

## 具有新作用机制的 HIV-1 逆转录酶抑制剂研究进展

周忠霞, 孙 林, 康东伟, 陈子慧, 唐苗苗, 李思雨, 展 鹏, 刘新泳\*

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

**摘要:** HIV-1 逆转录酶 (RT) 在病毒复制周期具有重要作用, 因此多年来一直是抗病毒药物研发的热点。目前上市的 HIV-1 RT 抑制剂分为核苷类抑制剂 (NRTIs) 和非核苷类抑制剂 (NNRTIs), 它们活性高、疗效好, 但同时存在长期服用不良反应大、易产生耐药性等问题。因此, 研究新作用机制的 RT 抑制剂十分必要。近几年, 核苷酸竞争性抑制剂、逆转录酶定向的突变诱导抑制剂、引物/模板-竞争性逆转录酶抑制剂、聚合酶-RNase H 双重抑制剂、逆转录起始过程抑制剂、肽类抑制剂等新作用机制的 HIV-1 RT 抑制剂见诸报道, 为抗艾滋病药物的研发带来了新的曙光。本文重点介绍这方面的研究进展。

**关键词:** 艾滋病; 药物靶标; HIV-1; 逆转录酶; 抑制剂; 药物设计

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2018) 05-0691-10

## Progress on HIV-1 RT inhibitors with novel mechanism of action

ZHOU Zhong-xia, SUN Lin, KANG Dong-wei, CHEN Zi-hui, TANG Miao-miao,  
LI Si-yu, ZHAN Peng, LIU Xin-yong\*

(Department of Medicinal Chemistry, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education),  
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Ji'nan 250012, China)

**Abstract:** HIV-1 reverse transcriptase (RT) plays an important role in HIV-1 life cycle. At present, the listed NRTIs and NNRTIs targeting the RT showed high efficiency as clinical first-line drugs. However, the rapid emergence of multidrug-resistant viruses and significant cumulative drug toxicities compromises antiretroviral therapy efficacy and limits therapeutic options. Therefore, there is an urgent demand for new types of RT inhibitors with novel mechanism of action to address this challenge. In recent years, additional inhibitors with novel mechanism of action have been reported, including nucleic acid competitive inhibitors, reverse transcriptase-directed mutagenesis inhibitors, primers/templates-competitive reverse transcriptase inhibitors, polymerase-RNase H inhibitors, reverse transcription initiation process inhibitors, peptide inhibitors etc., which have brought new hope to the development of novel anti-HIV drugs. This article focuses on the development of these inhibitors.

**Key words:** AIDS; drug target; HIV-1; reverse transcriptase; inhibitor; drug design

### 1 HIV-1 逆转录酶聚合酶功能域的结构

HIV-1 逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 是一个由 p51 和 p66 亚基组成的异二聚体酶, 是 HIV-1 *pol*

基因的产物<sup>[1]</sup>。p51 和 p66 亚基前 440 个氨基酸序列相同, 但是在空间构象上却有着显著差异, 表现为 p51 亚基的活性部位序列呈闭合构象而不具有催化功能, 仅起构象调节作用。因此每个 p66/p51 异二聚体只有一个具有活性的聚合酶功能域, 它位于 p66 亚基上的 N 末端部位, p66 亚基 C 末端为 RNase H 活性部位 (图 1)<sup>[2]</sup>。

上世纪 90 年代, RT 功能域的晶体结构已得到确

收稿日期: 2017-11-21; 修回日期: 2018-01-02.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81573347, 81420108027);

2017 年山东省重点研发计划资助项目 (2017CXGC1401).

\*通讯作者 Tel: 86-531-88380270, E-mail: xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-1153

证,从图 1 可以看出,它含有 5 个  $\beta$  折叠和 2 个  $\alpha$  螺旋结构。RT 结构域外形类似于人的右手,可分为手指、手掌、拇指和连接等 4 个亚结构域,其中手掌亚结构域最为保守<sup>[2]</sup>。聚合酶结构域中包含 3 个保守的天冬氨酸残基: D110、D185 和 D186,该处与引物的 3'-OH 末端空间上接近,二者能相互结合,催化以脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP) 为原料,以单链病毒 RNA 为模板逆转录为双链病毒 DNA。研究表明,上述 3 个天冬氨酸若发生突变,聚合酶的活性将会显著降低。此外,聚合酶结构中的凹槽 (cleft) 区域,能引导模板-引物的准确定位。手掌域中的 DNA “引物沟” (primer grip) 结构域,对引物末端与聚合酶活性位点的准确契合及后续聚合过程中模板-引物的易位有重要意义<sup>[3,4]</sup>。

### 2 HIV-1 逆转录酶聚合酶功能域的功能

HIV-1 多聚酶主要有两种功能: 依赖 RNA 的 DNA 多聚酶活性 (RDDP) 和依赖 DNA 的 DNA 多聚酶活性 (DDDP)。前者在复制最初阶段以病毒自身的 RNA 链为模板催化底物生成 RNA/DNA 杂化双链,后者则是以新生成的 DNA 链为模板催化底物生成双

链 DNA,就此完成病毒基因由单链 RNA 转移到双链 DNA 的逆转录过程<sup>[5]</sup>。

多聚酶催化的脱氧核苷酸的聚合反应是逆转录过程中至关重要的一步,此反应是有序、逐步进行的: 首先酶与模板引物相结合 (step 1); 然后适当的底物结合到酶-模板引物复合物上,在此过程中酶的构象将发生变化 (step 2); 第三步是金属离子通过亲核进攻使单个的 (脱氧) 核苷酸结合到延长的 DNA 链中 (step 3), 同时产生磷酸二酯键释放焦磷酸 (step 4); 最后酶从模板引物中分离出来或是沿着产物 DNA 易位到下一个新生成的 3 位末端 [即从 N 位点易位到 P 位点 (step 5), 引物易位前后存在的两个暂时动态中间体分别成为复合物 N、复合物 P], 开始下一轮的催化反应 (图 2)<sup>[6]</sup>。

### 3 具有新作用机制的 HIV-1 逆转录酶抑制剂

目前临床应用的 HIV-1 RT 抑制剂主要分为核苷 (酸) 类逆转录酶抑制剂 (nucleoside/nucleotide RT inhibitors, NRTIs/NtRTIs) 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (nonnucleoside RT inhibitors, NNRTIs) 两大类。NRTIs/NtRTIs 的结构属于核苷类似物,可作为天然脱氧核苷酸的类似物嵌入病毒 DNA 双链,由于其缺乏 3'-OH 而导致逆转录反应终止<sup>[7]</sup>; NNRTIs 属于结构多样性的杂环化合物,它们通过结合在 RT 活性位点旁边的疏水区诱导逆转录酶构象发生改变进而引起催化部位的结构破坏<sup>[8]</sup>; 除对传统作用靶点的研究外,寻找全新作用机制的 HIV-1 RT 抑制剂也是当前抗艾滋病药物研究的重要任务,本文重点介绍这方面的研究进展。

#### 3.1 核苷酸竞争性逆转录酶抑制剂

核苷酸竞争性逆转录酶抑制剂 (nucleotide-competing RT inhibitors, NcRTIs) 是一类作用机制独特的抑制剂,其通过可逆性抑制进入 RT 活性位点的

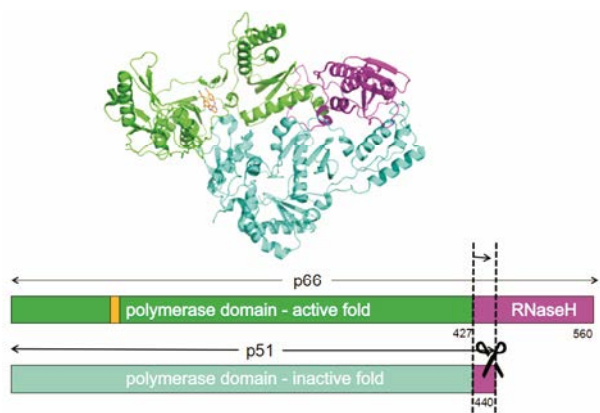


Figure 1 The crystal structure and sequence structure of RT

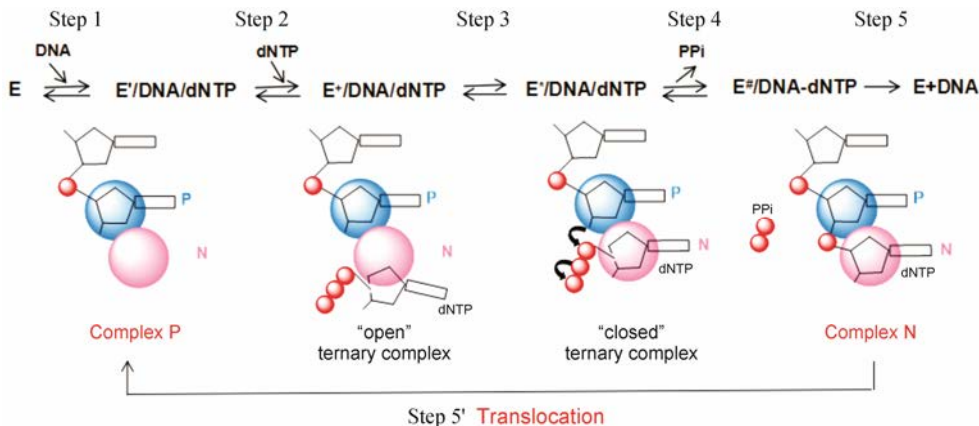


Figure 2 Mechanism of action of DNA polymerization

dNTP 底物与酶的结合发挥抑制作用<sup>[8]</sup>。代表性化合物有吡啶吡啶酮类 CBL-4.0 (**1**) 和 CBL-4.1 (INDOPY-1, **2**)、苯并咪唑并嘧啶类 (**3~7**)、4-二甲氨基-6-乙烯基嘧啶类 (DAVPs, **9~11**)<sup>[9]</sup> (图 3)。

**3.1.1 吡啶吡啶酮类** Valeant 和 Tibotec 两大公司通过对化合物库高通量筛选得到吡啶吡啶酮类化合物 (indolopyridones, INDOPYs) CBL-4.0 (VRX-329747) 和 CBL-4.1 (INDOPY-1)<sup>[9]</sup>。这两个化合物具有较好的抗病毒活性,  $EC_{50}$  值分别为  $150\sim 200\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $20\sim 30\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且细胞毒性极低 ( $CC_{50}>100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。机制研究表明两个化合物均作用于 HIV-1 复制的逆转录过程。INDOPYs 结构不同于核苷类似物, 作用机制亦区别于传统的 NNRTIs, 主要体现在以下 3 方面: ① INDOPYs 的抗病毒谱与 NNRTIs 和 NRTIs 不同。NNRTIs 特异性作用于 HIV-1 而 INDOPY-1 对 HIV-1、HIV-2 ( $EC_{50}=180\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , HIV-2 ROD) 和猴免疫缺陷病毒 (SIV,  $EC_{50}=210\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , SIV Mac251) 均有活性<sup>[10]</sup>; NRTIs 属于广谱抗病毒抑制剂, 而目前报道的 INDOPY-1 仅作用于慢病毒属<sup>[11]</sup>; ② INDOPYs 对 NNRTIs 耐药突变株活性影响不同。VRX-329747 和 INDOPY-1 活性几乎不会被 NNRTIs

选择性突变株影响, 其对 NNRTIs 代表性的双突变株 K103N-L100I RT 活性下降为原来的 1/4, 而 efavirenz 对突变株几乎丧失活性<sup>[11]</sup>; ③ INDOPYs 对 NRTIs 耐药突变株活性影响不同: INDOPY-1 的活性几乎不被嘧啶类似物耐药突变 (包括 M41L/L210W/T215Y 和 D67N/K70R/T215F/K219Q 突变<sup>[12]</sup>) 和其他 NRTIs 诱导的突变影响; 当发生 M184V 或 Y115F 单突变时, INDOPY-1 的活性下降为原来的 1/8~1/3, 而两者发生双突变时 INDOPY-1 的活性下降约为原来的 1/100; 发生 K65R 突变时, INDOPY-1 的活性增强 2~5 倍, 而此突变能够引起除 AZT 以外所有的 NRTIs 活性下降<sup>[11]</sup>。

鉴于 INDOPYs 特殊的抗耐药性, 研究者对 INDOPY-1 进行了一系列的机制研究。结果表明, INDOPY-1 能够结合并稳固 RT-DNA 模板二元复合物, 其对 DNA 聚合反应抑制作用不受外来核苷酸种类的影响 (不同于 NRTIs 的作用机制); 另一个有趣的发现是, 当引物链 3'-末端最后一个核苷酸为嘧啶类核苷酸 T 和 C 时可以大大提高 INDOPY-1 的结合力<sup>[13]</sup>。位点特异性足迹法 (site-specific footprinting) 表明, INDOPY-1 在 HIV-1 RT 易位后代替核苷酸与

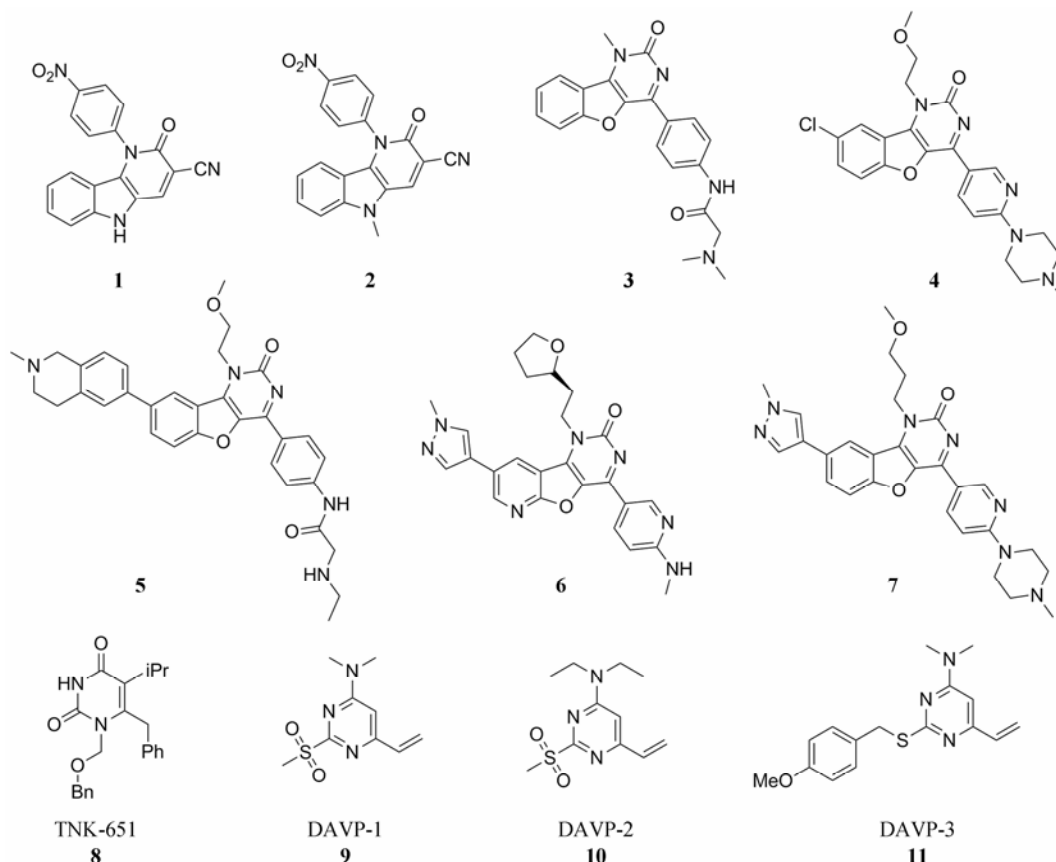


Figure 3 Chemical structures of NcRTIs

RT 结合, 诱导形成一个稳固的失活复合物, 从而阻止核苷酸的结合, 若要恢复合成则需要 INDOPY-1 与 RT 解离, 即使最后发生解离, INDOPY-1 也改变了 RT 催化合成动力学而发挥抑制作用。

目前尚未得到 RT/INDOPY-1 的晶体结构, 可能是由于 INDOPYs 仅特异性作用于 RT/模板-引物二元复合物形成的中间过渡态, 这在一定程度上影响了对该类化合物作用机制的理解并限制了对该类化合物的进一步合理修饰。

受 INDOPYs 启发, Claudio F. Sturino 课题组通过高通量筛选的方法发现了苯并咪唑并嘧啶类 NcRTIs, 并通过大量结构优化和构效关系探讨得到活性突出的化合物 5~7, 与 NNRTIs 相比, 该类化合物表现出了很好的脂溶性、水溶性和肝微粒体代谢稳定性, 进一步修饰主要针对改善化合物的渗透性和药动学性质<sup>[11]</sup>。

**3.1.2 4-二甲氨基-6-乙烯基嘧啶类 (DAVPs)** 不同于 INDOPYs, NcRTIs 家族的另一成员 DAVPs (9~11) 是由组合化学的方法得到。由于 DAVPs 结构与 HEPT 衍生物 TNK-651 (8) 类似, 最初 DAVPs 被归为 NNRTIs, 但随后的酶学研究揭示了 DAVPs 与核苷酸底物的竞争性抑制机制。不同于特异性作用于 RT/模板-引物二元复合物的 INDOPYs, DAVPs 可以作用于 RT/模板-引物二元复合物和游离态 RT。以上 DAVPs 三个化合物中, DAVP-1 对野生型酶活性最好 ( $K_i = 8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 突变株的活性测试表明, L100I 或 V179D 突变几乎不会影响 DAVP-1 的活性 ( $K_i = 12$  和  $15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 而该突变却使 3 个上市 NNRTIs (efavirenz、nevirapine 和 delavirdine) 的活性大大下降<sup>[10, 14-16]</sup>, 并会使 etravirine 活性中度下降<sup>[17-20]</sup>。K103N 和 Y181I 突变会使 DAVP-1 的活性大大下降 ( $K_i = 3.2$  和  $39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。不同于 DAVPs, NcRTIs 家族 INDOPYs 的活性却几乎不会被上述突变所影响<sup>[14]</sup>。

目前已得到野生型 HIV-1 RT/DAVP-1 复合物的晶体结构 (图 4)<sup>[21]</sup>。其晶体结构显示, 其作用靶点位于 p66 亚基拇指和手掌亚结构域交界处, 邻近聚合酶活性位点, 而非 NNRTIs 结合位点 (NNIBP)。NcRTIs 抑制剂结合位点 (NcIBP) 的氨基酸对酶活性的发挥具有重要作用, 该结构域的氨基酸大多属于高度保守的氨基酸, 不易发生突变, 这为设计新型抗耐药性抑制剂提供了有益的启示。

但是, DAVP-1/RT 复合物晶体结构尚不能解释位于 NNIBP 的 K103N 和 Y181I 突变为何会影响 DAVP-1 的活性。有趣的是, 人们从 RT/NNRTIs (PDB: 1TV6、2ZD1、1KLM 和 2B5J) 的晶体结构分析发现, NNIBP 和催化活性位点中间有个小的通道使得 NNIBP 与催化位点相连通。Botta 研究组<sup>[22]</sup>设想 DAVP-1 与 NNIBP 结合后经过一系列的相互作用可穿过位于 NNIBP 和催化位点之间的通道到达 NcIBP 发挥抑制作用, 随后的分子动力学实验对这一设想进行了验证。这一重要发现让研究者对 NNIBP 的修饰有了更广阔的思路, 同时, DAVPs 特殊的作用机制引起了研究者进一步开发 NcRTIs 类小分子抑制剂。

### 3.2 逆转录酶定向突变诱导抑制剂

RT 定向突变诱导抑制剂整合入病毒 DNA 后, 可使其发生错配, 增加 HIV 突变概率, 进一步导致致死性突变, 但是它们不能阻断 DNA 的合成。这些抑制剂包括部分核苷类衍生物 (图 5), 如: 5-OH-dC (12), 其通过细胞激酶催化生成 5-OH-dCTP 作为核苷酸类似物与鸟嘌呤核苷酸配对改变 DNA 的复制过程<sup>[23]</sup>; KP-1212 (14), 属于非链终止的 NRTI 脱氧胞苷核苷类似物, 由一个脱氧核糖和一个修饰的杂环碱基组成, 它能够通过 RT 整合进入病毒 DNA 使碱基发生错配从而增加 HIV 的突变率, 这种缺陷型病毒会导致 HIV 致死性突变<sup>[24]</sup>; KP-1461 (15), 是 KP-1212 的单磷酸化前药, 使 HIV 突变率增加, 生存能力大大降

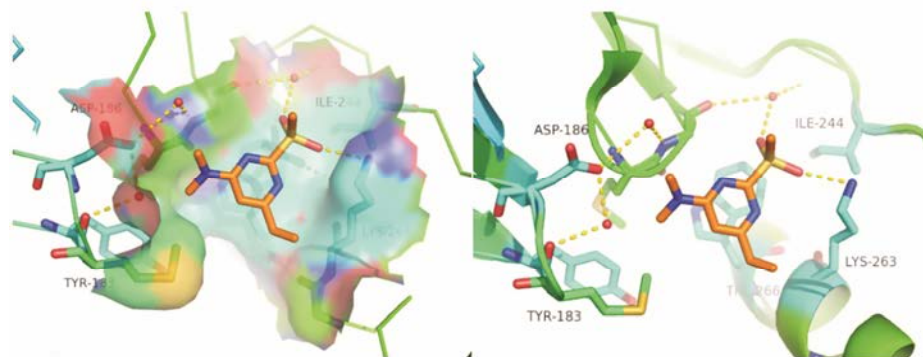


Figure 4 The co-crystal complex of DAVP-1/RT (PDB code: 3ISN)

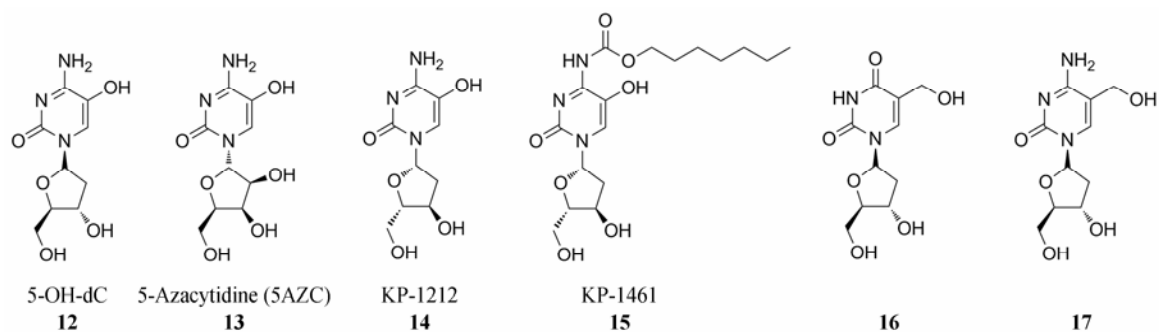


Figure 5 Chemical structures of RT-directed mutagenic inducers inhibitors

低。此外, 5-AZC (13)<sup>[25]</sup>、5-羟甲基-2'-dU (16) 和 5-羟甲基-2'-dC (17)<sup>[23]</sup>也属于核苷类似物突变诱导抑制剂, 新颖独特的抗病毒机制使得这类化合物具有良好的开发前景。

### 3.3 引物/模板-竞争性逆转录酶抑制剂

引物/模板-竞争性逆转录酶抑制剂有 KM-1 (18)<sup>[26]</sup>、SY-3E4 (19)<sup>[27]</sup>和 *N*-{2-[4-(胺基磺酰基)苯基]乙基}-2-(2-噻吩)乙酰胺 (NAPETA, 20)<sup>[28]</sup> (图 6)。

KM-1 类化合物在结构上是高度对称的, 其发挥抑制作用主要是通过替代酶上的 DNA, 尽管酶-DNA-抑制剂三元复合物可以形成, 但并不能产生催化作用, 即 KM-1 的结合位点与模板引物的结合位点是重叠的, KM-1 竞争性占据了结合位点使得模板引物无法进入 DNA 多聚酶的活性位点<sup>[26]</sup>。SY-3E4 能够取代 RT 的适配子, 选择性抑制 DNA 依赖的 DNA 聚合酶, 从而抑制野生型和突变型 HIV-1 的复制, 但该类抑制剂对 RNA 依赖的 DNA 聚合酶活性没有影响<sup>[27]</sup>。NAPETA 抑制剂可以同时抑制 DDDP 和 RDDP, 其 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.2 和 2.1 μmol·L<sup>-1</sup>。此外, NAPETA 也可以通过干扰 RT-DNA 复合物的形成发挥抑制作用<sup>[28]</sup>。

### 3.4 易位缺陷型抑制剂

TDRTIs 属于在糖部分做修饰的 NRTIs 抑制剂, 其主要通过阻止 RT 易位来发挥作用。其中, 4'位置取代的 EFdA 活性最好, 属于含 3'-OH 的核苷酸类似物, 对突变株的活性优于传统的 NRTIs (图 7)。例如,

EFdA 对 M184V 突变株的 EC<sub>50</sub> 为 8 nmol·L<sup>-1</sup>, 对其他突变株甚至更加灵敏。EFdA 通过削弱 RT 从易位前核苷酸结合位点 (N site) 到易位后引物结合位点 (P site) 的过程发挥抑制作用。此外, EFdA 单磷酸化产物容易作为底物被错误识别, 这也会导致引物链延长失败。研究表明, EFdA 的糖环构型与 4'-乙炔基在活性发挥中具有重要作用。目前 EFdA 的研究处于临床 I 期试验阶段<sup>[29]</sup>。

### 3.5 链终止延迟型抑制剂

DCTRTIs 结构类似于 NRTIs, 其 dNTPs 可作为底物参与 DNA 链的延长, 进而由于立体位阻干扰 RNA: DNA 杂合及 RT 核苷酸结合, 最终封锁 DNA 链的延长, 此外还可以通过影响碱基配对阻止 (+) 链 DNA 的合成<sup>[5]</sup>。主要包括以下两类化合物 (图 8)。

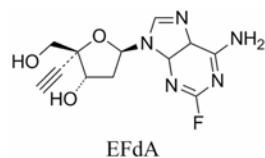


Figure 7 Chemical structure of TDRTIs

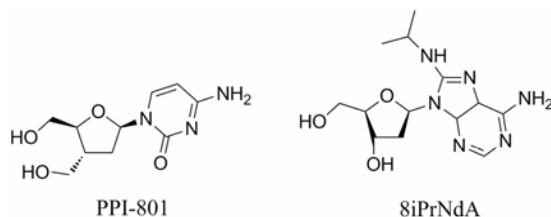


Figure 8 Chemical structures of DCTRTIs

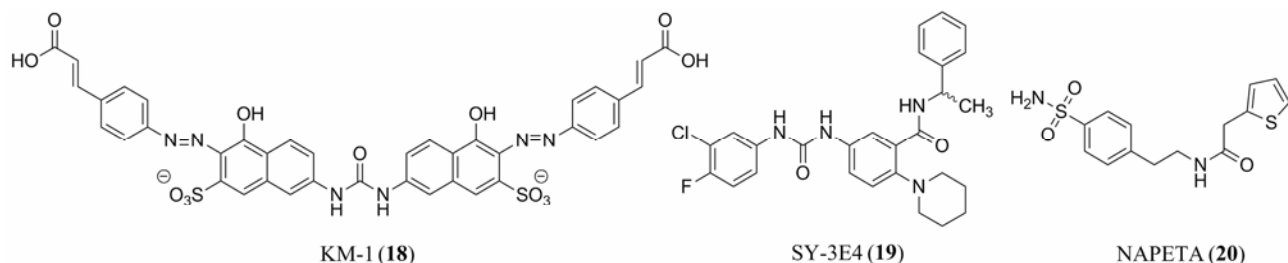


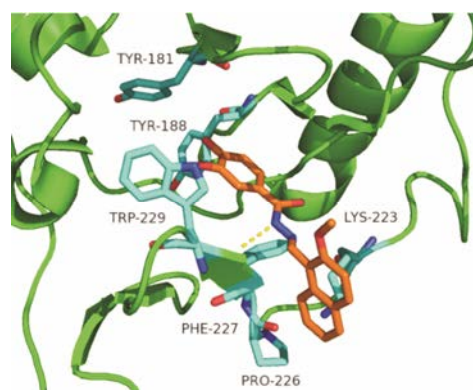
Figure 6 Chemical structures of primer/template-competing RT inhibitors

**3.5.1 2',3'-双脱氧-3'-C-羟甲基胞嘧啶核苷** PPI-801 三磷酸腺苷可以作为 RT 的底物参与 DNA 链的延长, 但不同于其他 NRTIs 直接作为链的终止剂。相反, 3'-羟甲基取代后仍允许一个额外的 dNTP 结合, 经过这一步, DNA 链在+1 的位置发生延迟终止<sup>[30]</sup>。更重要的是, DNA 终止链的倒数第二个核苷酸可以减少 PPI-801 被 RT 切除的风险, 正因如此, 该类化合物可以对 NRTI 突变株产生好的抑制效果<sup>[5]</sup>。

**3.5.2 8-异丙基-氨基-2'-脱氧腺苷** 8iPrNdA 是近几年报道的核苷类似物, 不同于在核糖修饰的 NRTIs, 该化合物修饰在腺嘌呤的 8 位, 修饰后的化合物可能对拇指结构域 p66 亚基的  $\alpha$  螺旋产生立体位阻引起延迟性链终止。同 PPI-801 相似, 8iPrNdA 结合后在+1 位终止 DNA 链合成, 尽管 8iPrNdA 活性不是特别高, 但是在腺嘌呤的修饰而非核糖部分可以作为 NRTIs 优化的新方向<sup>[5]</sup>。

### 3.6 靶向聚合酶和核糖核酸酶 H (RNase H) 的双重抑制剂

二羟基苯甲酰基萘基脲 (DHBNH, **21**) (图 9) 具有抑制聚合酶和 RNase H 的活性, 其结合位点距离 RNase H 活性位点 >50 Å, 与 NNIBP 部分重叠。DHBNH 可以直接影响聚合酶“引物沟”和拇指结构域的位置来发挥抑制活性 (图 10)<sup>[31]</sup>。对 DHBNH 进一步修饰得到兼具聚合酶和 RNase H 抑制活性的化合物 **22** 和 **23**。*N*-(4-叔丁基苯酰基)-2-羟基-1-萘甲醛脲 (BBNH, **24**) 及其类似物 *N*-(4-叔丁基苯酰基)-2-羟基-1-萘甲醛水杨酰脲 (BBSH, **25**), 同样是靶向于 HIV-1RT 的抑制剂, 具有抑制 RNase H 和 DNA 聚合酶的活性, 研究发现, 两者还能降低逆转录酶二聚体的稳定性<sup>[32]</sup>。此外, 化合物 K-49 (**26**)、KNA-53 (**27**) 和 **28** 也被证实具有双位点抑制活性<sup>[33,34]</sup>。化合物 **28** 抑制 RDDP 和 RNase H 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 2 和

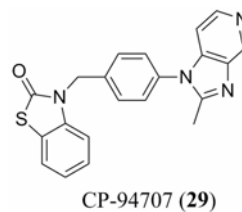


**Figure 10** The co-crystal complex of HIV-1 RT and DHBNH (**21**) (PDB code: 2I5J)

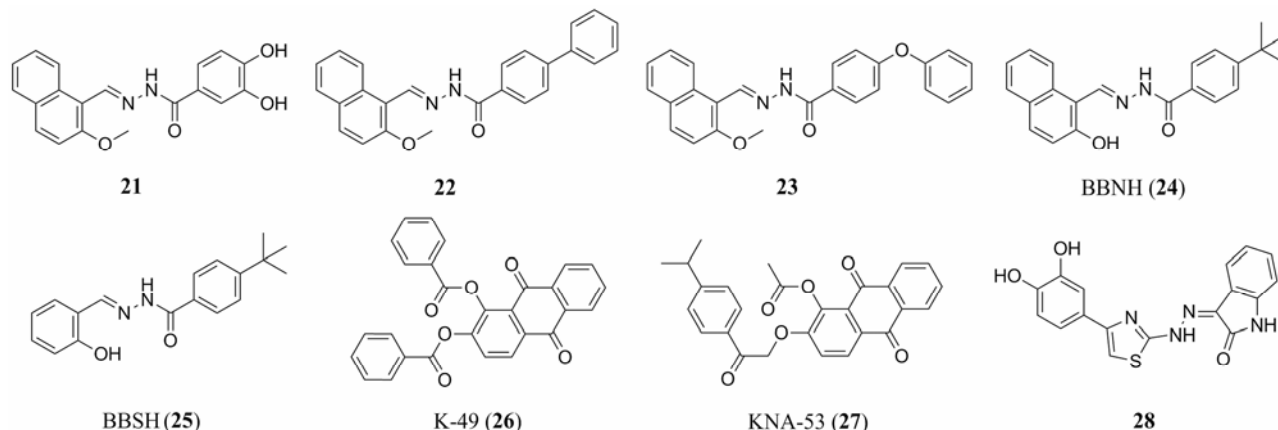
1.4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[35]</sup>。这种多种作用机制可以很好地降低抑制剂的耐药性, 也是今后抗艾滋病药物的研究方向之一。

### 3.7 逆转录起始过程抑制剂

逆转录起始于 tRNA 模板引物与 HIV-1 基因的特定位点结合。由于起始过程引物与模板都是 RNA, 该过程是逆转录的限速步骤, 因此该过程被认为是新的药物靶点。化合物 CP-94707 (图 11, **29**) 对野生型 RT 和 NNRTIs 常见的突变株 (Y181、Y188 和 K103) 都有抑制作用, 它结合于 RT 使其“引物沟”发生扭曲同时影响核苷酸进入速度发挥抑制作用<sup>[36]</sup>。具有 RNase H 抑制活性的 DHBNH (**21**) 也通过抑制逆转录的起始阶段发挥作用<sup>[31]</sup>。



**Figure 11** Chemical structure of CP-94707



**Figure 9** Chemical structures of dual inhibitors of the HIV-1 RT-associated DNA polymerase and RNase H

### 3.8 HIV-1 逆转录酶的二聚化抑制剂

HIV-1 RT 的二聚体结构对于其功能的发挥是必需的, p66 和 p51 亚基的结合部位发生变异会抑制酶的聚合, 从而降低催化活性。因此, 可以通过阻断蛋白间相互作用来抑制 RT 的功能<sup>[37]</sup>。目前已经证实一些小分子和肽类化合物具有抑制逆转录酶二聚化的活性, 这类抑制剂具有很好的专一性和较低的耐药性<sup>[38]</sup>。

**3.8.1 肽类抑制剂** RT 的二聚化过程及其晶体结构表明, p66 和 p51 亚基的主要连接亚结构域中富含色氨酸, 且有文献报道两个亚基连接区域的 389~407 位氨基酸残基形成的多肽可以在体外抑制 HIV RT<sup>[39]</sup>。Depollier 等<sup>[37]</sup>设计了一个与 395~404 位氨基酸残基相对应的十肽, 其通过多肽载体转导到 HIV-1 感染的细胞中, 表现出很高的抑制活性, 且没有毒副作用。此外, RT 二聚体的成熟过程也是一个肽类抑制剂的新靶点。Morris 等<sup>[35]</sup>合成了与 HIV-1 RT p51 亚基的拇指结构域中 284~300 位氨基酸残基相对应的小分子肽 (Pep-A), 其能够与 RT 二聚体结合, 在不影响二聚体稳定性的前提下, 干扰 RT 的成熟过程。该类小分子肽类抑制剂与 RT 连接结构域中对应区域的氨基酸序列相互作用, 而这些氨基酸残基对酶的二聚体的形成是必需的, 因此, 这些小分子肽类能够抑制酶的二聚化, 从而抑制酶的活性。肽类抑制剂不良反应小, 具有较好的研究前景。

**3.8.2 非肽类抑制剂** TSAO-T 衍生物 TSAO-T (叔丁基二甲基甲硅烷基螺氨基氧硫杂环己二烯-胸腺嘧啶, **30**) 衍生物代表了一类经典的 HIV-1 RT 抑制剂, 能特异性抑制 HIV-1 的复制, 对 HIV-2 无作用。TSAO-T 与 HIV-1 RT 的结合模式类似于中国古代“龙”的形象, 其晶体结构表明 (图 12), TSAO-T 结合进入 NNIBP 后使口袋过度膨胀并与大部分氨基酸产生相互作用, 引起 p51 亚基的  $\beta 7$ - $\beta 8$  loop 重排, 重排后很可能通过影响 p66/p51 二聚化过程产生抑制作用。过去几年, 人们合成了一系列新的 TSAO-T 类似物。其中 4-、5-和 6-取代嘧啶类似物的活性和选择性比未被取代的化合物高。在 4-或 5-取代的 1,2,3-三唑 TSAO 类似物中, 5 位被氨基、甲胺基或二甲胺基 (**31**) 取代的 1,2,3-三唑 TSAO 类似物具有很好的抑制 HIV-1 活性<sup>[40]</sup>。

**MAS0 衍生物** Botta 等<sup>[41, 42]</sup>运用虚拟筛选的方法发现了对聚合酶和 RNase H 都有抑制作用的化合物 MAS0, 显著抑制 p51 和 p66 亚基的聚合过程。模拟计算显示 (图 13), MAS0 的中心耦合环与 K395 和

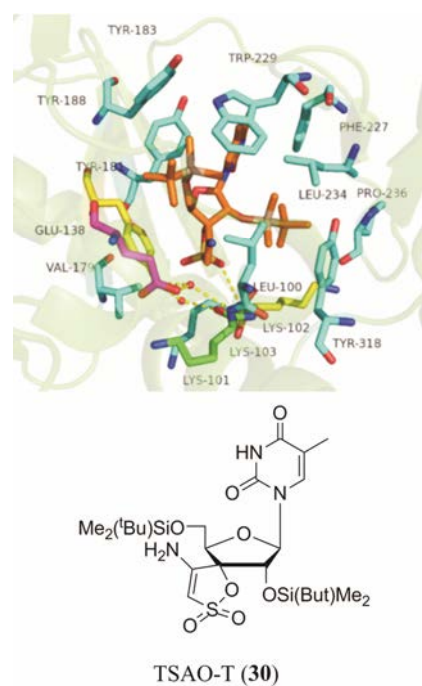


Figure 12 The crystal structure of TSAO-T (PDB code: 3QO9)

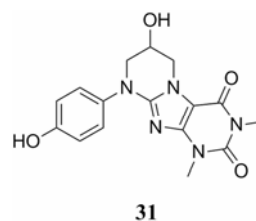


Figure 13 Chemical structure of MAS0

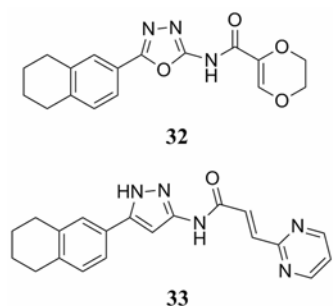
E399 产生极性相互作用; 苯酚结构能够与 W402 和 W410 产生  $\pi$ - $\pi$  堆积作用, 同时与 T409 形成氢键作用; 体外实验表明该化合物对二聚化的抑制具有剂量依赖性。对 MAS0 进一步优化筛选得到四氢嘧啶并 [2,1-f] 嘌呤二酮可以作为新骨架开发具有新机制及优良抗耐药性的 HIV-1 RT 抑制剂。

此外, 前文所述的具有 RNase H 和 DNA 聚合酶双重抑制活性的 BBNH (**24**) 和 BBSH (**25**) 也能通过降低 RT 二聚体的稳定性发挥抑制作用<sup>[32]</sup>。

目前, 二聚化抑制剂的研究正处于早期阶段, 但前景非常广阔。如 TSAO-T、MAS0, 可以作为先导物, 继续研究新型高效低毒的抗艾滋病药物。顺便指出的是, HIV-1 整合酶和蛋白酶均为二聚体, 抑制二聚体的形成也是抗艾滋病研究的新靶点。

### 3.9 新型双功能非核苷类逆转录酶抑制剂

Lai 等<sup>[43]</sup>报道了一系列同时作用于 NRTI 结合位点和 NNIBP 的非核苷类化合物。该类双功能小分子最初由 Merck 公司筛选化合物库发现, 其中化合物 **32** (图 14) 与 RT 的结合依赖于  $Mg^{2+}$ , 对常见的 NNRTI



**Figure 14** Chemical structures of bifunctional HIV-1 reverse transcriptase inhibitors

突变株 (K103N,  $IC_{50} = 2.5 \pm 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Y181C,  $IC_{50} = 0.79 \pm 0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和 K103N/Y181C,  $IC_{50} = 0.75 \pm 0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 表现出了相当或优于野生株 ( $IC_{50} = 8.5 \pm 1.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的活性, 而对于 rilpivirine 和 efavirenz 常见的三突变株 (G190A/Y181C/K103N,  $IC_{50} = 9.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 也表现出了与野生株相当的活性。对 **31** 进行深入的构效关系探讨发现了与 RT 作用无需依赖  $Mg^{2+}$  的化合物 **33**。X-射线晶体结构表明, **33** 能同时作用于催化活性位点的 D186, 高度保守的“引物沟”区域的 L234 和 W229 及 NNIBP 中的 Y188。该发现揭示了一类新型的抗耐药突变的 RT 双功能抑制剂, 为克服耐药性的药物研发提供了新的突破点。

### 3.10 其他新作用机制的 HIV-1 逆转录酶抑制剂

除上面所述的几种靶向于 HIV-1 RT 聚合酶功能域的抑制剂, 仍有许多新的结合位点亟待开发, 如“关节”位点、核苷酸进入结合位点、NNRTI 相邻位点等<sup>[44]</sup>。

“关节”位点位于 p66 手指和手掌亚结构域的连接位点, 毗邻聚合酶活性位点, 该位点中的氨基酸大部分属于保守型氨基酸, 不易发生突变<sup>[44]</sup>; 核苷酸进入结合位点也位于聚合酶活性位点附近, 由高度保守性氨基酸 Y115、F116 和 E151 组成, 不易发生突变, 而且, 小分子抑制剂与口袋结合后直接干扰 dNTP 的结合, 这两者优点赋予了该位点抑制剂研发以重要意义<sup>[44]</sup>; NNRTI 相邻位点位于 p66/p51 交界处, 小分子抑制剂通过与口袋周围的氨基酸形成氢键相互作用扭曲 YMDD 基序的结构发挥抑制作用。值得一提的是, 该口袋与 NNIBP 距离较近, 可以用来设计包含 NNRTI 疏水口袋及相邻位点的双位点抑制剂, 以达到提高亲和力及改善耐药性的目的<sup>[44]</sup>。

此外, 从天然药物及海洋药物中分离得到的具有抗 HIV-1 RT 活性的化学成分 (例如 calanolide A 及其结构类似物、polycitone A 抑制剂、HPH 类抑制剂、

PAT 类抑制剂) 的药物也有发展, 这些天然成分具有专属性强、不良反应少、方便有效等优点<sup>[45–47]</sup>, 因此, 从药用植物与海洋生物等天然药物中寻找抗 HIV-1 RT 活性成分的研究受到越来越多的重视, 现已成为抗 HIV-1 药物研究的新方向之一。

## 4 结语

多年来, RT 因其在 HIV-1 复制过程中的重要作用被科学家广泛关注。目前研究较为成熟的 NRTI 和 NNRTI 已有多个抑制剂上市, 但这两类抑制剂存在的一系列不良反应使得发现具有新型作用机制的抑制剂迫在眉睫。对新机制抑制剂的研究, 将为 RT 抑制剂的研发提供新的思路: 研究者要不断探索 RT 的新结合位点, 更深入、更全面地了解 RT 的功能。针对这些结合位点, 运用计算机辅助药物设计技术和药物化学新策略, 开展先导化合物的发现与优化, 为抗艾滋病药物的发现提供物质基础。

## References

- [1] Liu H, Zhan P, Liu XY. Research progress of dual inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase and integrase [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 466–476.
- [2] London RE. Structural maturation of HIV-1 reverse transcriptase – a metamorphic solution to genomic instability [J]. Viruses, 2016, 8: 260–294.
- [3] Sarafianos SG, Clark AD, Das K, et al. Structures of HIV-1 reverse transcriptase with pre- and post-translocation AZTMP-terminated DNA [J]. EMBO J, 2002, 21: 6614–6624.
- [4] Sarafianos SG, Das K, Hughes SH, et al. Taking aim at a moving target: designing drugs to inhibit drug-resistant HIV-1 reverse transcriptases [J]. Curr Opin Struct Biol, 2004, 14: 716–730.
- [5] Esposito F, Corona A, Tramontano E. HIV-1 reverse transcriptase still remains a new drug target: structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions [J]. Mol Biol Int, 2012, 2012: 586401.
- [6] Sarafianos SG, Clark AD Jr, Tuske S, et al. Trapping HIV-1 reverse transcriptase before and after translocation on DNA [J]. J Biol Chem, 2003, 278: 16280–16288.
- [7] Zhang XQ. The newest developments of the study on anti-HIV drugs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2015, 50: 509–515.
- [8] Wang L, Zhan P, Liu XY. The application of structural optimization strategies in drug design of HIV NNRTIs [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2012, 47: 1409–1422.
- [9] James CA, Deroy P, Duplessis M, et al. Nucleotide competing reverse transcriptase inhibitors: discovery of a series of non-

- basic benzofurano[3,2-d]pyrimidin-2-one derived inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 2781–2786.
- [10] Geitmann M, Unge T, Danielson UH. Biosensor-based kinetic characterization of the interaction between HIV-1 reverse transcriptase and non-nucleoside inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 2367–2374.
- [11] Maga G, Radi M, Gerard MA, et al. HIV-1 RT inhibitors with a novel mechanism of action: NNRTIs that compete with the nucleotide substrate [J]. *Viruses*, 2010, 2: 880–899.
- [12] Kang D, Song Y, Chen W, et al. “Old Dogs with New Tricks”: exploiting alternative mechanisms of action and new drug design strategies for clinically validated HIV targets [J]. *Mol Biosyst*, 2014, 10: 1998–2022.
- [13] Marcelin AG, Delaugerre C, Wirden M, et al. Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure [J]. *J Med Virol*, 2004, 72: 162–165.
- [14] Menéndez-Arias L. Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases [J]. *Viruses*, 2009, 1: 1137–1165.
- [15] Elinder M, Nordström H, Geitmann M, et al. Screening for NNRTIs with slow dissociation and high affinity for a panel of HIV-1 RT variants [J]. *J Biomol Screen*, 2009, 14: 395–403.
- [16] Ludovici DW, De Corte BL, Kukla MJ, et al. Evolution of anti-HIV drug candidates. Part 3: diarylpyrimidine (DAPY) analogues [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2235–2239.
- [17] deBéthune MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989–2009) [J]. *Antiviral Res*, 2010, 85: 75–90.
- [18] Katlama C, Haubrich R, Lalezari J, et al. Efficacy and safety of etravirine in treatment-experienced, HIV-1 patients: pooled 48 week analysis of two randomized, controlled trials [J]. *AIDS*, 2009, 23: 2289–2300.
- [19] Vingerhoets J, Buelens A, Peeters M, et al. Impact of baseline NNRTI mutations on the virological response to TMC125 in the phase III clinical trials DUET-1 and DUET-2 [J]. *Antivir Ther*, 2007, 12: 534.
- [20] Johnson VA, Brun-Vézinet F, Clotet B, et al. Update of the drug resistance mutations in HIV-1: 2007 [J]. *Top HIV Med*, 2007, 15: 119–125.
- [21] Freisz S, Bec G, Radi M, et al. Crystal structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to a non-nucleoside inhibitor with a novel mechanism of action [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49: 1805–1808.
- [22] Bellucci L, Angeli L, Tafi A, et al. Unconventional plasticity of HIV-1 reverse transcriptase: how inhibitors could open a connection “gate” between allosteric and catalytic sites [J]. *J Chem Inf Model*, 2013, 53: 3117–3122.
- [23] El SY, Paillart JC, Laumond G, et al. 5-Modified-2'-dU and 2'-dC as mutagenic anti HIV-1 proliferation agents: synthesis and activity [J]. *J Med Chem*, 2010, 53: 1534–1545.
- [24] Harris KS, Brabant W, Styrchak S, et al. KP-1212/1461, a nucleoside designed for the treatment of HIV by viral mutagenesis [J]. *Antiviral Res*, 2005, 67: 1–9.
- [25] Dapp MJ, Clouser CL, Patterson S, et al. 5-Azacytidine can induce lethal mutagenesis in human immunodeficiency virus type 1 [J]. *J Virol*, 2009, 83: 11950–11958.
- [26] Wang LZ, Kenyon GL, Johnson KA. Novel mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by a new non-nucleoside analog, KM-1 [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 38424–38432.
- [27] Yamazaki S, Tan L, Mayer G, et al. Aptamer displacement identifies alternative small-molecule target sites that escape viral resistance [J]. *Chem Biol*, 2007, 14: 804–812.
- [28] Herschhorn A, Oz-Gleenberg I, Hizi A. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by the novel broad-range DNA polymerase inhibitor *N*-[2-[4-(aminosulfonyl)phenyl]ethyl]-2-(2-thienyl)acetamide [J]. *Biochemistry*, 2008, 47: 490–502.
- [29] Salie ZL, Kirby KA, Michailidis E, et al. Structural basis of HIV inhibition by translocation-defective RT inhibitor 4'-ethynyl-2-fluoro-2'-deoxyadenosine (EFdA) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113: 9274–9279.
- [30] Cihlar T, Ray AS. Nucleoside and nucleotide HIV reverse transcriptase inhibitors: 25 years after zidovudine [J]. *Antiviral Res*, 2010, 85: 39–58.
- [31] Himmel DM, Sarafianos SG, Dharmasena S, et al. HIV-1 reverse transcriptase structure with RNase H inhibitor dihydroxy benzoyl naphthylhydrazone bound at a novel site [J]. *ACS Chem Biol*, 2011, 1: 702–712.
- [32] Sluis-Cremer N, Arion D, Parniak MA. Destabilization of the HIV-1 reverse transcriptase dimer upon interaction with *N*-acyl hydrazoneinhibitors [J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62: 398–405.
- [33] Esposito F, Kharlamova T, Distinto S, et al. Alizarine derivatives as new dual inhibitors of the HIV-1 reverse transcriptase-associated DNA polymerase and RNase H activities effective also on the RNase H activity of non-nucleoside resistant reverse transcriptases [J]. *FEBS J*, 2011, 278: 1444–1457.
- [34] Distinto S, Esposito F, Kirchmair J, et al. Identification of HIV-1 reverse transcriptase dual inhibitors by a combined

- shape-, 2D-fingerprint- and pharmacophore-based virtual screening approach [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 50: 216–229.
- [35] Morris MC, Berducou C, Mery J, et al. The thumb domain of the P51-subunit is essential for activation of HIV reverse transcriptase [J]. *Biochemistry*, 1999, 38: 15097–15103.
- [36] Pata JD, Stirtan WG, Goldstein SW, et al. Structure of HIV-1 reverse transcriptase bound to an inhibitor active against mutant reverse transcriptases resistant to other nonnucleoside inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 10548–10553.
- [37] Depollier J, Hourdou ML, Aldrian-Herrada G, et al. Insight into the mechanism of a peptide inhibitor of HIV reverse transcriptase dimerization [J]. *Biochemistry*, 2005, 44: 1909–1918.
- [38] Burke J. The amino acid Asn136 in HIV-1 reverse transcriptase (RT) maintains efficient association of both RT subunits and enables the rational design of novel RT inhibitors [J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68: 49–60.
- [39] Divita G, Restle T, Goody RS, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase dimerization using synthetic peptides derived from the connection domain [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 13080–13083.
- [40] Das K, Bauman JD, Rim AS, et al. Crystal structure of *tert*-butyldimethylsilyl-spiroaminooxathioledioxide-thymine (TSAO-T) in complex with HIV-1 reverse transcriptase (RT) redefines the elastic limits of the non-nucleoside inhibitor-binding pocket [J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 2727–2737.
- [41] Tintori C, Corona A, Esposito F, et al. Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase dimerization by small molecules [J]. *ChemBioChem*, 2016, 17: 683–688.
- [42] Grohmann D, Corradi V, Elbasyouny M, et al. Small molecule inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase dimerization [J]. *ChemBioChem*, 2008, 9: 916–922.
- [43] Lai MT, Tawa P, Auger A, et al. Identification of novel bifunctional HIV-1 reverse transcriptase inhibitors [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73: 109–117.
- [44] Bauman JD, Patel D, Dharia C, et al. Detecting allosteric sites of HIV-1 reverse transcriptase by X-ray crystallographic fragment screening [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 2738–2746.
- [45] Fang YU, Liu XY. The structure and functions of HIV-1 polymerase and the development of its inhibitors [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2006, 16: 380–386.
- [46] Yang Y, Cao YL, Liu HY, et al. Shizukaol F: a new structural type inhibitor of HIV-1 reverse transcriptase RNase H [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2012, 47: 1011–1016.
- [47] Peng ZG, Chen HS, Wang L, et al. Anti-HIV activities of HIV-1 reverse transcriptase inhibitor racemic 11-demethylcalanolide A [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 456–460.