mecanismo como reversor de la latencia viral parece implicar al factor nuclear NF- κ B; o el compuesto JQ1, que también funciona por mecanismos epigenéticos. También se han estudiado algunos agonistas de proteína cinasa C (PKC) como los ésteres de forbol, la prostratina o la briostatina-1; agonistas del receptor TLR9 como lefitolimod; anticuerpos del receptor PD-1 como pembrolizumab; y ciertos fármacos inmunomoduladores (19). La actividad de algunos compuestos con diversas estructuras y mecanismos de acción se ha ido descubriendo también utilizando técnicas de cribado de alto rendimiento (20).

4.1. Inhibidores de histona desacetilasas (HDACS)

La acetilación de las histonas afecta a la estructura de la cromatina y supone una disfunción en el control epigenético, con alteraciones que conducen a la tumorigénesis o a la apoptosis. Aunque las histonas no interaccionan directamente con las polimerasas, su modificación afecta al modo en que el ADN se enrolla, lo que influye en los genes que se expresan. Generalmente, las histonas se encuentran en una forma desacetilada debida a la acción de las HDACs, lo que se asocia a una represión de la transcripción. La acetilación de los grupos ϵ -amino de los restos de lisina presentes en estas proteínas, que está catalizada por las acetiltransferasas de histonas (HATs), elimina la basicidad de los grupos amino de dicho aminoácido y por tanto su carga positiva, lo que debilita las interacciones electrostáticas entre las histonas y el ADN facilitando el acceso a éste de los factores de transcripción y de las polimerasas (Figura 1).

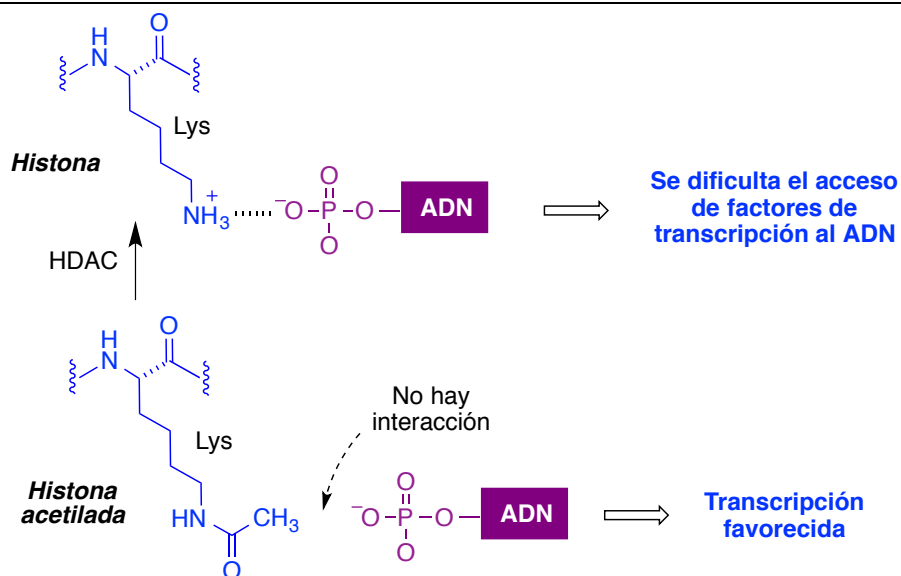


Figura 1. La acetilación de las histonas aumenta la transcripción del ADN.

Durante la latencia, los factores de transcripción del hospedador reclutan las enzimas HDAC1, HDAC2 y HDAC3, inhibiendo así la transcripción proviral al impedir el enlace de factores cruciales para el inicio de la transcripción vírica. De ahí el interés de los inhibidores

HDAC para su posible desarrollo como agentes reversores de latencia (21) y como agentes anticáncer solos o asociados a fármacos inmunomoduladores (22,23) (ver la Figura 2).

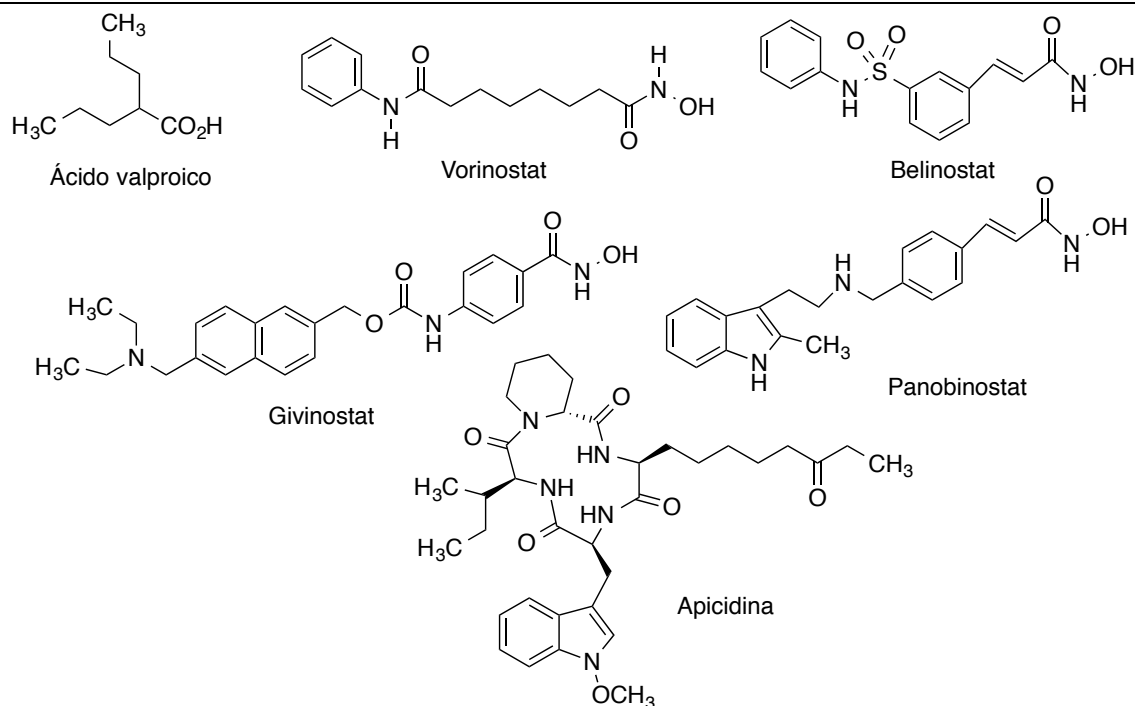


Figura 2. Ejemplos de inhibidores de HDACs estudiados como LRAs.

Hay que tener en cuenta que los inhibidores de HDACs no inducen la activación general de las células T ni la secreción de citocinas, y tampoco aumentan los niveles de CD4, CXCR4 o CCR5, pero pueden mostrar efectos secundarios debido a que la modificación de los niveles de acetil-histonas puede alterar la expresión de un gran número de genes. Además, muchos de estos inhibidores

pueden tener otras dianas alternativas; por ejemplo, en la acción de vorinostat como LRA está implicada también la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (24).

En el año 2005 el grupo del Dr. David Margolis, un investigador de la Universidad de Carolina del Norte, publicó en la revista *The Lancet* un estudio piloto que tuvo mucha repercusión en la prensa, ya que apuntaba a que la

infección HIV era curable. Este estudio mostraba que la combinación del antiviral enfuvirtida con **ácido valproico**, un anticonvulsivante utilizado para tratar enfermedades neurológicas y psiquiátricas como la epilepsia o el trastorno bipolar, reduce el número de linfocitos T CD4⁺ durmientes infectados con HIV-1 latentes (25). El equipo de Margolis demostró primero en estudios in vitro, que el ácido valproico estimulaba la liberación de los virus de estas células (26), un efecto que se atribuyó a la inhibición de la enzima HDAC1 inducida por este fármaco. Ésta permitiría la iniciación de la transcripción y la subsiguiente producción de proteínas víricas y viriones, seguida de la muerte celular causada por la citotoxicidad inducida. Paradójicamente, el ácido valproico no activaba a las células T CD4⁺ durmientes, por lo que no parecía claro cómo se promovía la transcripción del virus. De hecho, el estudio piloto de Margolis provocó reticencias en el

mundo científico (27) hasta que finalmente otro estudio con pacientes tratados con terapia antirretroviral de gran actividad, que recibieron simultáneamente ácido valproico, demostró que su uso en la clínica no ejerce un efecto complementario sobre el deterioro de los reservorios latentes de HIV (28). A pesar de este fracaso, la hipótesis de trabajo no se abandonó y dio paso a la búsqueda de nuevos LRAs inhibidores específicos de HDAC1 (29).

Vorinostat, conocido también como SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) o Zolinza[®], es un inhibidor de HDACs más selectivo que el ácido valproico que pertenece al grupo de los ácidos hidroxiámicos. Éstos inhiben HDACs al actuar como quelantes del átomo de Zn²⁺ que participa en la hidrólisis catalizada por estas enzimas de los grupos acetilamino en las histonas acetiladas (Figura 3).

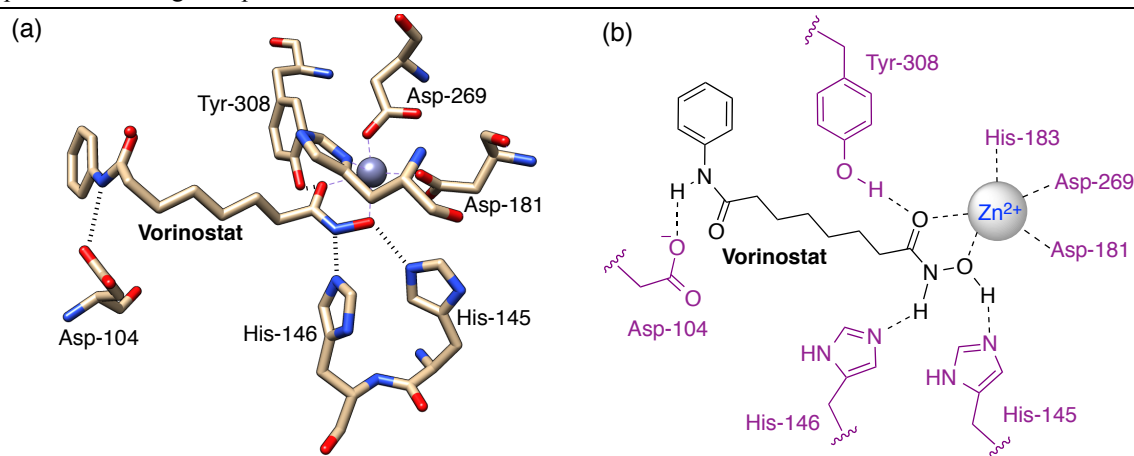


Figura 3. Interacción de vorinostat con el sitio activo de la HDAC2 humana.

Vorinostat se aprobó en 2006 por la FDA (no por la EMA) para el tratamiento de linfoma de células T y de mieloma múltiple. En 2012, Margolis y su grupo comprobaron que este fármaco no solo interrumpe la latencia del virus HIV-1 in vitro, sino que también lo hace en pacientes tratados con terapia antirretroviral (30). Aislado los linfocitos T CD4⁺ circulantes de ocho pacientes en los que la viremia se había suprimido con estas terapias, se observó que una única dosis de vorinostat aumentaba los biomarcadores de la acetilación e inducía simultáneamente un aumento de 5 veces en el ARN viral expresado en estas células, por lo que este trabajo supuso una prueba de concepto para el posible uso de los inhibidores de HDACs como agentes anti-HIV (31). Ensayos clínicos posteriores corroboraron que tras la interrupción de la terapia antirretroviral, vorinostat induce un aumento significativo de la transcripción de los virus latentes en la mayoría de los pacientes infectados (32). Sus análogos **givinostat** y **belinostat**, y el péptido cíclico **apicidina** (33), también han sido estudiados para reactivar la latencia HIV.

El interés de **romidepsina** como agente reversioner de latencia HIV surgió de un estudio in vitro en el que se trataba un modelo de células T latentes con tres

inhibidores de HDACs: el ya citado vorinostat, un análogo denominado **panobinostat** (Farydak[®]) aprobado en 2015 por la FDA y por la EMA para el tratamiento del mieloma múltiple, y la romidepsina. Esta última, conocida también como compuesto FR901228 o por su nombre comercial Istodax[®] (34), se aprobó en 2009 por la FDA para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer como la leucemia periférica o cutánea de células T, aunque fue rechazado por la EMA en 2012. En el estudio citado, la actividad de los tres fármacos para revertir la latencia HIV fue paralela a su actividad inhibidora de diversas isoenzimas HDAC humanas, siendo el más potente de los tres la romidepsina. Tras una terapia antirretroviral y 4 horas de exposición a una solución de romidepsina 40 nM, los niveles intracelulares de ARN vírico en los linfocitos T CD4⁺ aislados de pacientes infectados con HIV, tanto los durmientes como los activos, aumentaron unas 6 veces, y esta expresión persistió durante 48 h. La romidepsina también aumentó los niveles extracelulares de ARN vírico y de los viriones, produciéndose el efecto reversioner de la latencia a dosis sustancialmente más bajas que las que se utilizan en oncología (35).

Romidepsina es un depsipéptido que se aisló de la bacteria *Chromobacterium violaceum* procedente de una

muestra de suelo y se desarrolló originalmente por la empresa Fujisawa Pharmaceutical Company, denominada ahora Astellas Pharma. Es un profármaco que se activa por el glutatión en el interior de las células a través de la reducción de su puente disulfuro. La cadena de cuatro

carbonos terminada por uno de los dos grupos SH originados en dicha reducción, forma entonces un enlace covalente con el único residuo de cisteína presente en el bolsillo de la enzima HDAC, inactivándola (Figura 4).

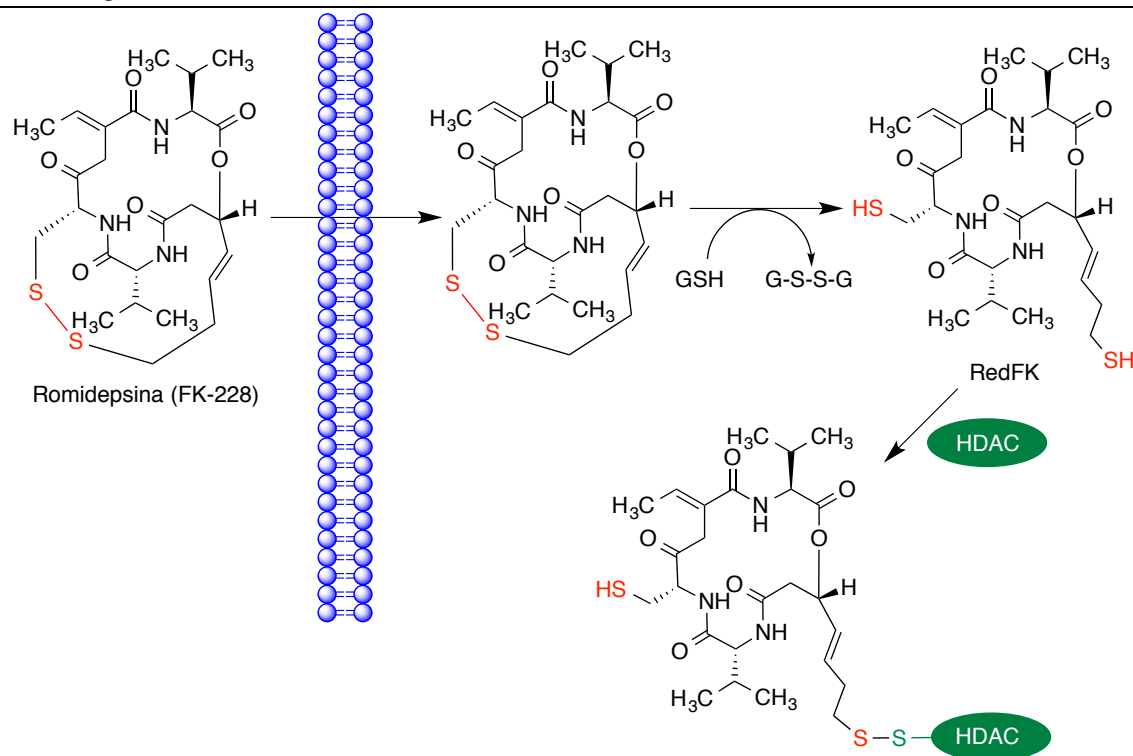


Figura 4. Bioactivación de romidepsina.

Entre los estudios *shock and kill* con romidepsina como LRA mencionaremos los ensayos en fase I/II NCT01933594 realizados en EEUU. En ellos participan infectados por HIV con una carga viral menor de 50 copias/mL tratados con un régimen que contiene efavirenz (Sustiva[®]), raltegravir (Isentress[®]), o dolutegravir (Tivicay[®]), a fin de identificar qué dosis de romidepsina es segura y eficaz para reactivar el HIV latente en los linfocitos rCD4⁺ (36). Entre los estudios que utilizan combinaciones de romidepsina con vacunas terapéuticas podemos citar los ensayos REDU I/IIa, realizados en Dinamarca con la vacuna terapéutica Vacc-4x, cuyos resultados se dieron a conocer en la *Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* (CROI) celebrada en Boston en 2016. Los participantes, tratados con terapia antirretroviral, recibieron 6 inyecciones de esta vacuna y un adyuvante para aumentar sus propiedades como inmunoestimulante, y 3 semanas después de la última inyección de vacuna recibieron 3 infusiones de romidepsina en 3 semanas. Después de 8 semanas se interrumpió el tratamiento antirretroviral durante 16 semanas, observándose en la mayoría de participantes que la carga viral permanecía por debajo de los niveles detectables en presencia de ART, lo que indicaba que Vacc-4x parece colaborar con el sistema inmune para controlar los virus reactivados (37). En otro ensayo clínico denominado BCN02-Romi, realizado por investigadores

del laboratorio Irsicaixa de Barcelona, se ha combinado romidepsina con MVA.HIVconsy, un vector MVA que contiene el inmunógeno HIVconsy diseñado por investigadores de la Universidad de Oxford (38). Aquí se administró primero una dosis de la vacuna a los 15 participantes que se encontraban en tratamiento antirretroviral y tenían carga viral indetectable; en las semanas 3, 4 y 5 se administraron tres dosis de romidepsina; en la semana 9 otra dosis de vacuna y, después de 8 semanas, se les suprimió la medicación antirretroviral. Las tres infusiones de romidepsina produjeron en todos los participantes menos en uno pequeños eventos de replicación viral acompañados de incrementos temporales en los niveles de linfocitos CD4⁺, que volvieron a la normalidad 3 días después. A pesar de estos repuntes virales derivados de la administración de romidepsina, la cantidad de ADN viral en los reservorios no se alteró significativamente, por lo que su capacidad para reducir el tamaño de los reservorios podría quedar en entredicho. Sin embargo, la actividad de la respuesta inmunitaria celular de los linfocitos CD8 se incrementó tanto tras la administración de la vacuna como tras la infusión de romidepsina, y pasó de ser muy amplia (frente a todas las proteínas del HIV) a centrarse en las regiones altamente conservadas del virus, lo que apuntaría hacia un buen funcionamiento de la vacuna. De los 15 participantes, 13 llegaron a la fase de interrupción del tratamiento

antirretroviral pero, en 8 de los 13 casos, el rebote virológico se produjo dentro de las 4 primeras semanas tras la interrupción y volvieron al tratamiento antirretroviral. En los 5 participantes restantes, la carga viral solo repuntó de forma intermitente a bajos niveles para volver después a niveles indetectables. Tras 6, 12, 19, 20 y 28 semanas sin recibir tratamiento antirretroviral, todos ellos continuaron con el virus bajo control (39). Los resultados de este estudio son prometedores, aunque arrojan numerosos interrogantes que los investigadores deberán ir resolviendo, tanto a través de un análisis de los resultados como a la realización de nuevos ensayos clínicos.

4.2. Disulfiram (antabuse®)

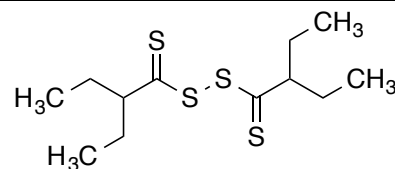
Este fármaco, utilizado para controlar el alcoholismo por inhibir la enzima acetaldehído deshidrogenasa (Figura 5), es además un inhibidor PTEN. Ésta es una fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato 3-fosfatasa que regula negativamente los niveles de PIP3 y funciona como un supresor de tumores. Hace varios años, el laboratorio del Dr. Siliciano en la *Johns Hopkins University* encontró que disulfiram podría revertir la latencia HIV, lo que motivó la puesta en marcha de un estudio piloto con pacientes HIV positivos sometidos a terapia ART. En éste se encontró que una dosis diaria de 500 mg de disulfiram mostraba cierta actividad. Otro ensayo clínico utilizó dosis superiores, de 2000 mg/día, administradas a 30 pacientes seropositivos tratados con ART. La administración de disulfiram durante un corto periodo de tiempo produjo un aumento de ARN viral asociado a las células (40) consistente con una reversión de la latencia, lo que hace suponer que se realizarán más estudios para corroborar el interés de este fármaco como un LRA, ya que no induce activación general de las células T ni liberación de citocinas (41).

4.3. Agonistas PKC

Si se induce la translocación al núcleo de factores de transcripción por activación de ciertas vías de señalización, se evita que aquellos permanezcan secuestrados en el citoplasma. Los agonistas de la proteína cinasa C (PKC)

pueden reactivar los virus HIV-1 latentes induciendo la translocación del factor nuclear κ B (NF- κ B) y la vía de señalización AP-1 (*activator protein 1*). NF- κ B es un factor que regula la expresión génica en respuesta al estrés ambiental, la radiación y los factores de crecimiento.

Un gran número de agonistas PKC son diterpenos en los que el hidroxilo en la posición 13 del forbol está esterificado. Estos compuestos se enlazan a la región reguladora de estas enzimas en el mismo lugar que su ligando fisiológico, el diacil glicerol. Los más conocidos son los productos naturales **forbol 12-miristato-13-acetato (PMA)**, **12-desoxiforbol-13-fenilacetato (DPP)** (42), y **prostratina (12-desoxiforbol-13-acetato)**. Esta última, aislada de la corteza del árbol *Homalanthus nutans* (tradicionalmente utilizada por los curanderos de Samoa para tratar la hepatitis), ha sido objeto de varios estudios junto con sus análogos sintéticos (43). Los ensayos clínicos con agonistas PKC requieren una evaluación estricta de su toxicidad, porque pueden activar la transcripción de varias citocinas. Por ejemplo, la **briostatina-1**, un macrólido cíclico aislado del organismo marino *Bugula neritina* originalmente evaluado frente a varios tipos de cáncer, se ha investigado como un adyuvante en la enfermedad de Alzheimer por su implicación en la formación y activación de las sinapsis y como reversor de la latencia HIV por ser un potente activador del factor NF- κ B a través de la activación de PKCs (44). Desafortunadamente, briostatina-1 es demasiado tóxica para su uso clínico (Figura 6).



Disulfiram

Figura 5. Estructura de disulfiram.

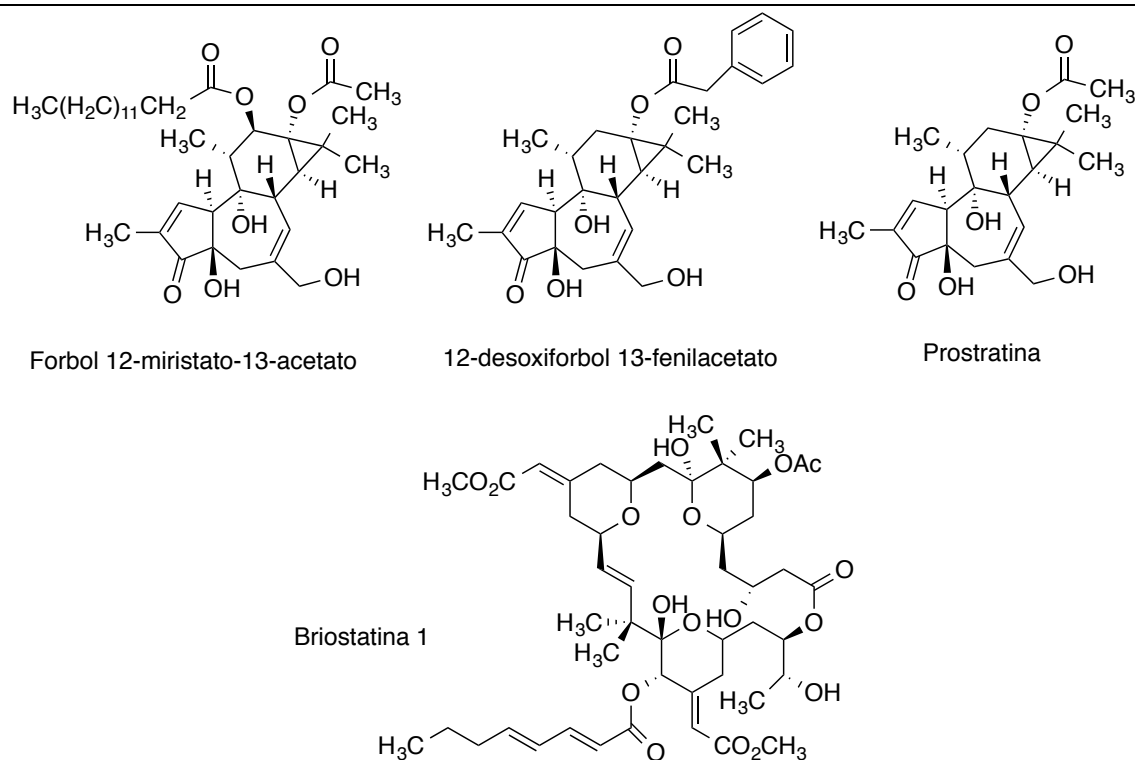


Figura 6. Agonistas PKC estudiados como agentes reversores de latencia.

Otros diterpenos, en su mayoría productos naturales extraídos de plantas de la familia *Euphorbia*, revierten también la latencia HIV (45).

4.4. Inhibidores BRD4. JQ1

Los residuos de lisina acetilados de la cromatina y de otras proteínas son lugares de reconocimiento y enlace específicos de proteínas epigenéticas “lectoras” que contienen porciones denominadas bromodominios (BRDs) y constituyen la familia BET (*bromodomain extra-terminal*). En esta familia es particularmente importante la isoforma BRD4, un bromodominio que promueve el reclutamiento del factor B de elongación transcripcional positiva (P-TEFb) (46), que está implicado en la fosforilación del dominio C-terminal de la ARN polimerasa II (RNAPII) esencial para que esta enzima catalice la elongación del ARNm y se biosinteticen proteínas como c-Myc. Cuando BRD4 se inhibe por compuestos como JQ1 se desactiva la transcripción del ADN (Figura 7) (47).

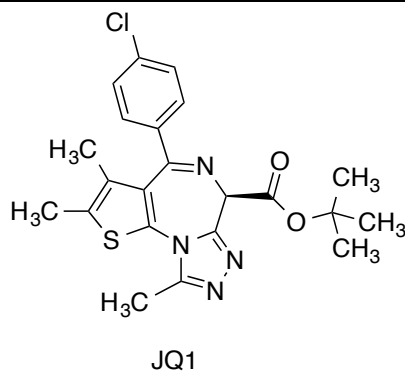


Figura 7. Estructura del fármaco JQ1.

Desarrollado inicialmente como un fármaco anticáncer, se observó después que también reactiva los provirus HIV-1 latentes y puede inducir brotes de virus en células T CD4⁺ durmientes procedentes de pacientes tratados con ART. JQ1 podría revertir la latencia del virus en terapias de combinación porque suprime la expresión de los genes que activan a las células T y aumenta la actividad de la proteína Tat (*Trans-Activator of Transcription*) del virus HIV-1, incrementando el nivel de transcripción del ARN bicatenario (48).

4.5. Agonistas de receptores TLR

Los receptores *toll-like* (TLRs) son glicoproteínas con un dominio extracelular responsable del reconocimiento de sus ligandos, una hélice de transmembrana, y un dominio intracelular (*Toll-like/IL-1 receptor*) responsable de la señalización. Estos receptores están implicados en las respuestas inflamatorias y en la iniciación de la respuesta

inmune innata y adquirida, teniendo un importante papel de defensa frente a diversos patógenos debido a que reconocen una serie de patrones moleculares asociados a ellos. Varios agonistas de estos receptores tienen la capacidad de promover la replicación viral activando el factor NF- κ B. Entre ellos se encuentran la proteína globular **flagelina** que es reconocida por TLR5,

resiquimod (denominado también compuesto R-848) que es reconocido por TLR7 y TLR8, agonistas de TLR7 como **vesatolimod** (GS-9620, evaluado también frente a hepatitis B, Figura 8), y varios oligodesoxinucleótidos con motivos CpG que son reconocidos por el receptor TLR9 localizado en el retículo endoplásmico de las células dendríticas plasmocitoides y de las células B (49).

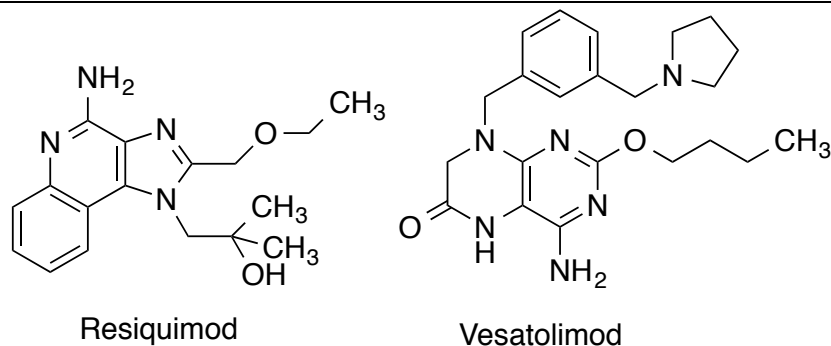


Figura 8. Estructuras de algunos agonistas de receptores TL reversores de latencia.

Lefitolimod, un agonista del receptor TLR9 conocido también como MGN1703, es un novedoso agente reversor de latencia perteneciente a una familia de compuestos denominada **dSLIM[®]** (*double Stem Loop Immunomodulator*). Su desarrollo está patrocinado por la Universidad de Aarhus (Dinamarca) y por la compañía biotecnológica alemana Mologen AG, especializada en el desarrollo de fármacos innovadores en el campo de la oncología y de las enfermedades infecciosas.

Lefitolimod se desarrolla actualmente para el tratamiento del carcinoma colorectal, carcinoma de pulmón de células pequeñas y otros tumores avanzados, solo o en combinación con el anticuerpo inmunomodulador ipilimumab (Yervoy[®]), aprobado en 2011 por la FDA y la EMA para el tratamiento del melanoma metastático y en estudio para otros tipos de cáncer. También se investiga en infecciones por HIV. Los resultados preliminares del estudio NCT02443935 (50) indicaron que lefitolimod es inocuo para las personas seropositivas. El estudio TEACH (*Toll-like receptor 9 enhancement of antiviral immunity in chronic HIV infection*) comenzó en junio de 2015 para investigar si puede activar el sistema inmune innato y adquirido en pacientes HIV-positivos y aumentar la destrucción de las células infectadas. La empresa ha anunciado en la *Annual Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections* (CROI) celebrada en febrero de 2017 en Seattle (EEUU) que, al igual que otros LRA, lefitolimod activa durante la terapia antirretroviral las células asesinas naturales (*natural killer cells*, NK) en pacientes HIV positivos (51), las células dendríticas plasmacitoides (pDC), y las células T, por lo que podría jugar un papel en la erradicación del HIV por estrategias *shock and kill*.

El diseño y las características estructurales de este fármaco merecen un ligero comentario (52). Se trata de un oligonucleótido que contiene motivos en los que un nucleótido de citosina va seguido por uno de guanina en la

dirección 5'-C-fosfato-G-3' (*CpG sites*). Estas subestructuras, que se encuentran con frecuencia en bacterias y virus, pueden ser reconocidas por el receptor TLR9 y sirven para detectar infecciones víricas intracelulares. La baja estabilidad metabólica de los oligonucleótidos requiere que en el diseño de fármacos que los imiten se modifique su esqueleto, por ejemplo cambiando los grupos fosfato por grupos tiofosfato, pero con ello se introduce la correspondiente toxicidad. En el caso de lefitolimod, se diseñaron moléculas de ADN de una sola hebra cerradas covalentemente (dSLIM[®]), con dos lazos que contienen motivos C-G que están conectados con un vástago de doble hebra, sin incorporar ningún componente no natural. La eficacia inmunomoduladora de los compuestos dSLIM[®] depende de su forma y tamaño, siendo el más potente MGN1703 (lefitolimod). En éste, el vástago contiene 28 pares de bases y cada lazo 30 nucleótidos entre los que hay tres pares C-G. Cualquier variación en la longitud del vástago y en el tamaño del lazo reduce la potencia (Figura 9).

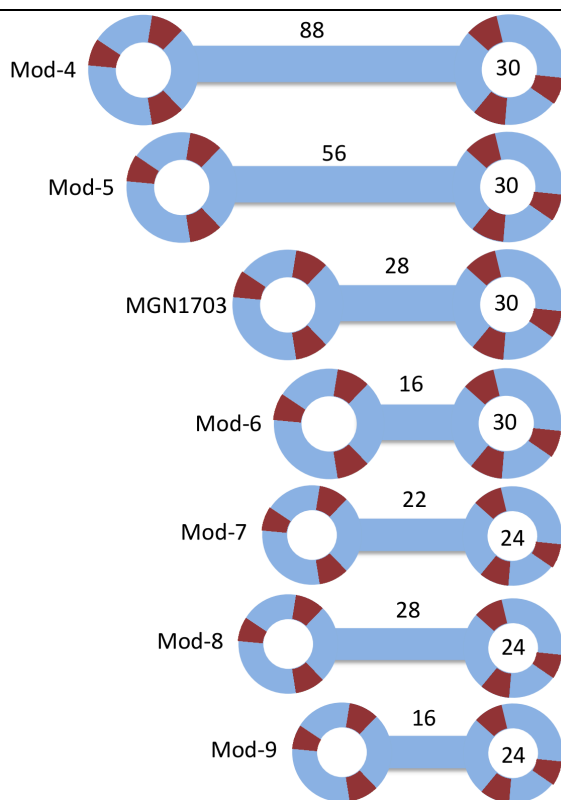


Figura 9. Representación esquemática de lefitolimod (MGN1703) y otros compuestos de la familia dSLIM® (double stem loop immunomodulators). Las porciones en rojo de los lazos representan pares C-G.

Para su evaluación, se utilizaron primero como sistemas modelo células específicas de distinto origen, confirmando después los datos empleando células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donadores sanos. Algunos estudios de *binding* sugieren que la interacción de TLR-9 con porciones de ADN requiere que éste sea de una sola hebra. Si fuera así, los ADNs de doble hebra bacterianos se tendrían que degradar primero en los endosomas, gracias a sus condiciones ácidas, para dar múltiples fragmentos de una sola hebra con el motivo CG, y éstos serían la señal reconocida por TLR-9 para su traducción.

En el caso de MGN1703, los motivos C-G localizado en los lazos de una sola hebra pueden interaccionar directamente con TLR-9 estimulando la secreción de citocinas (interferones IFN- α , IFN- γ , e interleucinas IL-12, IL-6, e IL-2) y activando las células inmunes por aumento de la expresión de CD80, CD40, y otras proteínas implicadas en diversas vías de señalización.

4.6. Anticuerpos PD-1. Pembrolizumab

Varios anticuerpos se están estudiando como posibles agentes reversiones de latencia HIV (53). El receptor PD-1, expresado normalmente en las células T, está sobreexpresado cuando estas células son disfuncionales. La función promotora de inmunidad de las células T se restablece con anticuerpos que bloqueen la interacción de dicho receptor con sus ligandos PD-L1 y PD-L2. Como los

linfocitos CD4⁺ infectadas con virus latentes también suelen expresar PD-1, estos anticuerpos podrían revertir la latencia viral. Este es el caso de pembrolizumab (lambrolizumab, MK-3475, Keytruda®), un anticuerpo monoclonal (mAb) muy selectivo para el receptor PD-1 que se aprobó por la FDA en 2014 contra el melanoma metastásico y está siendo evaluado en ensayos clínicos con pacientes HIV (54).

5. CONCLUSIONES

La reversión de la latencia requerirá probablemente el uso de diversas combinaciones de fármacos, según parecen demostrar ensayos *ex vivo* en los que se cuantifica la producción de ARNm intracelular de HIV-1 y la producción de viriones. En una de estas combinaciones podrían utilizarse agonistas PKC con JQ1 o con inhibidores de HDA (55). Varias revisiones sobre este tema señalan los progresos logrados en el conocimiento de los mecanismos celulares implicados en la latencia viral, así como los esfuerzos realizados para evaluar el tamaño y la composición del reservorio latente y caracterizar y desarrollar anticuerpos y linfocitos T citotóxicos que neutralicen múltiples subtipos de virus HIV-1. También es de interés el desarrollo de modelos animales para el estudio de la latencia HIV y de estrategias terapéuticas que conduzcan a su erradicación (56). Actualmente se están llevando a cabo ensayos clínicos con combinaciones de vacunas inductoras de linfocitos T CD8⁺, anticuerpos monoclonales neutralizantes de amplio espectro de acción y activadores del reservorio viral. Es predecible que en los próximos años se establecerán protocolos que reduzcan el tamaño de estos reservorios, lo que abrirá esperanzas a la eliminación del HIV en los pacientes infectados.

6. REFERENCIAS

1. a) Esteban M. Desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA. *An. R. Acad. Nac. Farm.* 2007; 73: 1047-78. b) Di Pilato M, Mejías-Pérez E, Zonca M, *et al.* NFkB activation by modified vaccinia virus as a novel strategy to enhance neutrophil migration and HIV-specific T-cell responses. *PNAS* 2015; 112: E1333-42.
2. Choi E, Michalski CJ, Choo SH, *et al.* First Phase I human clinical trial of a killed whole-HIV-1 vaccine: demonstration of its safety and enhancement of anti-HIV antibody responses. *Retrovirology* 2016; 13: 82.
3. a) Mothe B, Climent N, Plana M, *et al.* Safety and immunogenicity of a modified vaccinia Ankara-based HIV-1 vaccine (MVA-B) in HIV-1-infected patients alone or in combination with a drug to reactivate latent HIV-1. *J Antimicrob Chemother.* 2015; 70: 1833-42. b) Gómez CE, Perdiguer B, García-Arriaza J, *et al.* A Phase I Randomized Therapeutic MVA-B Vaccination Improves the Magnitude and Quality of the T Cell Immune Responses in HIV-1-Infected Subjects on HAART. *PLoS One* 2015; 10: e0141456. c) Rallon NI, Mothe B, Lopez Bernaldo de Quiros JC, *et al.* Balance between activation and regulation of HIV-specific CD8 T cells response after MVA-B

- therapeutic vaccination. *AIDS* 2015; 30: 553-62.
4. Sánchez-Sampedro L, Perdiguero B, Mejías-Pérez E, García-Arriaza J, Di Pilato M, Esteban M. The Evolution of Poxvirus Vaccines. *Viruses* 2015; 7: 1726-1803.
5. Bleul CC, Wu L, Hoxie JA, Springer TA, Mackay CR. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 1925-30.
6. Cary DC, Fujinaga K, Peterlin BM. Molecular mechanisms of HIV latency. *J Clin Invest*. 2016; 126: 448-54.
7. Harris RS, Hultquist JF, Evans DT. The restriction factors of human immunodeficiency virus. *J Biol Chem*. 2012; 287: 40875-83.
8. Chun TW, Finzi D, Margolick J, Chadwick K, Schwartz D, Siliciano RF. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: quantitative analysis of the transition to stable latency. *Nat Med*. 1995;1(12):1284-1290.
9. Finzi D, Hermankova M, Pierson T, *et al*. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science* 1997; 278: 1295-300.
10. Siliciano JD, Siliciano RF: A long-term latent reservoir for HIV-1: discovery and clinical implications. *J Antimicrob Chemother* 2004, 54: 6-9.
11. Pan X, Baldauf H-M, Keppler OT, Fackler OT. Restrictions to HIV-1 replication in resting CD4+ T lymphocytes. *Cell Res*. 2013; 23: 876-85.
12. Xing S, Siliciano RF. Targeting HIV latency: pharmacologic strategies toward eradication. *Drug Discov Today* 2013; 18: 541-51.
13. Prins JM, Jurriaans S, van Praag RM, *et al*. Immuno-activation with anti-CD3 and recombinant human IL-2 in HIV-1-infected patients on potent antiretroviral therapy. *AIDS* 1999; 13: 2405-10.
14. a) Siliciano RF, Greene WC. HIV Latency. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2011; 1: a007096. b) Rasmussen TA, Tolstrup M, Winckelmann A, Ostergaard L, Søgaard OS. Eliminating the latent HIV reservoir by reactivation strategies. *Hum Vaccin Immunother*. 2013; 9: 790-9.
15. Yang HC, Xing S, Shan L, *et al*. Small-molecule screening using a human primary cell model of HIV latency identifies compounds that reverse latency without cellular activation. *J Clin Invest*. 2009; 119: 3473-86.
16. Bullen CK, Laird GM, Durand ChM, *et al*. Novel ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med*. 2014; 20: 425-9.
17. Shan L, Deng K, Shroff NS, *et al*. Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation. *Immunity* 2012; 36: 491-501.
18. Siliciano JD, Kajdas J, Finzi D, *et al*. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4+ T cells. *Nat Med*. 2003; 9: 727-8.
19. Delagrèverie HM, Delaugerre C, Lewin SR, *et al*. Ongoing Clinical Trials of Human Immunodeficiency Virus Latency-Reversing and Immunomodulatory Agents. *Open Forum Infect Dis*. 2016; 3: ofw189.
20. a) Micheva-Viteva S, Kobayashi Y, Edelstein LC, *et al*. High-throughput screening uncovers a compound that activates latent HIV-1 and acts cooperatively with a histone deacetylase (HDAC) inhibitor. *J Biol Chem*. 2011; 286: 21083-91. b) Xing S, Bhat S, Shroff NS, *et al*. Novel structurally related compounds reactivate latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Antimicrob Chemother*. 2012; 67: 398-403.
21. Matalon S, Rasmussen TA, Dinarello CA. Histone deacetylase inhibitors for purging HIV-1 from the latent reservoir. *Mol Med*. 2011; 17: 466-72.
22. Ver por ejemplo: Hideshima T, Cottini F, Ohguchi H, *et al*. Rational combination treatment with histone deacetylase inhibitors and immunomodulatory drugs in multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2015; 5: e312.
23. Li H, Wu X. Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A activates p21WAF1/CIP1 expression through downregulation of c-Myc and release of the repression of c-Myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem and Biophys Res Commun*. 2004; 324: 860-7.
24. Contreras X, Schweneker M, Chen CS, *et al*. Suberoylanilide hydroxamic acid reactivates HIV from latently infected cells. *J Biol Chem*. 2009; 284: 6782-9.
25. Lehrman G, Hogue IB, Palmer S, *et al*. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study. *Lancet* 2005; 366: 549-55.
26. Ylisastigui L, Coull JJ, Rucker VC, *et al*. Polyamides reveal a role for repression in latency within resting T cells of HIV-infected donors. *J Infect Dis*. 2004; 190: 1429-37.
27. Smith SM. Valproic acid and HIV-1 latency: beyond the sound bite. *Retrovirology* 2005; 2: 56.
28. Siliciano JD, Lai J, Callender M, *et al*. Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Patients Receiving Valproic Acid. *J Infect Diseases* 2007; 195: 833-6.
29. Schooley RT, Mellors JW. No Cure Yet for HIV-1, But Therapeutic Research Presses On. *J Infect Diseases* 2007; 195: 770-2.
30. Archin NM, Liberty AL, Kashuba AD, *et al*. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature* 2012; 487: 482-5.
31. Margolis DM. Histone deacetylase inhibitors and HIV latency. *Curr Opin HIV AIDS* 2011; 6, 25-9.

32. Elliott JH, Wightman F, Solomon A, *et al.* Activation of HIV transcription with short-course vorinostat in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy. *PLoS Pathog.* 2014; 10: e1004473.
33. Lin S. HIV-1 reactivation induced by apicidin involves histone modification in latently infected cells. *Curr. HIV Res.* 2011;9:202–208
34. Nakajima H, Kim YB, Terano H, Yoshida M, Horinouchi S. FR901228, a potent antitumor antibiotic, is a novel histone deacetylase inhibitor. *Exper. Cell Res.* 1998; 241: 126-33.
35. Wel DG, Chiang V, Fyne E, *et al.* Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin Induces HIV Expression in CD4 T Cells from Patients on Suppressive Antiretroviral Therapy at Concentrations Achieved by Clinical Dosing. *PLOS Pathogens* 2014; 10: e1004071.
36. National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). A Phase I/II Study of Single Dose Romidepsin in HIV-Infected Adults With Suppressed Viremia on Antiretroviral Therapy to Assess Safety, Tolerability, and Activation of HIV-1 Expression. *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on August 28, 2013. NLM Identifier: NCT01933594.
37. Bionor Immuno AS. An Open Phase I/IIa Study to Evaluate the Safety and Effect of Therapeutic HIV-1 Immunization Using Vacc-4x/rhuGM-CSF, and HIV-1 Reactivation Using Romidepsin, on the Viral Reservoir in Virologically Suppressed HIV-1 Infected Adults on cART. *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on March 3, 2014. NLM Identifier: NCT02092116.
38. IrsiCaixa. An Open Label Phase I Trial to Evaluate the Safety and Effect of HIVconsV Vaccines in Combination With Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin on the Viral Rebound Kinetic After Treatment Interruption in Early Treated HIV-1 Infected Individuals (BCN02-Romi). *ClinicalTrials.gov*. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on November 9, 2015. NLM Identifier: NCT02616874.
39. Mothe B *et al.* Viral control induced by HIVconsV vaccines & romidepsin in early treated individuals. Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections (CROI 2017), Seattle, abstract 119LB, 2017.
40. Julian H Elliott JH, McMahon JH, Chang CC, *et al.* Short-term administration of disulfiram for reversal of latent HIV infection: a phase 2 dose-escalation study. *The Lancet* 2015; 2: 520-9.
41. Xing S, Bullen CK, Shroff NS, *et al.* Disulfiram reactivates latent HIV-1 in a Bcl-2-transduced primary CD4+ T cell model without inducing global T cell activation. *J Virol.* 2011; 85: 6060-4.
42. Bocklandt S, Blumberg PM, Hamer DH. Activation of latent HIV-1 expression by the potent antitumor promoter 12-deoxyphorbol 13-phenylacetate. *Antiviral Res.* 2003; 59: 89-98.
43. a) Korin YD, Brooks DG, Brown S, Korotzer A, Zack JA. Effects of prostratin on T-cell activation and human immunodeficiency virus latency. *J Virol.* 2002; 76: 8118-23. b) Williams SA, Chen LF, Kwon H, *et al.* Prostratin antagonizes HIV latency by activating NF- κ B. *J Biol Chem.* 2004; 279: 42008-17. c) Wender PA, Kee JM, Warrington JM. Practical synthesis of prostratin, DPP, and their analogs, adjuvant leads against latent HIV. *Science* 2008; 320: 649-52.
44. a) Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Zhang R, *et al.* Bryostatin modulates latent HIV-1 infection via PKC and AMPK signaling but inhibits acute infection in a receptor independent manner. *PLoS One* 2010; 5: e11160. b) Pérez M, de Vinuesa AG, Sanchez-Duffhues G, *et al.* Bryostatin-1 synergizes with histone deacetylase inhibitors to reactivate HIV-1 from latency. *Curr HIV Res.* 2010; 8: 418-29. c) DeChristopher BA, Loy BA, Marsden MD, *et al.* Designed, synthetically accessible bryostatin analogues potently induce activation of latent HIV reservoirs in vitro. *Nature Chem.* 2012; 4: 705-10.
45. Abreu CM, Price SL, Shirk EN, *et al.* Dual role of novel ingenol derivatives from *Euphorbia tirucalli* in HIV replication: inhibition of de novo infection and activation of viral LTR. *PLoS One* 2014; 9: e97257.
46. (a) Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S, *et al.* Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature* 2010; 468: 1067-73. (b) Filippakopoulos P, Knapp S. Targeting bromodomains: epigenetic readers of lysine acetylation. *Nature Rev Drug Discov* 2014; 13: 337-56. (c) Gallenkamp D, Gelato K A, Haendler B, Weinmann H. Bromodomains and Their Pharmacological Inhibitors. *ChemMedChem* 2014; 9: 438-64. (d) Sánchez R, Meslamani J, Zhou MM. The bromodomain: from epigenome reader to druggable target. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1839: 676-85.
47. Avendaño C. BET inhibitors. The odd compound (+)-JQ1. *An R Acad Farm.* 2015; 81: 214-20.
48. Zhu J, Gaiha GD, John SP, *et al.* Reactivation of Latent HIV-1 by Inhibition of BRD4. *Cell Rep.* 2012; 2: 807-16.
49. a) Scheller C, Ullrich A, McPherson K, *et al.* CpG oligodeoxynucleotides activate HIV replication in latently infected human T cells. *J Biol Chem.* 2004; 279: 21897-902. b) Thibault S, Imbeault M, Tardif MR, Tremblay MJ. TLR5 stimulation is sufficient to trigger reactivation of latent HIV-1 provirus in T lymphoid cells and activate virus gene expression in central memory CD4+ T cells. *Virology* 2009; 389: 20-5. c) Schlaepfer E, Speck RF. TLR8 activates HIV from latently infected cells of myeloid-monocytic origin directly via the MAPK pathway and from latently infected CD4+ T cells in directly via TNF- α . *J Immunol.* 2011; 186: 4314-24.

50. Toll-like Receptor 9 Enhancement of Antiviral Immunity in Chronic HIV-1 Infection: a Phase Ib/IIa Trial. In: ClinicalTrials.gov. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). Registered on April 30, 2015. NLM Identifier: NCT02443935.
51. Garrido C, Spivak AM, Soriano-Sarabia N, *et al.* HIV Latency-Reversing Agents Have Diverse Effects on Natural Killer Cell Function. *Front Immunol.* 2016; 7: 356.
52. Schmidt M, Hagner N, Marco A, *et al.* Design and Structural Requirements of the Potent and Safe TLR-9 Agonistic Immunomodulator MGN1703. *Nucleic Acid Therapeutics* 2015; 25: 130-40.
53. Halper-Stromberg A, Nussenzweig MC. Towards HIV-1 remission: potential roles for broadly neutralizing antibodies. *J Clin Invest.* 2016; 126: 415-23.
54. a) Day CL, Kaufmann DE, Kiepiela P, *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature* 2006; 443: 350-4. b) Eron JJ, Gay C, Bosch RJ, *et al.* Safety, immunologic and virologic activity of anti-PD-L1 in HIV-1 participants on ART. Abstract 25. In: Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections CROI 2016, 22-25 February 2016, Boston, USA.
55. a) Pandeló D, Bartholomeeusen K, Delvecchio R, *et al.* Reactivation of latent HIV-1 by new semi-synthetic ingenol esters. *Virology* 2014; 462-463: 328-39. b) Laird GM, Bullen CK, Rosenbloom DIS, *et al.* Ex vivo analysis identifies effective HIV-1 latency-reversing drug combinations. *J Clin Invest.* 2015; 125: 1901-12. c) Darcis G, Kula A, Bouchat S, *et al.* An in-depth comparison of latency-reversing agent combinations in various in vitro and ex vivo HIV-1 latency models identified Bryostatin-1 + JQ1 and Ingenol-B + JQ1 to potentially reactivate viral gene expression. *PLoS Pathog.* 2015; 11: e1005063.
56. a) Siliciano JD, Siliciano RF. Recent developments in the effort to cure HIV infection: going beyond N = 1. *J Clin Invest.* 2016; 126: 409-14. b) Garcia JV. In vivo platforms for analysis of HIV persistence and eradication. *J Clin Invest.* 2016; 126: 424-31.