



[Virol J.](#) 2005; 2: 69.

PMCID: PMC1232869

Publicato online il 22 agosto 2005. doi: [10.1186/1743-422X-2-69](https://doi.org/10.1186/1743-422X-2-69)

PMID: [16115318](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16115318/)

La cloroquina è un potente inibitore dell'infezione e della diffusione del coronavirus SARS

[Martin J Vincent](#) , ¹ [Eric Bergeron](#) , ² [Suzanne Benjannet](#) , ² [Bobbie R Erickson](#) , ¹ [Pierre E Rollin](#) , ¹ [Thomas G Ksiazek](#) , ¹ [Nabil G Seidah](#) , ² e [Stuart T Nichol](#) ¹✉

¹Special Pathogens Branch, Division of Viral and Rickettsial Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, 1600 Clifton Road, Atlanta, Georgia, 30333, USA

²Laboratory of Biochemical Neuroendocrinology, Clinical Research Institute of Montreal, 110 Pine Ave West, Montreal, QCH2W1R7, Canada

✉Corresponding author.

Martin J Vincent: mvincent@cdc.gov; Eric Bergeron: bergere@ircm.qc.ca; Suzanne Benjannet: benjans@ircm.qc.ca; Bobbie R Erickson: BErickson1@cdc.gov; Pierre E Rollin: PRollin@cdc.gov; Thomas G Ksiazek: TKsiazek@cdc.gov; Nabil G Seidah: seidahn@ircm.qc.ca; Stuart T Nichol: SNichol@cdc.gov

Received 2005 Jul 12; Accepted 2005 Aug 22.

[Copyright](#) © 2005 Vincent et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Astratto

sfondo

La sindrome respiratoria acuta grave (SARS) è causata da un coronavirus appena scoperto (SARS-CoV). Al momento non è disponibile alcuna terapia profilattica o post-esposizione efficace.

Risultati

Segnaliamo, tuttavia, che la cloroquina ha forti effetti antivirali sull'infezione da SARS-CoV delle cellule dei primati. Questi effetti inibitori si osservano quando le cellule vengono trattate con il farmaco prima o dopo l'esposizione al virus, suggerendo un vantaggio sia profilattico che terapeutico. Oltre alle ben note funzioni della cloroquina come l'aumento del pH endosomiale, il farmaco sembra interferire con la glicosilazione terminale del recettore cellulare, l'enzima di conversione dell'angiotensina 2. Ciò può influenzare negativamente il legame virus-recettore e abrogare l'infezione, con ulteriori ramificazioni dall'innalzamento del pH vescicolare, con conseguente inibizione dell'infezione e diffusione di SARS CoV a concentrazioni clinicamente ammissibili.

Conclusione

La cloroquina è efficace nel prevenire la diffusione della SARS CoV nelle colture cellulari. L'inibizione favorevole della diffusione del virus è stata osservata quando le cellule sono state trattate con cloroquina prima o dopo l'infezione da SARS CoV. Inoltre, il test di immunofluorescenza indiretta qui descritto rappresenta un metodo semplice e rapido per lo screening dei composti antivirali SARS-CoV.

Parole chiave: sindrome respiratoria acuta grave coronavirus, cloroquina, inibizione, terapia

sfondo

La sindrome respiratoria acuta grave (SARS) è una malattia emergente segnalata per la prima volta nella provincia del Guangdong, in Cina, alla fine del 2002. La malattia si è rapidamente diffusa in almeno 30 paesi entro pochi mesi dalla sua prima comparsa e gli sforzi concertati a livello mondiale hanno portato all'identificazione di l'agente eziologico come SARS coronavirus (SARS-CoV), un nuovo membro della famiglia *Coronaviridae* [1]. Il sequenziamento completo del genoma di SARS-CoV [2 , 3] ha confermato che questo patogeno non è strettamente correlato a nessuno dei gruppi di coronavirus precedentemente stabiliti. Il germogliamento del SARS-CoV avviene nell'apparato del Golgi [4] e si traduce nell'incorporazione della glicoproteina spike dell'involucro nel virione. La glicoproteina spike è una proteina di membrana di tipo I che facilita l'attaccamento virale al recettore cellulare e l'inizio dell'infezione, e l'enzima di conversione dell'angiotensina-2 (ACE2) è stato identificato come un recettore cellulare funzionale di SARS-CoV [5]. Abbiamo recentemente dimostrato che l'elaborazione della proteina spike è stata effettuata da convertasi simili alla furina e che l'inibizione di questa scissione da parte di un inibitore specifico ha abrogato la citopatia e ridotto significativamente il titolo del virus di SARS-CoV [6].

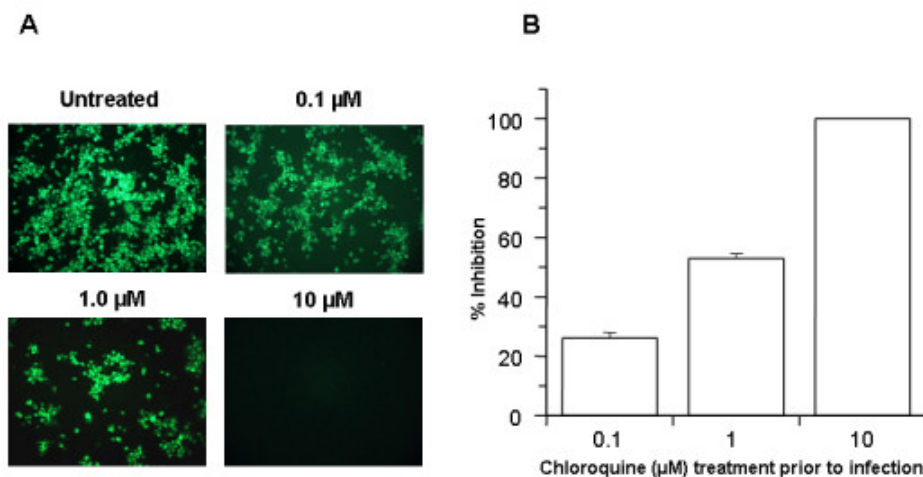
A causa della gravità dell'infezione da SARS-CoV, del potenziale di rapida diffusione della malattia e dell'assenza di inibitori del virus *in vivo* comprovati e sicuri , è importante identificare farmaci che possono essere efficacemente utilizzati per trattare o prevenire potenziali Infezioni SARS-CoV. Molti nuovi approcci terapeutici sono stati valutati in studi di laboratorio su SARS-CoV: notevoli tra questi approcci sono quelli che utilizzano siRNA [7], trasferimento di anticorpi passivo [8], vaccinazione a DNA [9], virus vaccinico o parainfluenzale che esprimono la proteina spike [10] , 11], interferoni [12 , 13], e anticorpo monoclonale alla subunità S1 della glicoproteina spike che blocca il legame del recettore [14]. In questo rapporto, descriviamo l'identificazione della cloroquina come un efficace agente antivirale pre e post-infezione per SARS-CoV. La cloroquina, una 9-aminochinolina identificata nel 1934, è una base debole che aumenta il pH delle vescicole acide. Quando aggiunta a livello extracellulare, la porzione non protonata della cloroquina entra nella cellula, dove diventa protonata e concentrata in organelli acidi a basso pH, come endosomi, vescicole di Golgi e lisosomi. La cloroquina può influenzare l'infezione da virus in molti modi e l'effetto antivirale dipende in parte dalla misura in cui il virus utilizza gli endosomi per l'ingresso. La cloroquina è stata ampiamente utilizzata per il trattamento di malattie umane, come la malaria, l'amebiosi, l'HIV e le malattie autoimmuni, senza effetti collaterali dannosi significativi [15]. Insieme ai dati qui presentati, che mostrano l'inibizione del virus nella coltura cellulare da parte di dosi di cloroquina compatibili con il trattamento del paziente, queste caratteristiche suggeriscono che un'ulteriore valutazione della cloroquina in modelli animali di infezione da SARS-CoV sarebbe giustificata man mano che si progredisce verso la ricerca di antivirali efficaci per la prevenzione o il trattamento. della malattia.

Risultati

Il trattamento pre-infezione con cloroquina rende le cellule Vero E6 refrattarie all'infezione da SARS-CoV

Per indagare se la cloroquina potesse prevenire l'infezione da SARS-CoV, le cellule Vero E6 permissive [1] sono state pretrattate con varie concentrazioni di cloroquina (0,1-10 μ M) per 20-24 ore prima dell'infezione da virus. Le cellule sono state quindi infettate con SARS-CoV e gli antigeni del virus sono stati visualizzati mediante immunofluorescenza indiretta come descritto in Materiali e metodi. Esame microscopico (fig. 1A) delle cellule di controllo (non trattate, infette) ha rivelato un'ampia immunocolorazione specifica per SARS-CoV del monostrato. È stata osservata una diminuzione dose-dipendente delle cellule positive all'antigene del virus a partire da 0,1 μ M di cloroquina e concentrazioni di 10 μ M hanno completamente abolito l'infezione da SARS-CoV. Per scopi quantitativi, abbiamo contato il numero di cellule colorate positive da tre posizioni casuali su un vetrino. Il numero medio di cellule di controllo colorate positivamente è stato valutato come 100% ed è stato confrontato con il numero di cellule positive osservate a varie concentrazioni di cloroquina (Fig. 1B). Il pretrattamento con cloroquina 0,1, 1 e 10 μ M ha ridotto l'infettività rispettivamente del 28%,

53% e 100%. Risultati riproducibili sono stati ottenuti da tre esperimenti indipendenti. Questi dati hanno dimostrato che il pretrattamento delle cellule Vero E6 con cloroquina ha reso queste cellule refrattarie all'infezione da SARS-CoV.



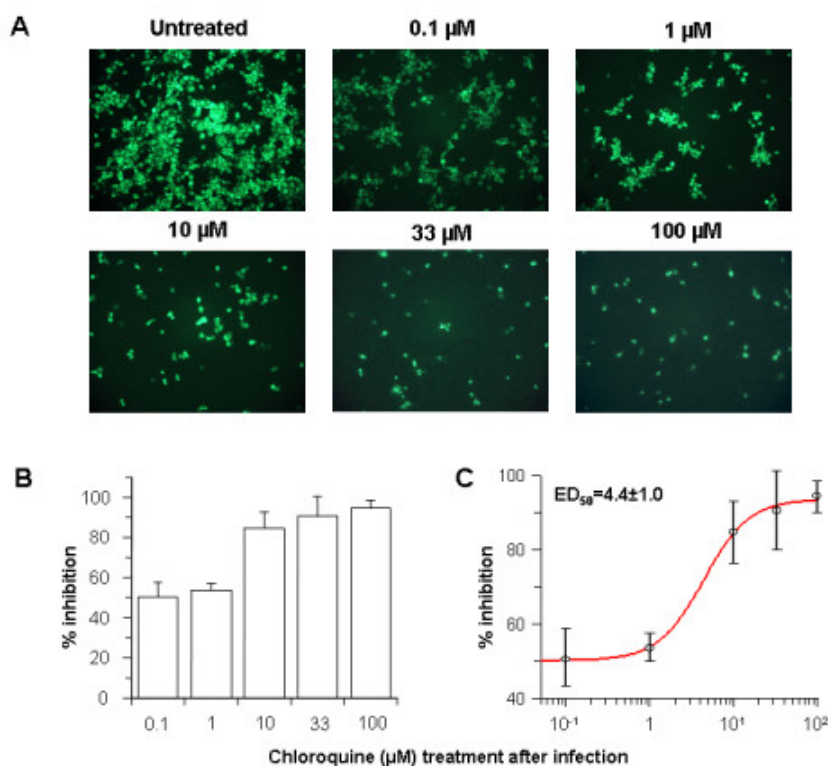
[Figura 1](#)

Effetto profilattico della cloroquina. Cellule Vero E6 pretrattate con cloroquina per 20 ore. I terreni contenenti cloroquina sono stati rimossi e le cellule sono state lavate con soluzione salina tamponata con fosfato prima di essere infettate con SARS-CoV (0,5 molteplicità di infezione) per 1 ora. in assenza di cloroquina. Il virus è stato quindi rimosso e le cellule sono state mantenute in Opti-MEM (Invitrogen) per 16-18 ore in assenza di cloroquina. Gli antigeni SARS-CoV sono stati colorati con HMAF virus-specifico, seguito da anticorpi secondari coniugati con FITC. **(A)** La concentrazione di cloroquina utilizzata è indicata nella parte superiore di ciascun pannello. **(B)** Le cellule positive all'antigene SARS-CoV in tre posizioni casuali sono state catturate utilizzando una fotocamera digitale, è stato determinato il numero di cellule positive all'antigene ed è stata calcolata l'inibizione media. L'inibizione percentuale è stata ottenuta considerando il controllo non trattato come un'inibizione dello 0%. Le barre verticali rappresentano l'intervallo di SEM.

Il trattamento post-infezione con cloroquina è efficace nel prevenire la diffusione dell'infezione da SARS-CoV

Al fine di studiare le proprietà antivirali della cloroquina su SARS-CoV dopo l'inizio dell'infezione, le cellule Vero E6 sono state infettate con il virus e il terreno fresco integrato con varie concentrazioni di cloroquina è stato aggiunto immediatamente dopo l'assorbimento del virus. Le cellule infette sono state incubate per altre 16-18 ore, dopodiché la presenza di antigeni virali è stata analizzata mediante analisi di immunofluorescenza indiretta. Quando la cloroquina è stata aggiunta dopo l'inizio dell'infezione, si è verificata una drastica diminuzione dose-dipendente del numero di cellule positive all'antigene virale (Fig. 2A). Solo 0,1-1 µM di cloroquina ha ridotto l'infezione del 50% e fino al 90-94% di inibizione è stata osservata con concentrazioni di 33-100 µM (Fig. 2B). A concentrazioni di cloroquina superiori a 1 µM, solo un piccolo numero di singole cellule è stato inizialmente infettato e la diffusione

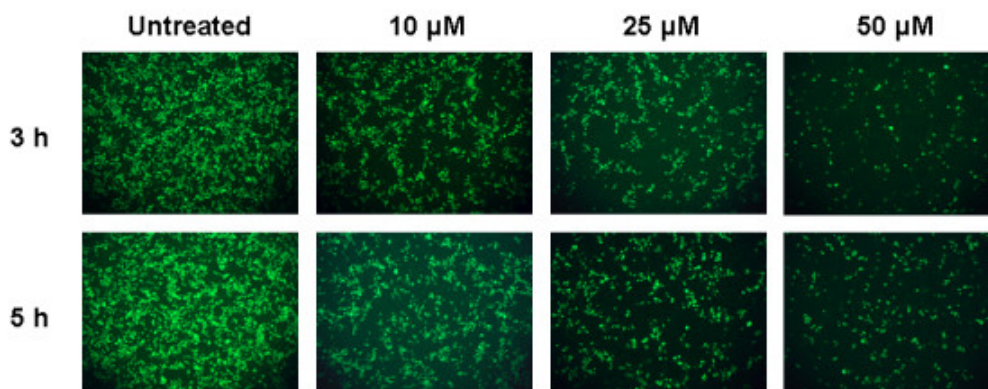
dell'infezione alle cellule adiacenti è stata quasi eliminata. È stato stimato che un effetto inibitorio semi-massimo si verifica a $4,4 \pm 1,0 \mu\text{M}$ di cloroquina (Fig.2C). Questi dati mostrano chiaramente che l'aggiunta di cloroquina può ridurre efficacemente l'instaurarsi di infezioni e la diffusione di SARS-CoV se il farmaco viene aggiunto immediatamente dopo l'assorbimento del virus.



[figura 2](#)

Il trattamento con cloroquina post-infezione riduce l'infezione e la diffusione di SARS-CoV. Le cellule Vero E6 sono state seminate e infettate come descritto per la Fig. 1 eccetto che la cloroquina è stata aggiunta solo dopo l'assorbimento del virus. Le cellule sono state mantenute in Opti-MEM (Invitrogen) contenente cloroquina per 16-18 ore, dopodiché sono state processate per l'immunofluorescenza. (A) La concentrazione di cloroquina è indicata in alto. (B) Percentuale di inibizione e SEM sono stati calcolati come in Fig. 1B. (C) La dose efficace (ED₅₀) è stata calcolata utilizzando un software disponibile in commercio (Grafit, versione 4, Erithacus Software).

L'analisi al microscopio elettronico ha indicato la comparsa di quantità significative di particelle virali extracellulari 5-6 ore dopo l'infezione [16]. Poiché abbiamo osservato gli effetti antivirali della cloroquina immediatamente dopo l'assorbimento del virus, abbiamo ulteriormente esteso l'analisi aggiungendo cloroquina 3 e 5 ore dopo l'assorbimento del virus ed esaminato la presenza di antigeni virali dopo 20 ore. Abbiamo scoperto che la cloroquina era ancora significativamente efficace anche se aggiunta 5 ore dopo l'infezione (Fig.3); tuttavia, per ottenere un effetto antivirale equivalente, era necessaria una concentrazione maggiore di cloroquina se il farmaco veniva aggiunto 3 o 5 ore dopo l'adsorbimento.

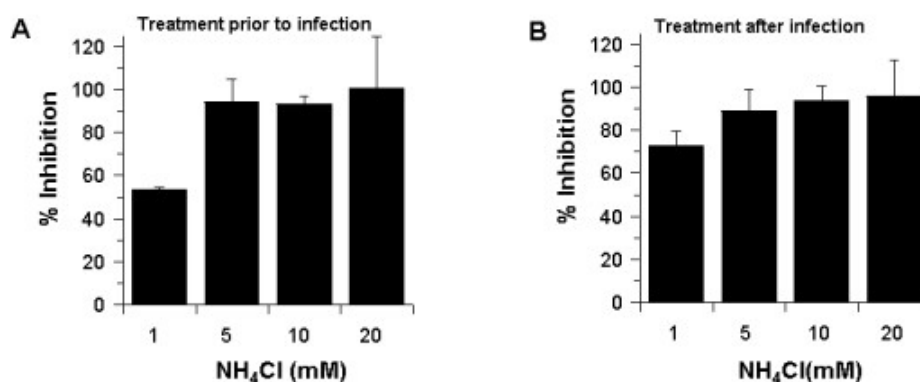


[Figura 3](#)

Trattamento temporizzato post-infezione con cloroquina . Questo esperimento è simile a quello illustrato in Fig. 2, tranne per il fatto che le cellule sono state infettate a 1 molteplicità di infezione e la cloroquina (10, 25 e 50 μM) è stata aggiunta 3 o 5 ore dopo l'infezione.

Il cloruro di ammonio inibisce l'infezione da SARS-CoV delle cellule Vero E6

Poiché la cloroquina inibisce l'infezione da SARS-CoV quando viene aggiunta prima o dopo l'infezione, abbiamo ipotizzato che anche un altro comune agente lisosomotropico, NH_4Cl , potesse funzionare in modo simile. Il cloruro di ammonio è stato ampiamente utilizzato negli studi sull'ingresso di virus mediato dall'endosoma. Per coincidenza, è stato recentemente dimostrato che NH_4Cl riduce la trasduzione di virus pseudotipi decorati con la proteina spike SARS-CoV [17 , 18]. Nel tentativo di esaminare se NH_4Cl funziona in modo simile alla cloroquina, abbiamo eseguito in precedenza analisi delle infezioni nelle cellule Vero E6 (Fig.4A) e dopo (fig. 4B) sono stati trattati con varie concentrazioni di NH_4Cl . In entrambi i casi, abbiamo osservato un'inibizione del 93-99% con NH_4Cl a ≥ 5 mM. Questi dati hanno indicato che NH_4Cl (≥ 5 mM) e cloroquina (≥ 10 μM) sono molto efficaci nel ridurre l'infezione da SARS-CoV. Questi risultati suggeriscono che gli effetti della cloroquina e dell' NH_4Cl nel controllo dell'infezione e della diffusione di SARS CoV potrebbero essere mediati da meccanismi simili.



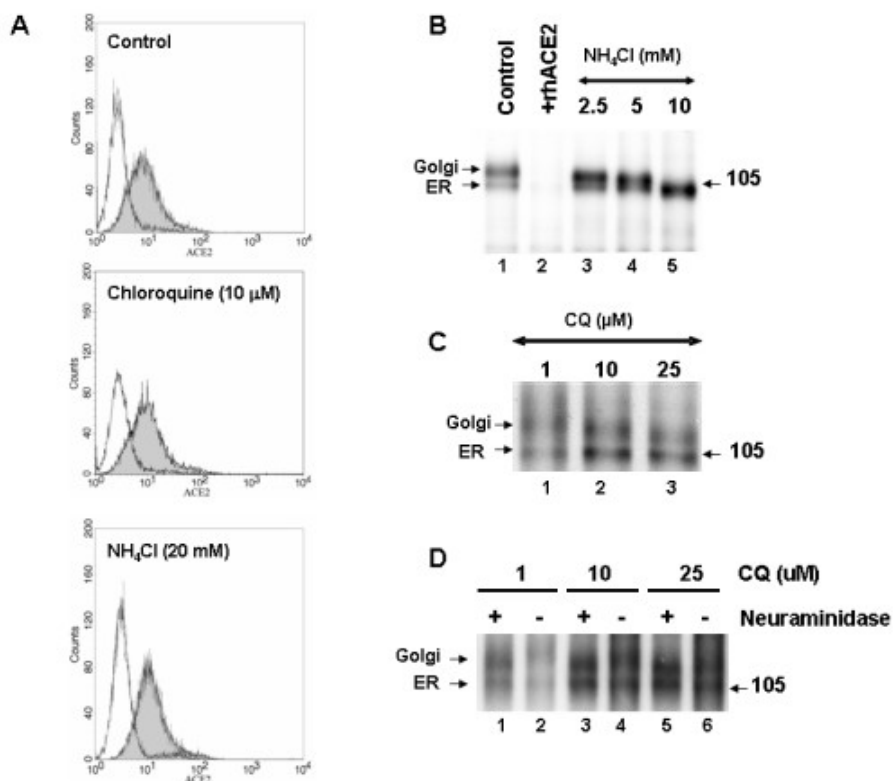
[Figura 4](#)

NH₄Cl inibisce SARS-CoV durante il trattamento pre o post infezione. NH₄Cl è stato aggiunto alle cellule prima (A) o dopo (B) infezione, in modo simile a quanto fatto per la cloroquina nelle figure 1 e 2. Sono state contate le cellule antigene-positive e i risultati sono stati presentati come nella figura 1B.

Effetto della cloroquina e dell'NH₄Cl sull'espressione della superficie cellulare di ACE2

Abbiamo eseguito ulteriori esperimenti per chiarire il meccanismo di inibizione della SARS-CoV da parte di cloroquina e NH₄Cl. Poiché il pH acido intravesicolare regola le funzioni cellulari, tra cui il taglio della N-glicosilazione, il traffico cellulare e varie attività enzimatiche, è stato interessante caratterizzare l'effetto di entrambi i farmaci sull'elaborazione, la glicosilazione e lo smistamento cellulare della glicoproteina spike SARS-CoV e il suo recettore, ACE2. L'analisi della citometria a flusso è stata eseguita su cellule Vero E6 non trattate o trattate con concentrazioni anti-SARS-CoV altamente efficaci di cloroquina o NH₄Cl. I risultati hanno rivelato che nessuno dei due farmaci ha causato un cambiamento significativo nei livelli di ACE2 sulla superficie cellulare, indicando che gli effetti inibitori osservati sull'infezione da SARS-CoV non sono dovuti alla mancanza di ACE2 sulla superficie cellulare disponibile (Fig. 5A). Successivamente abbiamo analizzato le forme molecolari di ACE2 endogeno in cellule Vero E6 non trattate e in cellule che sono state pre-incubate per 1 h con varie concentrazioni di NH₄Cl (2,5-10 mM) o cloroquina (1 e 10 μM) ed etichettate con ³⁵S-(Met) per 3 h in presenza o assenza dei farmaci (Fig. 5B e 5C). In condizioni normali, abbiamo osservato due forme ACE2 immunoreattive, che migrano rispettivamente a ~105 e ~113 kDa (Fig. 5B, corsia 1). La proteina ~105-kDa è sensibile all'endoglicosidasi H, suggerendo che rappresenta la forma localizzata del reticolo endoplasmatico (ER), mentre la proteina ~113-kDa è resistente all'endoglicosidasi H e rappresenta la forma modificata dal Golgi di ACE2 [19]. La specificità dell'anticorpo è stata confermata spostando le bande proteiche immunoreattive con un eccesso di ACE2 ricombinante umano solubile a freddo (+ rhACE2; Fig. 5B, corsia 2). Quando abbiamo analizzato le forme ACE2 in presenza di NH₄Cl, è stato osservato un chiaro aumento graduale della migrazione della proteina ~113 kDa con concentrazioni crescenti di NH₄Cl, con un effetto massimo osservato a 10 mM NH₄Cl, risultante

solo la forma ER di ACE2 è visibile sul gel (Fig. [5B](#), confrontare le corsie 3–5). Ciò ha suggerito che il taglio e/o le modifiche terminali delle catene N-glicosilate di ACE2 fossero influenzate dal trattamento con NH_4Cl . Inoltre, a 10 mM di NH_4Cl , la forma ER di ACE2 è migrata con una mobilità leggermente più rapida, indicando che NH_4Cl a quella concentrazione potrebbe anche influenzare la glicosilazione del nucleo. Abbiamo anche esaminato lo stato di glicosilazione terminale di ACE2 quando le cellule sono state trattate con cloroquina (Fig. [5C](#)). Simile a NH_4Cl , è stato osservato un aumento graduale della mobilità elettroforetica di ACE2 con concentrazioni crescenti di cloroquina. A 25 μM di cloroquina, la mobilità elettroforetica più rapida della forma di ACE2 modificata dal Golgi era chiaramente evidente. Sulla base delle analisi di citometria a flusso e immunoprecipitazione, si può dedurre che NH_4Cl e cloroquina hanno entrambi compromesso la glicosilazione terminale di ACE2, mentre NH_4Cl ha prodotto un effetto più drammatico. Sebbene ACE2 sia espresso in quantità simili sulla superficie cellulare, le variazioni nel suo stato di glicosilazione potrebbero rendere meno efficiente l'interazione ACE2-SARS-CoV e inibire l'ingresso del virus quando le cellule vengono trattate con NH_4Cl e cloroquina.



[Figura 5](#)

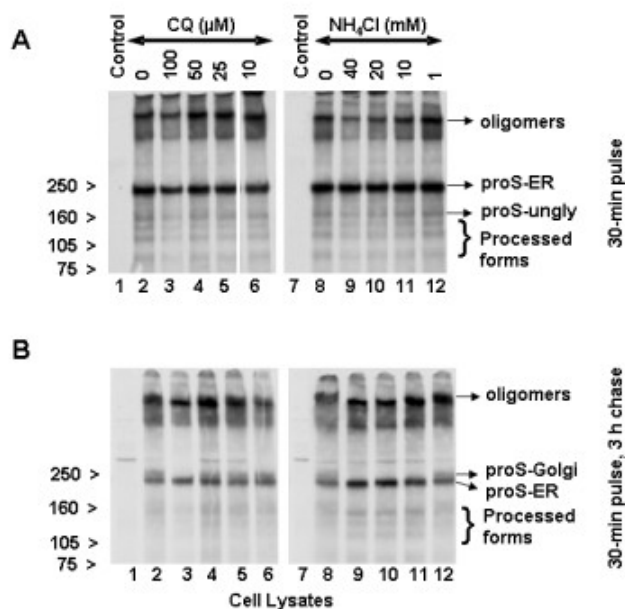
Effetto degli agenti lisotropici sull'espressione sulla superficie cellulare e sulla biosintesi di ACE2

(A) Le cellule Vero E6 sono state coltivate per 20 ore in assenza (controllo) o presenza di cloroquina (10 μM) o NH_4Cl (20 mM). Le cellule sono state marcate con anti-ACE2 (istogramma grigio) o solo con un anticorpo secondario (istogramma bianco). (B) Biosintesi di ACE2 in cellule non trattate o in cellule trattate con NH_4Cl . Le cellule Vero E6 sono state marcate con impulsi per 3 ore con ^{35}S -Met e i lisati cellulari sono stati immunoprecipitati con un anticorpo ACE2 (corsia 1). La preincubazione dell'anticorpo con ACE2 umano ricombinante (rhACE2) ha completamente abolito il segnale (corsia 2). Vengono enfatizzate le posizioni della forma ER endoglicosidasi H-sensibile e della forma Golgi endoglicosidasi H-resistente di ACE2. Si noti che l'aumento della concentrazione di NH_4Cl con conseguente diminuzione della forma di Golgi di ACE2. (C) Un esperimento simile è stato eseguito in presenza delle concentrazioni indicate di cloroquina. Si noti la perdita di glicani terminali con l'aumento delle concentrazioni di cloroquina. (D) La modificazione glicosidica terminale di ACE2 è stata valutata mediante trattamento con neuraminidasi di ACE2 immunoprecipitato. Qui le cellule sono state trattate con concentrazioni di 1-25 μM di cloroquina durante la fame, il polso e l'inseguimento di 3 ore.

Per confermare che ACE2 subisce modifiche terminali dello zucchero e che la glicosilazione terminale è influenzata dal trattamento con NH_4Cl o cloroquina, abbiamo eseguito l'immunoprecipitazione di ACE2 marcato con ^{35}S e sottoposto gli immunoprecipitati alla digestione con neuraminidasi. Le proteine sono state risolte utilizzando SDS-PAGE (Fig5 D). È evidente dalla mobilità leggermente più rapida della forma di Golgi di ACE2 dopo il trattamento con neuraminidasi (Fig5 D, confrontare le corsie 1 e 2), che ACE2 subisce glicosilazione terminale; tuttavia, la forma ER di ACE2 non è stata influenzata dalla neuraminidasi. Le cellule trattate con cloroquina 10 μM non hanno comportato uno spostamento significativo; considerando che la cloroquina 25 μM ha causato la risoluzione della forma di Golgi di ACE2 simile all'ACE2 trattata con neuraminidasi (Fig.5 D, confrontare le corsie 5 e 6). Questi dati forniscono la prova che ACE2 subisce glicosilazione terminale e che la cloroquina a concentrazioni di anti-SARS-CoV annulla il processo.

Effetto della cloroquina e NH₄ Cl sulla biosintesi e sul trattamento della proteina spike SARS-CoV

Successivamente abbiamo esaminato se i farmaci lisosomotropici (NH₄ Cl e cloroquina) influenzano la biosintesi, la glicosilazione e/o il traffico della glicoproteina spike SARS-CoV. A tale scopo, le cellule Vero E6 sono state infettate con SARS-CoV per 18 ore. Cloroquina o cloruro di ammonio sono stati aggiunti a queste cellule mentre venivano affamate (1 h), etichettate (30 min) o inseguite (3 h). I lisati cellulari sono stati analizzati mediante immunoprecipitazione con l'anticorpo policlonale specifico per la SARS (HMAF). I risultati dell'impulso di 30 minuti hanno indicato che pro-spike (proS) è stato sintetizzato come un precursore di ~ 190 kDa (proS-ER) e processato in proteine ~ 125, ~ 105 e ~ 80 kDa (Fig. 6A, corsia 2), un risultato identico a quello della nostra precedente analisi [6]. Ad eccezione della cloroquina da 100 µM (Fig. 6A, corsia 3), non vi era alcuna differenza significativa nella biosintesi o nell'elaborazione della proteina spike del virus nelle cellule non trattate o trattate con cloroquina (Fig. 6A, corsie 4–6). Va notato che la cloroquina a 100 µM ha determinato una diminuzione complessiva della biosintesi e dei livelli di glicoproteina virale trasformata. In considerazione della mancata riduzione della biosintesi e dell'elaborazione della glicoproteina spike in presenza di concentrazioni di cloroquina (10 e 50 µM) che hanno causato grandi riduzioni nella replicazione e diffusione di SARS-CoV, concludiamo che l'effetto antivirale probabilmente non è dovuto all'alterazione della biosintesi e dell'elaborazione delle glicoproteine virali. Analisi simili sono state eseguite con NH₄ Cl e i dati hanno suggerito che anche la biosintesi e l'elaborazione della proteina spike non erano influenzate negativamente da NH₄ Cl (Fig. 6A, corsie 7-12). Coerentemente con la nostra precedente analisi [6], abbiamo osservato la presenza di una proteina più grande, che qui viene chiamata oligomeri. Recentemente, Song et al. [20] hanno fornito prove che questi sono omotrimeri della proteina spike SARS-CoV e sono stati incorporati nei virioni. È interessante notare che i livelli degli omotrimeri nelle cellule trattate con cloroquina 100 µM e NH₄ Cl 40 e 20 mM (Fig. 6A, corsie 3, 9 e 10) erano leggermente inferiori rispetto alle cellule di controllo o alle cellule trattate con concentrazioni di farmaco inferiori.



[Figura 6](#)

Effetti di NH₄Cl e cloroquina (CQ) sulla biosintesi, elaborazione e glicosilazione della proteina spike SARS-CoV. Le cellule Vero E6 sono state infettate con SARS-CoV come descritto in Fig. 2. CQ o NH₄Cl è stato aggiunto durante i periodi di fame (1 h) e l'etichettatura (30 min) con ³⁵S-Cys e seguito da un inseguimento per 3 h in presenza di terreno non etichettato. Le cellule sono state lisate in tampone RIPA e immunoprecipitate con HMAF. Le proteine virali sono state risolte utilizzando gel NuPAGE al 3-8% (Invitrogen). Le cellule presentate sono state etichettate per 30 min (**A**) e inseguite per 3 h (**B**). A destra sono indicate le posizioni di migrazione delle varie forme molecolari di spike, a sinistra quelle degli standard molecolari. proS-ER e proS-Golgi sono il pro-spike di SARS-Co nei compartimenti ER e Golgi, rispettivamente e proS-ungly è il pro-spike ER non glicosilato.

I dati ottenuti da un impulso di 30 minuti seguito da un inseguimento di 3 ore (Fig. [6B](#), corsie 2 e 8) hanno confermato la nostra precedente osservazione che il precursore della proteina spike SARS-CoV (proS-ER) acquisisce modifiche specifiche del Golgi (proS-Golgi) risultando in una proteina ~ 210-kDa [[6](#)]. La cloroquina a 10, 25 e 50 μM non ha avuto un impatto negativo sostanziale sull'aspetto della forma del Golgi (Fig. [6B](#), confrontare la corsia 2 con le corsie 4–6). Solo a 100 μM di cloroquina è stata osservata una riduzione del livello del pro-spike modificato dal Golgi (corsia 3). D'altra parte, NH₄Cl ha abrogato la comparsa di forme modificate dal Golgi a ≥10 mM (confrontare la corsia 8 con 9-11) e ha avuto un effetto più lieve a 1 mM (corsia 12). Questi dati dimostrano chiaramente che la biosintesi e l'elaborazione proteolitica della proteina spike di SARS-CoV non sono influenzate alle dosi di cloroquina (25 e 50 μM) e NH₄Cl (1 mM) che causano effetti inibitori del virus. Inoltre, con 40, 20 e 10 mM NH₄Cl, si è verificato un aumento dell'accumulo di proS-ER con una concomitante diminuzione della quantità di oligomeri (Fig. [6B](#), corsie 9-11). Quando abbiamo esaminato gli omotrimeri, abbiamo scoperto che la cloroquina a 100 μM e NH₄Cl a 40 e 20 mM determinava una mobilità leggermente più rapida dei trimeri (Fig. [6B](#), corsie 3, 9 e 10), ma dosi di farmaco inferiori, che hanno mostrato effetti antivirali significativi, non hanno prodotto differenze apprezzabili. Questi dati suggeriscono che la proteina spike intracellulare appena sintetizzata potrebbe non essere un obiettivo

importante per l'azione antivirale della cloroquina e dell' NH_4Cl . La mobilità più rapida del trimero a determinate concentrazioni più elevate dei farmaci potrebbe essere dovuta all'effetto di questi farmaci sulla glicosilazione terminale dei trimeri.

Discussione

Abbiamo identificato la cloroquina come un agente antivirale efficace per SARS-CoV in condizioni di coltura cellulare, come evidenziato dal suo effetto inibitorio quando il farmaco è stato aggiunto prima dell'infezione o dopo l'inizio e l'instaurazione dell'infezione. Il fatto che la cloroquina eserciti un effetto antivirale durante le condizioni pre e post-infezione suggerisce che è probabile che abbia vantaggi sia profilattici che terapeutici. Recentemente, Keyaerts et al. [21] hanno riportato le proprietà antivirali della cloroquina e hanno identificato che il farmaco influenza la replicazione di SARS-CoV nella coltura cellulare, come evidenziato dalla RT-PCR quantitativa. Presi insieme ai risultati di Keyaerts et al. [21], la nostra analisi fornisce ulteriori prove che la cloroquina è efficace contro i ceppi SARS-CoV Frankfurt e Urbani. Abbiamo fornito prove che la cloroquina è efficace nel prevenire l'infezione da SARS-CoV nella coltura cellulare se il farmaco viene aggiunto alle cellule 24 ore prima dell'infezione. Inoltre, la cloroquina era significativamente efficace anche quando il farmaco veniva aggiunto 3-5 ore dopo l'infezione, suggerendo un effetto antivirale anche dopo l'instaurarsi dell'infezione. Poiché risultati simili sono stati ottenuti dal trattamento con NH_4Cl delle cellule Vero E6, i meccanismi d'azione sottostanti di questi farmaci potrebbero essere simili.

A parte il probabile ruolo della cloroquina sulla replicazione di SARS-CoV, i meccanismi d'azione della cloroquina su SARS-CoV non sono completamente compresi. Precedenti studi hanno suggerito l'aumento del pH come meccanismo mediante il quale la cloroquina riduce la trasduzione dei virus pseudotipi SARS-CoV [17 , 18]. Abbiamo esaminato l'effetto della cloroquina e dell' NH_4Cl sulle proteine spike di SARS-CoV e sul suo recettore, ACE2. I risultati dell'immunoprecipitazione di ACE2 hanno chiaramente dimostrato che le efficaci concentrazioni anti-SARS-CoV di cloroquina e NH_4Cl ha anche compromesso la glicosilazione terminale di ACE2. Tuttavia, i dati della citometria a flusso hanno dimostrato che non vi sono differenze significative nell'espressione sulla superficie cellulare di ACE2 nelle cellule trattate con cloroquina o NH_4Cl . Sulla base di questi risultati, è ragionevole suggerire che il pre-trattamento con NH_4Cl o cloroquina ha probabilmente provocato l'espressione superficiale dell'ACE2 sotto-glicosilato. Nel caso del trattamento con cloroquina prima dell'infezione, la compromissione della glicosilazione terminale di ACE2 può comportare una ridotta affinità di legame tra ACE2 e la proteina spike di SARS-CoV e influenzare negativamente l'inizio dell'infezione da SARS-CoV. Poiché la biosintesi, l'elaborazione, la modifica del Golgi e l'oligomerizzazione della proteina spike appena sintetizzata non sono state influenzate in modo apprezzabile dalle concentrazioni anti-SARS-CoV di cloroquina o NH_4Cl , concludiamo che questi eventi si verificano nella cellula indipendentemente dalla presenza dei farmaci. Non è stato possibile escludere il potenziale contributo di questi farmaci all'aumento del pH endosomiale e il suo impatto sulla successiva entrata o uscita del virus. È stata osservata una diminuzione della trasduzione dello pseudotipo SARS-CoV in presenza di NH_4Cl ed è stata attribuita all'effetto sul pH intracellulare [17 , 18]. Quando cloroquina o NH_4Cl vengono aggiunti dopo l'infezione, questi agenti possono aumentare rapidamente il pH e sovvertire gli eventi di fusione in corso tra virus ed endosomi, inibendo così l'infezione.

Inoltre, il meccanismo d'azione di NH_4Cl e cloroquina potrebbe dipendere da quando sono stati aggiunti alle cellule. Quando aggiunti dopo l'inizio dell'infezione, questi farmaci potrebbero influenzare la fusione mediata dall'endosoma, la successiva replicazione del virus o l'assemblaggio e il rilascio. Precedenti studi sulla cloroquina hanno dimostrato che ha molteplici effetti sulle cellule di mammifero oltre all'elevazione del pH endosomiale, inclusa la prevenzione della glicosilazione terminale delle immunoglobuline [22]. Quando aggiunta alle cellule infettate da virus, la cloroquina ha inibito le fasi successive della maturazione del virus della stomatite vescicolare inibendo l'espressione della glicoproteina sulla superficie cellulare [23], e ha inibito la produzione di particelle infettive di HIV-1 interferendo con la glicosilazione terminale della glicoproteina [24 , 25]. Sulla base di queste proprietà, suggeriamo che l'espressione sulla superficie cellulare di ACE2 sotto-glicosilato e la sua scarsa affinità con la proteina spike di SARS-CoV possono essere il meccanismo principale mediante il quale l'infezione viene prevenuta mediante pretrattamento farmacologico delle cellule prima

dell'infezione. D'altro canto, il rapido aumento del pH endosomiale e l'abrogazione della fusione virus-endosoma possono essere il meccanismo principale mediante il quale l'infezione virale viene prevenuta in condizioni post-trattamento. Saranno eseguiti saggi di legame SARS CoV spike-ACE2 più dettagliati in presenza o assenza di cloroquina per confermare i nostri risultati. I nostri studi indicano che l'impatto di NH_4Cl e cloroquina sui profili di proteine ACE2 e spike sono significativamente differenti. L' NH_4Cl mostra un effetto più pronunciato della cloroquina sulla glicosilazione terminale, evidenziando le nuove intricate differenze tra cloroquina e cloruro di ammonio nell'influenzare il trasporto proteico o la glicosilazione della proteina spike SARS-CoV e del suo recettore, ACE2, nonostante la loro comprovata somiglianza effetti dell'innalzamento del pH endosomiale.

Anche l'infettività dei coronavirus diversi dalla SARS-CoV è influenzata dalla cloroquina, come esemplificato dal CoV-229E umano [15]. Gli effetti inibitori osservati sull'infettività di SARS-CoV e sulla diffusione cellulare si sono verificati in presenza di cloroquina 1-10 μM , che sono concentrazioni plasmatiche ottenibili durante la profilassi e il trattamento della malaria (che variano da 1,6-12,5 μM) [26] e quindi sono ben tollerati dai pazienti. Recentemente è stato ipotizzato che la cloroquina potrebbe essere efficace contro la SARS e gli autori hanno suggerito che questo composto potrebbe bloccare la produzione di $\text{TNF}\alpha$, IL6 o $\text{IFN}\gamma$ [15]. I nostri dati forniscono prove della possibilità di utilizzare il noto farmaco cloroquina nella gestione clinica della SARS.

Conclusione

La cloroquina, un farmaco relativamente sicuro, efficace ed economico utilizzato per il trattamento di molte malattie umane tra cui la malaria, l'amebiosi e il virus dell'immunodeficienza umana, è efficace nell'inibire l'infezione e la diffusione della SARS CoV nelle colture cellulari. Il fatto che il farmaco abbia un significativo effetto antivirale inibitorio quando le cellule sensibili sono state trattate prima o dopo l'infezione suggerisce un possibile uso profilattico e terapeutico.

metodi

Analisi di infezione da SARS-CoV, immunofluorescenza e immunoprecipitazione

Le cellule Vero E6 (una linea cellulare renale di scimmia verde africana) sono state infettate da SARS-CoV (ceppo Urbani) con una molteplicità di infezione di 0,5 per 1 ora. Le cellule sono state lavate con PBS e quindi incubate in terreno OPTI-MEM (Invitrogen) con o senza varie concentrazioni di cloroquina o NH_4Cl (entrambi di Sigma). La colorazione dell'immunofluorescenza è stata eseguita con fluido ascitico di topo iperimmune specifico per SARS-CoV (HMAF) [8] seguito da anticorpo anti-topo accoppiato a fluoresceina.

Diciotto ore dopo l'infezione, i surnatanti contenenti virus sono stati rimossi e le cellule sono state pulsate con ^{35}S -(Cys) per 30 minuti e inseguite per 3 ore prima della lisi in tampone RIPA. I lisati cellulari e i terreni chiarificati sono stati incubati con HMAF e le proteine immunoprecipitate sono state separate dal 3-8% di gel NuPAGE (Invitrogen); le proteine sono state visualizzate mediante autoradiografia. In alcuni esperimenti, le cellule sono state inseguite per 3 ore con terreno privo di isotopi. Anche i surnatanti cellulari chiarificati sono stati immunoprecipitati con HMAF specifico per SARS-CoV.

Analisi e biosintesi di citometria a flusso ACE2

Le cellule Vero E6 sono state seminate nel terreno Eagle modificato di Dulbecco (Invitrogen) integrato con siero bovino fetale al 10%. Il giorno successivo, le cellule sono state incubate in Opti-MEM (Invitrogen) in presenza o assenza di 10 μM di cloroquina o 20 mM di NH_4Cl . Per analizzare i livelli di ACE2 sulla superficie cellulare, le cellule sono state incubate su ghiaccio con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ di anticorpo anti-ACE2 di capra purificato per affinità (R&D Systems) e quindi incubate con anticorpo IgG di suino anti-capra marcato con FITC (Caltag Laboratories). Le cellule marcate sono state analizzate mediante citometria a flusso con un citometro a flusso FACSCalibur (BD Biosciences). Per gli studi di biosintesi ACE2, le cellule Vero E6 sono state pulsate con 250 μCi ^{35}S -(Met) (Perkin Elmer) per 3 ore con le concentrazioni indicate di cloroquina o NH_4Cl e poi lisato in tampone RIPA. I lisati chiarificati sono

stati immunoprecipitati con un anticorpo anti-ACE2 di capra purificato per affinità (sistemi di ricerca e sviluppo) e le proteine immunoprecipitate sono state separate mediante elettroforesi su gel di poliacrilammide SDS.

Interessi conflittuali

Gli autori dichiarano di non avere interessi in gioco.

Contributi degli autori

MV ha eseguito tutti gli esperimenti relativi all'infezione da SARS CoV e ha coordinato la stesura del manoscritto. EB e SB hanno eseguito esperimenti sulla biosintesi di ACE2 e sull'analisi FACS. BE ha eseguito l'acquisizione dei dati dagli esperimenti di immunofluorescenza. PR e TK hanno fornito reagenti critici e hanno rivisto criticamente il manoscritto. NS e SN insieme a MV ed EB hanno partecipato alla pianificazione degli esperimenti, alla revisione e interpretazione dei dati e alla revisione critica del manoscritto. Tutti gli autori hanno letto e approvato il contenuto del manoscritto.

Ringraziamenti

Ringraziamo Claudia Chesley e Jonathan Towner per la lettura critica del manoscritto. Questo lavoro è stato sostenuto da una sovvenzione canadese PENCE (T3), una sovvenzione del gruppo CIHR #MGC 64518 e una sovvenzione CIHR #MGP-44363 (a NGS).

Riferimenti

1. Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ, Guarner J, Paddock CD, Rota PB, Fields B, DeRisi J, Yang JY, Cox N, Hughes J, LeDuc JW, Bellini WJ, Anderson LJ, SARS Working Group. Un nuovo coronavirus associato a sindrome respiratoria acuta grave. *N inglese J Med*. 2003; **348** : 1953-1966. doi: 10.1056/NEJMoa030781. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Marra MA, Jones SJ, Astell CR, Holt RA, Brooks-Wilson A, Butterfield YS, Khattri J, Asano JK, Barber SA, Chan SY, Cloutier A, Coughlin SM, Freeman D, Girn N, Griffith OL, Leach SR, Mayo, McDonald H, Montgomery SB, Pandoh PK, Petrescu AS, Robertson AG, Schein JE, Siddiqui A, Smailus DE, Stott JM, Yang GS, Plummer F, Andonov A, Artsob H, Bastien N, Bernard K, Booth TF, Bowness D, Czub M, Drebot M, Fernando L, Flick R, Garbutt M, Grey M, Grolla A, Jones S, Feldmann H, Meyers A, Kabani A, Li Y, Normand S, Stroher U, Tipples GA, Tyler S, Vogrig R, Ward D, Watson B, Brunham RC, Kraiden M, Petric M, Skowronski DM, Upton C, Roper RL. La sequenza del genoma del coronavirus associato alla SARS. *Scienza*. 2003; **300** :1399–1404. doi: 10.1126/science.1085953. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Rota PA, Oberste MS, Monroe SS, Nix WA, Campagnoli R, Icenogle JP, Penaranda S, Bankamp B, Maher K, Chen MH, Tong S, Tamin A, Lowe L, Frace M, DeRisi JL, Chen Q, Wang D, Erdman DD, Peret TC, Burns C, Ksiazek TG, Rollin PE, Sanchez A, Liffick S, Holloway B, Limor J, McCaustland K, Olsen Rasmussen M, Fouchier R, Gunther S, Osterhaus AS, Drosten C, Pallansch MA, Anderson LJ, Bellini WJ. Caratterizzazione di un nuovo coronavirus associato a sindrome respiratoria acuta grave. *Scienza*. 2003; **300** :1394–1399. doi: 10.1126/science.1085952. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Ng ML, Tan SH, Vedi EE, Ooi EE, Ling AE. Crescita proliferativa del coronavirus SARS nelle cellule Vero E6. *J Gen Virol*. 2003; **84** :3291–3303. doi: 10.1099/vir.0.19505-0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Li M, Moore WJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA, Somasundaran M, Sullivan JL, Luzuriaga K, Greenough TC, Choe H, Farzan M. L'enzima di conversione dell'angiotensina 2 è un recettore funzionale per il coronavirus SARS. *Natura*. 2003; **426** : 450–454. doi: 10.1038/nature02145. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

6. Bergeron E, Vincent MJ, Wickham L, Hamelin J, Basak A, Nichol ST, Chrétien M, NG Seidah. Implicazione delle convertasi proproteine nell'elaborazione e nella diffusione del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave. *Biochem Biophys Res Comm*. 2005; **326** :554-563. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.11.063. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Zhang Y, Li T, Fu L, Yu C, Li Y, Xu X, Wang Y, Ning H, Zhang S, Chen W, Babiuk LA, Chang Z. Silenziamento dell'espressione della proteina spike SARS-CoV nelle cellule coltivate mediante interferenza dell'RNA. *FEBS Lett*. 2004; **560** :141–146. doi: 10.1016/S0014-5793(04)00087-0. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Subbarao K, McAuliffe J, Vogel L, Fahle G, Fischer S, Tatti K, Packard M, Shieh WJ, Zaki S, Murphy B. L'infezione precedente e il trasferimento passivo dell'anticorpo neutralizzante impediscono la replicazione del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave nel tratto respiratorio di topi. *J Virol*. 2004; **78** :3572–3577. doi: 10.1128/JVI.78.7.3572-3577.2004. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Yang ZY, Kong WP, Huang Y, Roberts A, Murphy BR, Subbarao K, Nabel GJ. Un vaccino a DNA induce la neutralizzazione del coronavirus SARS e l'immunità protettiva nei topi. *Natura*. 2004; **428** : 561-564. doi: 10.1038/nature02463. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Bisht H, Roberts A, Vogel L, Bukreyev A, Collins PL, Murphy BR, Subbarao K, Moss B. Sindrome respiratoria acuta grave La proteina del picco di coronavirus espressa dal virus vaccinico attenuato immunizza in modo protettivo i topi. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101** :6641–6646. doi: 10.1073/pnas.0401939101. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Bukreyev A, Lamirande EW, Buchholz UJ, Vogel LN, Elkins WR, St. Claire M, Murphy BR, Subbarao K, Collins PL. Immunizzazione della mucosa delle scimmie verdi africane (*Cercopithecus aethiops*) con un virus parainfluenzale attenuato che esprime la proteina spike del coronavirus della SARS per la prevenzione della SARS. *Lancetta*. 2004; **363** :2122–2127. doi: 10.1016/S0140-6736(04)16501-X. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
12. Sainz B, Jr, Mossel EC, Peters CJ, Garry RF. L'interferone-beta e l'interferone-gamma inibiscono sinergicamente la replicazione della *virologia del* coronavirus associato alla sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV) . 2004; **329** : 11-17. doi: 10.1016/j.virol.2004.08.011. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Stroher U, DiCaro A, Li Y, Strong JE, Aoki F, Plummer F, Jones SM, Feldmann H. Il coronavirus correlato alla sindrome respiratoria acuta grave è inibito dall'interferonalfa. *J Infettare Dis*. 2004; **189** :1164-1167. doi: 10.1086/382597. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Sui J, Li W, Murakami A, Tamin A, Matthews LJ, Wong SK, Moore MJ, Tallarico AS, Olurinde M, Choe H, Anderson LJ, Bellini WJ, Farzan M, Marasco WA. Potente neutralizzazione del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave (SARS) da parte di una proteina mAb umana a S1 che blocca l'associazione del recettore. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101** :2536-2541. doi: 10.1073/pnas.0307140101. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Savarino A, Boelaert JR, Cassone A, Majori G, Cauda R. Effetti della cloroquina sulle infezioni virali: un vecchio farmaco contro le malattie di oggi? *Lancet Infect Dis*. 2003; **3** :722-727. doi: 10.1016/S1473-3099(03)00806-5. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
16. Ng ML, Tan SH, Vedi EE, Ooi EE, Ling AE. Eventi precoci di infezione da SARS coronavirus nelle cellule vero. *J Med Virol*. 2003; **71** :323-331. doi: 10.1002/jmv.10499. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Simmons G, Reeves JD, Rennekamp AJ, Amberg SM, Piefer AJ, Bates P. Caratterizzazione dell'ingresso virale mediato da glicoproteina del picco associato alla sindrome respiratoria acuta grave (SARS-CoV). *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; **101** :4240-4245. doi: 10.1073/pnas.0306446101. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

18. Yang ZY, Huang Y, Ganesh L, Leung K, Kong WP, Schwartz O, Subbarao K, Nabel GJ. L'ingresso pH-dipendente del coronavirus della sindrome respiratoria acuta grave è mediato dalla glicoproteina spike e potenziato dal trasferimento di cellule dendritiche attraverso DC-SIGN. *J Virol.* 2004; **78** :5642-5650. doi: 10.1128/JVI.78.11.5642-5650.2004. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. Un omologo umano dell'enzima di conversione dell'angiotensina. Clonazione ed espressione funzionale come carbossipeptidasi insensibile al captopril. *J Biol Chem.* 2000; **275** :33238–33243. doi: 10.1074/jbc.M002615200. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Song HC, Seo MY, Stadler K, Yoo BJ, Choo QL, Coates SR, Uematsu Y, Harada T, Greer CE, Polo JM, Pileri P, Eickmann M, Rappuoli R, Abrignani S, Houghton M, Han JH. Sintesi e caratterizzazione di una forma oligomerica nativa di glicoproteina spike del coronavirus con sindrome respiratoria acuta grave ricombinante. *J Virol.* 2004; **78** :10328-10335. doi: 10.1128/JVI.78.19.10328-10335.2004. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Keyaerts E, Vijgen L, Maes P, Neyts J, Ranst MV. Inibizione in vitro della sindrome respiratoria acuta grave coronavirus da parte della cloroquina. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **323** :264-268. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.08.085. [[Articolo gratuito di PMC](#)] [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Thorens B, Vassalli P. La cloroquina e il cloruro di ammonio prevengono la glicosilazione terminale delle immunoglobuline nelle plasmacellule senza alterare la secrezione. *Natura.* 1986; **321** :618-620. doi: 10.1038/321618a0. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Dille BJ, Johnson TC. Inibizione dell'espressione della glicoproteina del virus della stomatite vescicolare da parte della cloroquina. *J Gen Virol.* 1982; **62** :91-103. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Tsai WP, Nara PL, Kung HF, Oroszlan S. Inibizione dell'infettività del virus dell'immunodeficienza umana da parte della cloroquina. *AIDS Res Hum Retrovirus.* 1990; **6** :481-489. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Savarino A, Lucia MB, Rastrelli E, Rutella S, Golotta C, Morra E, Tamburrini E, Perno CF, Boelaert JR, Sperber K, Cauda RC. Effetti anti-HIV della cloroquina: inibizione della glicosilazione delle particelle virali e sinergismo con inibitori della proteasi. *J Acquire syndrome da immunodeficienza.* 2004; **35** :223-232. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Ducharme J, Farinotti R. Farmacocinetica clinica e metabolismo della cloroquina. Concentrati sui recenti progressi. *Clin farmacocinetica.* 1996; **31** :257-274. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

Gli articoli del Virology Journal sono forniti qui per gentile concessione di **BioMed Central**
