

综述与编译

HIV-1 整合酶抑制剂的研究进展

陈晓芳, 武燕彬综述 李 浩, 刘浚审校

(中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 本文介绍了目前正处于临床试验的人类免疫缺陷病毒-1(HIV-1)整合酶抑制剂 S-1360 和 L-870810; 另外, 主要叙述了近年来发展比较迅速的三大类 HIV-1 整合酶抑制剂, 即一般含芳环化合物、寡聚核苷酸和寡聚肽的研究进展。

关键词: HIV-1; 整合酶; 抑制剂

中图分类号: R978.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)02-0065-05

HIV-1 中病毒编码的酶有三种: 逆转录酶、蛋白酶和整合酶。目前, FDA 已批准上市了 9 个逆转录酶抑制剂和 6 个蛋白酶抑制剂。虽然对整合酶有抑制作用的化合物类型很多, 但还没有一个化合物上市。

整合酶催化的反应分两步完成^[1,2]: (1) 在被感染细胞的细胞质中, 由病毒 RNA 逆转录生成的双链 DNA 在整合酶催化下, 其 3' 端的长末端重复序列 (LTR) 末端的鸟苷酸和胸腺嘧啶 (GT) 两个核苷酸被切除, 这个位点特定的核酸内切反应被称为“3'加工”(3'-P); (2) 整合前复合物 (PIC, 包含有整合酶、逆转录酶、底物蛋白 P17 和少量的核衣壳蛋白 P24) 穿过核孔进入细胞核后, 病毒 DNA 连接到宿主 DNA 上, 这一过程被称为“链转移”(ST)^[3]。

逆转录病毒 DNA 到宿主染色体的整合是复制周期中必不可少的一步, 并且整合酶在细胞中没有同源蛋白, 所以整合酶抑制剂可能是无毒的, 发现能进入临床应用的整合酶抑制剂令人期待。

1 临床试验的药物

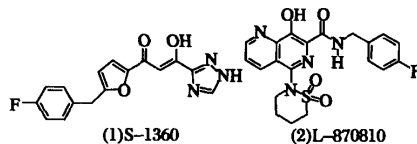
1.1 S-1360

日本 Shionogi 公司开发的化合物 S-1360(1) 进入 II 期临床试验^[4]。最近研究表明, 其有很好的生物利用度和耐受性, 在体外有很好的整合酶抑制活性, IC_{50} 为 $20 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 MTT 测定中 (MT-4 细胞被 III B 感染), EC_{50} , EC_{90} 和 CC_{50} 分别为 200, 740 和 $12\,000 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。S-1360 的体外抗性突变株已分离, 突变位置与整合酶的活性位置非常相近。在密

码子 66 位的突变和其他引起 S-1360 抗性的突变均被定点突变实验所证实。S-1360 对热带 X4 和 R5 毒株, 以及对已知的核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTI)、非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTI) 和蛋白酶抑制剂 (PI) 的耐药株均有活性。S-1360 与 NRTI, NNRTI 和 PI 在体外联合用药有协同作用。在对小鼠 MT4 体内测定中也有活性, ED_{50} 为 $7.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 与齐多夫定 (AZT, ED_{50} 为 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 相似。S-1360 最常见的副作用是头痛和恶梦^[5]。

1.2 L-870810

由 Merck 公司开发的 L-870810(2) 进入 I 期临床试验, 它抑制整合的 ST 过程。研究表明, 在口服给药的情况下, 它有适当的生物利用度和较长的半衰期, 每日给药 2 次是可能的。在猕猴模型中, 用 L-870810 单剂治疗, 导致 HIV 的 RNA 复制减少到原来的 0.001 ~ 0.1。其 IC_{95} 为 $110 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 与当前使用的抗艾滋病药物相当。一项 75 d 的动物实验表明, CD4 水平没有下降, 甚至升高, 并且病毒复制也有较大的下降。此药与其他抗 HIV 药物有协同作用, 没有交叉抗性, 对多重耐药株有效, 所以对产生抗性有较高的屏障。目前, 尚未发现有明显的副作用^[6]。



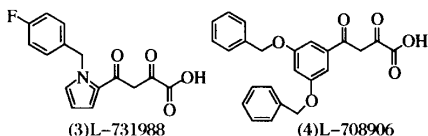
2 HIV-1 整合酶抑制剂的分类

2.1 一般含芳环分子

2.1.1 二酮类及其化学等同体 目前, 已分离出二酮类 (diketo) 化合物的耐药株, 并且显示在对应整合

酶的基因处有突变;在细胞培养中也证实此类化合物对病毒的整合过程起抑制作用。这充分确证了它们是整合酶抑制剂,是目前唯一确证的真正在细胞内起整合酶抑制活性的化合物^[7,8]。

二酮酸类:2000年,Merck公司在用基因重组整合酶筛选的25万个样品中,发现一类含有二酮酸结构的化合物有很好的抑制活性。其中活性最好的两个化合物是L-731988(3)和L-708906(4),它们抑制ST过程的 IC_{50} 分别为0.08和0.2 $mg \cdot L^{-1}$,而抑制3'-P的 IC_{50} 分别为6和20.5 $mg \cdot L^{-1}$,抑制ST过程的活性比抑制“3'加工”的活性好很多^[9]。



二酮类衍生物:对二酮酸类化合物结构改造,将羧基用四唑、三唑等杂环取代得到化合物也有很好的抑制活性,S-1360就属于这一类。另外,如5-氯吡啶取代二酮类化合物(5-CITEP,5),羧基被四唑取代,它与整合酶的活性位点结合,并有许多接触位点 [$IC_{50} = 0.65 \mu mol \cdot L^{-1}$ (ST), $IC_{50} = 35 \mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)]。属于此类化合物的抗炎药物姜黄素(curcumin)也有整合酶抑制活性^[4]。

咪唑羧酰胺类:该类化合物在化学结构上也含有类似于二酮的结构,苯环上的羟基可写成羧基的形式,其中活性较好的是Merck公司开发的L-870810。

2.1.2 多羟基芳香类化合物 该化合物在苯环上均有两个邻位的电负基团,其中以邻苯二酚及其衍生物居多。一般认为,这些基团与整合酶上的二价金属离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})螯合,但目前对这些抑制剂与整合酶的作用机制尚不清楚。如果真是与二价金属离子配位,那么这些化合物将没有抑制选择性。

二咖啡因酸酯类:二咖啡因酸酯类(dicaffeic acid ester)化合物最初是从玻利维亚的一种植物中提取出来的,后来合成了许多类似物,结构都是两个咖啡因酸与中间部分的结构形成酯,中间部分可换为四氢呋喃环、吡咯环、吡喃环、环己烷或各种含酰胺基的直链。另外,也有一些化合物含有单个咖啡因酸或经过修饰的咖啡因酸。这些化合物都在体外抑制整合酶的催化活性, IC_{50} 为 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 数量级,其中研究比较多且活性较好的化合物有菊苣酸(L-chicoric acid, 6)和朝鲜蓟酸(3,5-dicaffeoylquinic acid, 7)。

L-菊苣酸酯的 IC_{50} 为24.9 $\mu mol \cdot L^{-1}$,但在细胞培养中,对HIV-1复制的抑制却表现在与表面蛋白gp120的结合,抑制病毒的吸附这一过程^[10]。

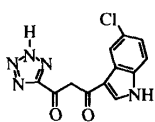
类黄酮类:自然界中可以很容易得到许多类黄酮类(flavonoids)化合物,它们在芳环上含有至少三个羟基,其中3位羟基存在与否对整合酶抑制活性不是必需的,而C2和C3之间的双键是必需的,此处改为单键的香豆素类化合物对整合酶的抑制无效。万寿菊黄素(quercetagenin, 8)有良好的活性, IC_{50} 为0.1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和0.8 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)。最近报道的7位被碘化的葡萄糖取代的海葵素类化合物(9)也有很好的活性, IC_{50} 为0.4 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和2.1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P),并且相对无毒,其中碘化的葡萄糖取代起了关键的作用^[9]。

其他多羟基芳香类化合物:到目前为止,从自然界中分离和人工合成出了许多含多羟基的化合物,例如苯乙烯喹啉类(10)^[11]、含邻苯二酚的螺环类(11)^[12]、蒽醌类(12)^[6]、抗肿瘤药(如依托泊苷,13)等。这些化合物在体外测定中对整合酶有很好的抑制作用,为 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 数量级,但在细胞培养中它们抗HIV的活性不是被细胞毒性所掩盖,就是表现在对HIV复制周期中其他环节的抑制,或者它们的抑制机制不能完全确定^[13]。

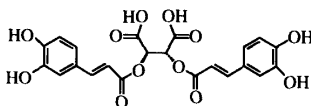
2.1.3 其他类 经筛选,人们发现许多化合物有整合酶抑制活性,它们含有许多官能团,例如硫酸酯类[14, $IC_{50} = 10.9 \mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和16.2 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)]、硫酸酯类(15, $IC_{50} = 0.53 \mu mol \cdot L^{-1}$)、酰胺类[16, $IC_{50} = 1.1 \mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和2.3 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)]、酰胺类[17, $IC_{50} = 5.2 \mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和6.7 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)]和脲类[18, $IC_{50} = 6.8 \mu mol \cdot L^{-1}$ (ST)和8.7 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (3'-P)]等^[9,14]。对不同种类抑制剂构效关系的研究有利于人们对整合酶的生化结构和功能更全面深入的了解,向理性设计化合物的方向发展。

2.2 寡聚核苷酸

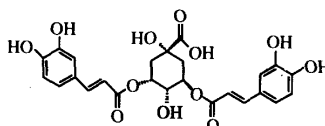
2.2.1 一般寡聚核苷酸 天然的寡聚核苷酸可以通过和病毒DNA竞争与HIV整合酶结合,从而抑制整合过程,但小的寡聚核苷酸很快被细胞中的核酸酶切断。人们合成了一些非天然二聚核苷酸,通过不常见的核苷酸间磷酸酯键结合可提高其在细胞中的稳定性,对HIV整合酶的抑制活性为 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 数量级。



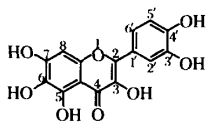
(5) 5-氯咪唑取代二酮类



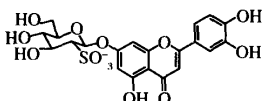
(6) 菊苣酸



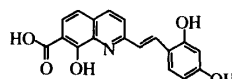
(7) 朝鲜蓟酸



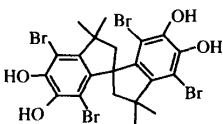
(8) 万寿菊黄素



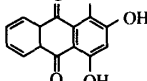
(9) 葡萄糖取代的海葵素类



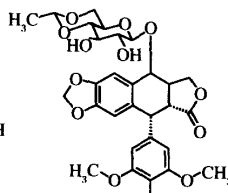
(10) 苯乙烯喹啉类



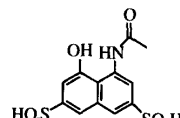
(11) 含邻苯二酚的螺环类



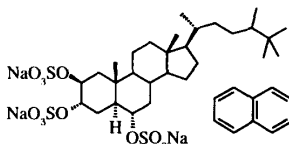
(12) 蒽醌类



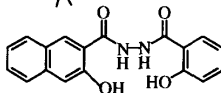
(13) 依托泊苷



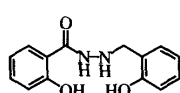
(14) 磺酸酯类



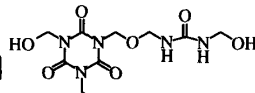
(15) 硫酸酯类



(16) 酰胺类



(17) 酰胺类



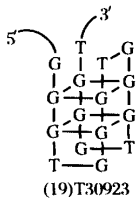
(18) 脲类

2.2.2 富含鸟嘌呤的寡聚核苷酸 此类化合物在一定钾离子浓度下与钾离子结合生成紧密的鸟嘌呤四聚体结构,此种构型时在体外测定中有很好的整合酶抑制活性,多数为 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 数量级,例如 T30923(19, $\text{IC}_{50} = 80 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 T40214(20, $\text{IC}_{50} = 40 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)。但在细胞培养中,由于不能穿透细胞膜进入细胞,其抑制活性表现为对细胞表面蛋白 gp120 的抑制。此类化合物在一定钾离子浓度下才能生成折叠的鸟嘌呤四聚体结构,一般细胞内钾离子浓度为 $140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞外钾离子浓度为 $4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, T30923 在钾离子浓度大于 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时折叠成鸟嘌呤四聚体紧密结构, T40214 在钾离子浓度大于 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时折叠成一个紧密结构,所以它们在细胞外是非折叠状态。针对此类化合物无法穿透细胞膜的缺点,加入脂质载体与非折叠状态的

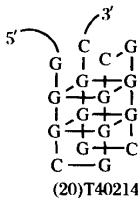
寡聚核苷酸结合,在载体的帮助下进入细胞内,然后在细胞质中钾离子诱导寡聚核苷酸重新折叠生成四聚体紧密结构发挥整合酶抑制活性。因此,以后的发展方向是设计在钾离子浓度为 $4 \sim 140 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时发生结构折叠的富含鸟嘌呤的寡聚核苷酸^[15]。

2.3 肽

2.3.1 DNA 双螺旋小沟结合剂 整合酶结合到前病毒 DNA 的两个 LTR 末端特定的序列(在 HIV-1 的 U3'和 U5'的 LTR 是富含 A·T 的序列),这些序列上 DNA 双螺旋小沟是抑制整合过程可能的靶点。最先发现的抗病毒抗生素纺锤菌素(netropsin)和司他霉素(distamycin)在 DNA 双螺旋小沟中选择性地结合到富含 A·T 的序列。随着含噻唑环的寡聚肽(21)的合成,人们发现这是一类选择性的与富含 A·T 序列的 DNA 双螺旋凹槽键合的化合物,这类化合物含 1~4 个噻唑,在 N 和 C 端可连有不同的化学基团:在 C 端连二甲胺基丙基或乙二胺四乙酸(EDTA)的一部分,在 N 端连胺基乙醇基或 EDTA 的一部分。一些此类化合物能抑制 HIV-1 整合酶的催化反应,抑制活性随着含噻唑环的增多而提高,在 N 端和 C 端各种电负性或电正性基团对活性也有一定的影



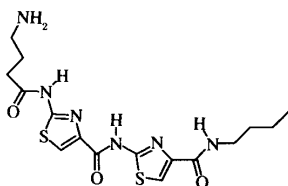
(19) T30923



(20) T40214

响^[16]。

2.3.2 寡聚肽 科学家们利用双杂交系统对寡聚肽进行筛选,找到一个含 33 个氨基酸残基的肽 I₃₃ (QLLIRMIYKNILFYLVPCPGHGAEPERRNIKYLV),它与 HIV-1 整合酶有紧密的结合,在体外 I₃₃抑制整合酶的催化活性[IC₅₀ = 9 μmol·L⁻¹(3'-P)]。进一步的研究把先导化合物优化为含 12 个氨基酸的肽 EBR28 [YWLLIRMIYKNI, IC₅₀ = 5 μmol·L⁻¹(3'-P)],相当于 I₃₃的 N 端。对 EBR28 的核磁共振谱的研究表明,其二级结构是一个 α 螺旋,亲水残基位于一侧,疏水残基位于另一侧。对这一先导化合物的优化与发展有两个作用:找到非常有效的抑制剂;有助于得到酶的结构和功能的信息^[17]。另外,有报道环肽具有整合酶抑制活性^[18]。



(21) 含噻唑环的寡聚肽

3 结语

综上所述,许多化合物在生化测定中对整合酶有抑制活性。但在组织培养中,只有二酮类化合物被确证在体内抑制整合酶的催化活性。其他多数化合物表现为没有活性或活性很小,并且活性机制没有特异性。即使是有活性的化合物也还没有证实是否是对整合过程的抑制。

到目前为止,整合酶抑制剂的发展相对缓慢,究其原因,主要有两方面:(1)测定方法的限制:基于细胞培养的测定是随着细胞系和促进 HIV 复制的实验室菌株的发展而建立的,整合的抑制在这种人工的培养条件下是否能进行最好的测定尚不清楚。在基于寡聚肽的酶测定中,并不是对整合所有的步骤都进行测定,所发现的抑制剂可能对准的生化作用位点是与其他酶共享的(例如镁离子的整合),那么这些化合物的毒性和活性就很难分开;(2)生化结构信息的限制:整合酶由于其溶解性差,缺乏其三维结构的信息。由于整合酶与 DNA 键合会有构型的变化,因此整合酶与 DNA 底物共结晶的结构信息还应测定。此外,整合过程是个复杂的生化过程,有许多特性还未弄清。

所以,筛选方法的改进及对整合过程生化反应

的进一步探索将有助于药物的理性设计,最终开发出有效合理的抑制剂^[6,19]。

参考文献

- [1] Abdel-Rahman HM, Al-Karamany GS, El-Koussi NA, et al. HIV protease inhibitors: peptidomimetic drugs and future perspectives [J]. *Curr Med Chem*, 2002, 9(21): 1905 - 1922.
- [2] Debyser Z, Cherepanov P, Van Maele B, et al. In search of authentic inhibitors of HIV-1 integration [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2002, 13(1): 1 - 15.
- [3] Zouhiri F, Mouscadet JF, Medkour K, et al. Structure-activity relationships and binding mode of styrylquinolines as potent inhibitors of HIV-1 integrase and replication of HIV-1 in cell culture [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(8): 1533 - 1540.
- [4] Dayam R, Neamati N. Small-molecule HIV-1 integrase inhibitors: the 2001-2002 update [J]. *Curr Pharm Des*, 2003, 9(22): 1789 - 1802.
- [5] Billich A. S-1360 Shionogi-GlaxoSmithKline [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2003, 4(2): 206 - 209.
- [6] Boyle BA. Recent developments in HIV research [J]. *AIDS Read*, 2002, 12(9): 390 - 394.
- [7] Marchand C, Zhang X, Pais GC, et al. Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by β-diketo acids [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(15): 12596 - 12603.
- [8] Wai JS, Egbertson MS, Payne LS, et al. 4-Aryl - 2,4-dioxobutanoic acid inhibitors of HIV-1 integrase and viral replication in cells [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(26): 4923 - 4926.
- [9] Maurin C, Bailly F, Cotel P. Structure-activity relationships of HIV-1 integrase inhibitors - enzyme-ligand interactions [J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(18): 1795 - 1810.
- [10] Hwang DJ, Kim SN, Choi JH, et al. Dicafeoyl- or digalloyl pyrrolidine and furan derivatives as HIV integrase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2001, 9(6): 1429 - 1437.
- [11] Ouali M, Laboulais C, Leh L, et al. Modeling of the inhibition of retroviral integrases by styrylquinoline derivatives [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(10): 1949 - 1957.
- [12] Molteni V, Rhodes D, Rubins K, et al. A new class of HIV-1 integrase inhibitors: the 3,3,3',3'-tetramethyl-1,1'-spirobi(indan)-5,5',6,6'-tetrol family [J]. *J Med Chem*, 2000, 43(10): 2031 - 2039.
- [13] Tewtrakul S, Miyashiro H, Nakamura N, et al. HIV-1 integrase inhibitory substances from *Coleus parvifolius* [J]. *Phytother Res*, 2003, 17(3): 232 - 239.

- [14] Gupta SP, Nagappa AN. Design and development of integrase inhibitors as anti-HIV agents[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(18):1779-1794.
- [15] Jing NJ, Xiong WJ, Guan YL, et al. Potassium-dependent folding: a key to intracellular delivery of G-quartet oligonucleotides as HIV inhibitors[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(17):5397-5403.
- [16] Tarrago-Litvak L, Andreola ML, Fournier M, et al. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase: classical and emerging therapeutical approaches[J]. *Curr Pharm Des*, 2002, 8(8):595-614.
- [17] de Soultrait VR, Caumont A, Parissi V, et al. A novel short peptide is a specific inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 integrase [J]. *J Mol Biol*, 2002, 318(1):45-58.
- [18] Mitchell SS, Faulkner DJ, Rubins K, et al. Dolastatin 3 and two novel cyclic peptides from a palauan collection of *Lyngbya majuscula*[J]. *J Nat Prod*, 2000, 63(2):279-282.
- [19] Parrill AL. HIV-1 integrase inhibition: binding sites, structure activity relationships and future perspectives[J]. *Curr Med Chem*, 2003, 10(18):1811-1824.

肝豆状核变性基因与肿瘤耐药的研究进展

孙宇萍¹, 王树滨¹综述 陈伟¹, 杨纯正²审校

(1. 暨南大学第二附属医院深圳市人民医院肿瘤研究所, 广东 深圳 518020;

2. 中国医学科学院血液学研究所, 天津 300020)

摘要: 肝豆状核变性基因(ATP7B)定位于13q14.3区,编码一种铜转运P型ATP酶。ATP7B的突变使其蛋白缺乏或丧失转运肝铜的功能,导致肝、肾和脑等组织铜累积过多,表现为慢性肝病和(或)神经损害,ATP7B蛋白对铜的转运机制尚未明了。ATP7B在多种肿瘤细胞中表达对顺铂耐药,研究表明ATP7B除了是铜的转运蛋白外,还可能转运顺铂,但转运位点不清楚。ATP7B可能是一个新的肿瘤化疗耐药指标。

关键词: 肝豆状核变性; 顺铂; 多药耐药

中图分类号: R979.1; Q343.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)02-0069-04

肝豆状核变性基因铜转运P型三磷酸腺苷酶(copper-transporting P-type adenosine triphosphatase, ATP7B)定位于13q14.3区,因其蛋白产物为一种铜转运ATP酶而得名,cDNA序列长4233bp,含有22个外显子,编码1411个氨基酸,主要存在于肝脏和脑中。

1 ATP7B的发现

1993年,Yamaguchi等^[1]用铜和Menkes致病基因(ATP7A)作为探针,筛选人肝细胞互补DNA文库,经过第三次亚克隆和序列过筛后有65个细胞系呈阳性反应,其中一个细胞系包含一个开放读框,与Menkes蛋白有65%的同源性;Southern印迹法分析表明,该cDNA在肝豆状核变性(Wilson's disease, WD)患者中位于13号染色体上,在这个cDNA上检测到一个7.5kb的转录产物,此产物存在于缺乏

Menkes转录产物的肝细胞和细胞系中,在WD患者的肝细胞中缺乏。这些数据表明,此cDNA是WD的候选基因,编码的蛋白是P型ATP酶家族中的一份子。随后,Tanzi等^[2]用连锁不平衡和单倍型分析法确定WD基因位于13q14.3上,连锁图数据提供了ATP7B是WD基因的确切证据。

2 ATP7B的结构

ATP7B基因包含22个外显子,它的转录产物约为7.5kb大小,编码一个主要表达在肝、肾和胎盘的蛋白。ATP7B蛋白属于铜转运P型ATP酶,一般特征含有TGEA基序(磷酸酶结构域)、DKTGT基序(磷酸化结构域)、TGDN基序(ATP结合结构域)和连接ATP结合结构域与跨膜片段的MXGDGXNDXP序列。在它的N端含有6个金属结合基序及膜内区域的CPC基序、SEHPL基序和8个跨膜片段^[3],金属结合基序对铜有特异性,它们的突变可以降低蛋白对铜的亲和力^[4];CPC和SEHPL基序与金属的跨膜转

收稿日期:2003-07-09

基金项目:深圳市科技计划资助项目(200204018)