

化学合成类 HIV 整合酶和核糖核酸酶 H 双靶点抑制剂的研究进展

康家雄^{1,2}, 朱江², 李爱秀^{1,3*}, 靳玉瑞¹

(1. 中国人民武装警察部队武警后勤学院基础部药物设计实验室, 天津 300309; 2. 中国人民武装警察部队武警后勤学院卫生勤务系, 天津 300309; 3. 天津市职业与环境危害防制重点实验室, 天津 300309)

摘要: 尽管已有 31 种上市的单靶点抗 HIV 药物和高效抗逆转录病毒疗法用于 AIDS 的临床治疗, 但寻找安全高效的新型抗 HIV 药物仍是全世界面临的一项严峻挑战。单组分多靶点药物具有降低耐药的可能性、简化给药剂量及提高患者服药顺从性等优点, 现已成为抗 HIV 药物研发领域的热点。HIV 整合酶 (IN) 和核糖核酸酶 H (RNase H) 均为病毒复制过程中的关键酶, 是药物开发的重要靶标。近年来, 通过合理药物设计和筛选途径, 发现了多种结构类型的 HIV IN 和 RNase H (IN/RNase H) 双靶点抑制剂。本文主要对化学合成类 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂的研究进展进行介绍, 以望对多靶点抗 HIV 药物的研发有所启示。

关键词: 人类免疫缺陷病毒; 整合酶; 核糖核酸酶 H; 双靶点抑制剂

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)08-1392-10

Advances in chemical synthesis of dual inhibitors of HIV integrase and ribonuclease H

KANG Jia-xiong^{1,2}, ZHU Jiang², LI Ai-xiu^{1,3*}, JIN Yu-rui¹

(1. Drug Design Laboratory of the Basic Courses Department, Logistics University of PAP, Tianjin 300309, China;

2. Department of Health Service, Logistics University of PAP, Tianjin 300309, China;

3. Tianjin Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300309, China)

Abstract: Antiretroviral therapy has been used for treating AIDS with 31 single-target anti-HIV drugs currently on market. Searching for safe and effective of novel anti-HIV drugs remains a challenge worldwide. Multi-targets single-structure compounds referred to as designed multiple ligands (DMLs) have become a hot topic of producing anti-HIV drugs recently due to reduction in the likelihood of drug resistance, simplified dosing and improved patient adherence. Integrase (IN) and ribonuclease H (RNase H) are two indispensable enzymes in HIV replication, therefore are two important targets for developing anti-HIV drugs. Recently, diverse dual inhibitors of HIV IN and RNase H (IN/RNase H) have been developed *via* rational drug design and screening. This review summarizes the advances in chemically synthesized dual inhibitors of HIV IN/RNase H to provide the information for developing multi-targets anti-HIV drugs.

Key words: human immunodeficiency virus; integrase; ribonuclease H; dual inhibitors

人类免疫缺陷病毒 (HIV) 感染引起的艾滋病

(AIDS) 仍是严重威胁人类健康和社会安全稳定的致命性传染病。目前 AIDS 尚不能根治, 药物治疗是临床抗 AIDS 的主要手段, 现已有 6 大类 31 种上市的单靶点抗 HIV 药物可供选择, 包括 10 种蛋白酶抑制剂 (PIs)、9 种核苷类逆转录酶抑制剂 (NRTIs)、5 种非核苷类逆转录酶抑制剂 (NNRTIs)、4 种整合酶链转移抑制剂 (INSTIs)、2 种融合抑制剂 (FIs) 和 1 种 CCR5 受体拮

收稿日期: 2019-04-22; 修回日期: 2019-05-22.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81241114, 30472166); 天津市科技攻关计划重点科技攻关专项基金资助项目 (06YFGZSH07000); 武警后勤学院研究生创新课题 (WHYC201605); 武警后勤学院科研创新团队。

*通讯作者 Tel: 86-22-84876331, E-mail: liaixiu2006@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0295

抗剂 (CRIs)^[1-3]。然而, HIV 的高度变异性使单靶点药物的疗效不理想, 目前临床上治疗 AIDS 所使用的高效抗逆转录病毒疗法已将 AIDS 转化成一种慢性可控疾病, 但存在需终生用药、治疗费用高、服药依从性差、不良反应大及交叉耐药等缺点^[4]。因此, 运用新的药物设计思想研发增强疗效、改善安全性且经济适用的新型抗 HIV 药物仍具有重大意义。

HIV 核糖核酸酶 H (ribonuclease H, RNase H) 和整合酶 (integrase, IN) 同属于核苷酸转移酶, RNase H 和 IN 催化核心区域的三维结构研究表明, 二者具有极其相似的折叠方式和活性位点的几何构象, 且两个酶活性中心均包含保持酶催化活性所必需的双二价金属离子, 功能上先后催化降解病毒 DNA 合成时 RNA/DNA 杂合链中的 RNA 和将合成的双链 DNA 整合到宿主细胞 DNA 中, 均为病毒生命周期中的关键酶, 故 RNase H 和 IN 一直是抗 HIV 药物研发的重要靶标^[5]。RNase H 作为逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 上具有独立酶催化功能的结构域, 目前无 RNase H 抑制剂 (RNase H inhibitors, RNHIs) 上市, 且在此区域尚未发现临床上出现的主要耐药 HIV 突变体^[6], 因此开发 RNHIs 可为临床抗 AIDS 提供新的选择方案。由于在人体内无 HIV IN 的功能类似物, 以其为靶标开发低毒高效的抗 HIV 药物一直是被关注的热点, 目前第一代 INSTIs 雷格特韦 (raltegravir, RAL)、埃替格韦 (elvitegravir, EVG) 和第二代的多替格韦 (dolutegravir, DTG)、比特拉韦 (bictegravir, BIC) 已被 FDA 批准上市。然而, HIV 的高度变异性使其极易对单靶点 RNHIs 和 INSTIs 产生耐药性, 导致药物的疗效降低或无效。

随着系统生物学及网络药理学的发展, 人们逐渐认识到, 同时作用于同一疾病多个靶点的单组分多靶点药物相比单靶点药物在功能失调类疾病的治疗过程中优势明显^[4,5]。单组分多靶点药物在设计时需均衡对不同靶标的生物活性, 以便在体内相同血浆 (或脑组织) 浓度下, 对每个靶点的作用能调节到合适的强度, 从而提供较好的疗效和较低的不良反应用^[7]。通常作用于不同靶点的药效团高度兼容, 药效学和药动学性质好, 相对分子质量小, 结构简单且活性均衡度好的单一化学实体分子是人们寻找的理想单组分多靶点药物^[7]。在抗 HIV 药物研究领域, 相比于单靶点 RNHIs 和 INSTIs, 基于 IN 和 RNase H 的家族同源性、结构相似性、功能连续性以及双二价金属离子介导的酶催化机制, 开发 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂具有提高药物的抗耐药性, 延缓病毒耐药的速度的, 减少服药剂量, 提高患者的依从性以及减轻患者经济负担等优点。近

年来, 人们通过合理药物设计和筛选途径已发现了多种结构类型的 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂。本文重点对化学合成类 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂的研究进展作简要介绍。

1 HIV IN 和 RNase H 的结构与功能

1.1 HIV IN 的结构与功能

HIV IN 是由病毒 pol 基因编码的分子质量为 32 kDa 的蛋白质, 包含 288 个氨基酸残基, 其结构分为 N-端结构域 (N-terminal domain, NTD)、催化核心区域 (catalytic core domain, CCD) 及 C-端结构域 (C-terminal domain, CTD)^[8]。其中, NTD 横跨第 1~49 位氨基酸残基, 包含 4 个 α 螺旋, 该区域包含保守的锌指结构基序, 在功能上能稳定蛋白质的折叠构象并参与 IN 的多聚化; CCD 横跨第 50~212 位氨基酸残基, 包含 6 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠, α 螺旋非对称地分布于 β 折叠的两侧, 该区域包含酸性氨基酸残基 Asp64、Asp116 和 Glu152 组成的保守 DDE 基序, 经与保持酶催化活性所必需的 2 个 Mg^{2+} 发生配位进而发挥活性; CTD 横跨第 213~288 位氨基酸残基, 具有完整的 SH3 折叠, 该区域保守性最低, 在功能上参与病毒和宿主 DNA 的结合^[8]。

HIV IN 以多聚体形式催化前病毒 DNA 整合到宿主细胞的 DNA 中, 其整合过程分为 3'-加工 (3'-processing, 3'-P) 和链转移 (strand transfer, ST) 阶段^[4]。3'-P 阶段在胞浆内完成, IN 以二聚体形式结合并水解切割掉病毒 DNA 3'-末端的 2 个核苷酸 GT, 产生 3'-CA_{OH} 末端; ST 阶段在细胞核内完成, IN 以四聚体形式结合并切割宿主细胞 DNA 的 5'-末端, 产生间隔 5 个碱基的交错切口, 继而与病毒 DNA 的 3'-CA_{OH} 末端形成新的磷酸二酯键, 从而将病毒 DNA 整合到宿主细胞的 DNA 中, 因此抑制整合过程的 3'-P 或 ST 能发挥抗 IN 活性^[4,8]。

1.2 HIV RNase H 的结构与功能

HIV RT 是由 p66 和 p51 亚基组成的不对称异源二聚体酶^[9]。在结构上, p66 亚基包括聚合酶活性位点和 RNase H 区域, 其中聚合酶活性位点位于 p66 亚基的 N 端区域 (占据 2/3), 形状类似于人的右手, 分为手指、手掌、拇指及连接域, 而 RNase H 区域位于 p66 亚基的 C 端区域 (占据 1/3)^[9]。尽管 p51 亚基与 p66 亚基的前 440 个氨基酸残基序列相同, 但 p51 亚基由于缺乏 RNase H 区域而无催化活性, 主要发挥稳定 p66 亚基结构的作用。

RNase H 区域横跨第 427~560 位氨基酸残基, 距聚合酶活性位点约 60Å, 包含 4 个 α 螺旋和 5 个 β 折叠, α 螺旋非对称地分布在 β 折叠的两侧^[10]。RNase H 的活性位点包含由酸性氨基酸残基 Asp443、Glu478、

Asp498、Asp549组成的保守 DEDD 基序, 该基序通过与 2 个 Mn^{2+} 发生配位进而发挥催化活性^[10]。在功能上, RNase H 通过对磷酸酯键进行亲核取代, 催化 RNA/DNA 杂合链中 RNA 的选择性水解, 在 HIV 的复制中发挥重要作用^[10]。

2 化学合成类 HIV IN 和 RNase H 双靶点抑制剂

Morphy 等^[11]阐述了单组分多靶点药物的设计思想, 即具有活性相关的多个药效团的单一化学实体分子能同时作用于同一疾病多个靶点或单一靶点的多个结构域。根据药效团重叠程度的不同, 单组分多靶点药物一般分为药效团连接型、融合型和并合型^[5]。药效团连接型多靶点药物是通过可裂解或不可裂解的连接基将不同的作用片段连接而成, 但大多存在结构较为复杂, 分子量较大, 药动学性质较差及结构修饰困难等缺点; 药效团融合型和并合型多靶点药物是充分利用分子结构的相似性, 将相似的结构片段整合到同一分子中, 因此能克服上述缺点, 在多靶点药物的研发领域体现出更为明显的优势^[5,11]。

目前发现融合型或并合型 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂的主要途径有两种: 一种是通过定向筛选获得具有双重活性的苗头化合物, 继而对其进行结构衍生化, 以发现均衡抑制活性更好的化合物; 另一种是通过结构的合理设计得到。

2.1 基于定向筛选及结构衍生化途径发现的 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂

2.1.1 Madurahydroxylactone (MHL) 衍生物类

MHL (**1**) 属于苯并[a]萘并萘醌类抗生素家族, 是土壤

细菌 *Nonomuraea rubra* 的次级代谢产物^[12]。鉴于 MHL 具有广谱生物活性, Marchand 等^[12]对 MHL 进行结构修饰及高通量筛选, 得到了 3 种系列 MHL 衍生物类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图 1), 发现其抗 RNase H 活性的 IC_{50} 值在 $0.3 \sim 22.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间, 但对 IN 的抑制活性差异较大。MHL 的五元羟基内酯环被替换为哒嗪酮的第一系列衍生物抗 RNase H 活性在微摩尔水平; 哒嗪酮上苯基取代的衍生物 **2** 抗 IN 活性最强, 而为其他取代基团的衍生物抗 IN 活性下降。MHL 的五元羟基内酯环分别被替换为羧基和五元内酰胺环与其他杂环, 得到了以 **3** 和 **4** 为代表的其余两类衍生物, 这两个系列衍生物抗 IN 活性几乎无明显规律可循。此研究表明, MHL 可作为开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的基本母核, 同时也证实了结构衍生化和高通量筛选在多靶点抗 HIV 药物发现中的可行性。

2.1.2 羟基托酚酮类化合物

Budihis 等^[13]通过高通量筛选发现羟基托酚酮类化合物 **5** 和 **6** 属于选择性 HIV RNHIs, Chung 等^[14]报道化合物 **5** 的衍生物 **7** 也具有抗 RNase H 活性。Semenova 等^[15]发现此类化合物对 IN 的 ST (INST) 阶段的抑制活性高于 3'-P (IN3'-P), 并能与二价金属离子发生配位, 但对 Mg^{2+} 配位的选择性强于 Mn^{2+} 。

Diderjean 等^[16]对 2,3,7-三羟基托酚酮 (**8**) 进行结构修饰得到了一系列新类型衍生物 (图 2), 其对 HIV 的聚合酶、RNase H、IN3'-P 以及 INST 具有不同程度的抑制活性。C-4 位以及 C-4/C-6 位结构修饰的衍生物 **9** 和 **10** 对聚合酶、RNase H、IN3'-P 和 INST 的抑制活性

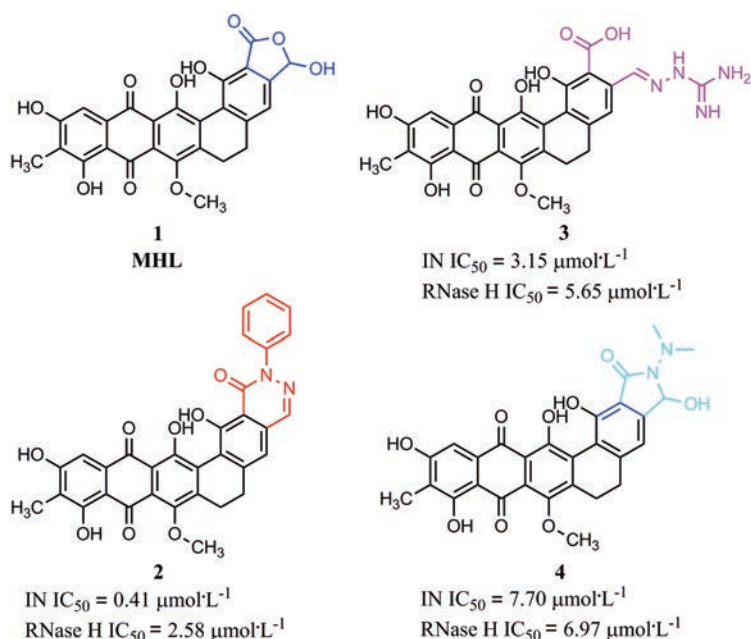


Figure 1 Structures and activities of madurahydroxylactone (MHL) derivatives

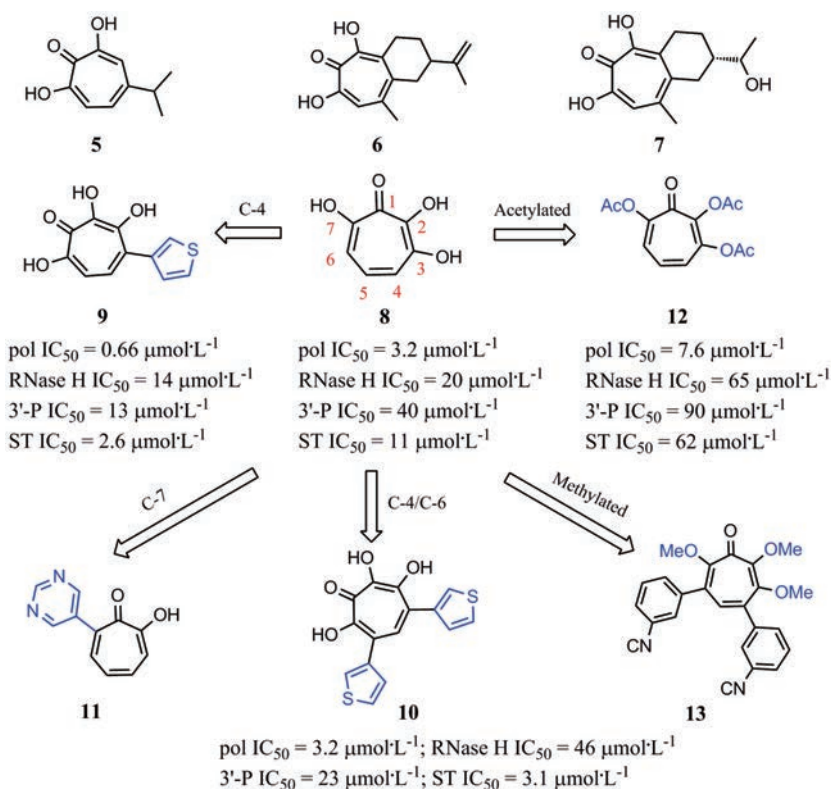


Figure 2 Structures and activities of hydroxylated tropolones

与化合物 **8** 相当或略强, 且优于其他结构修饰类型。相比于化合物 **8**, 羟基的乙酰化衍生物 **12** 对聚合酶、RNase H、IN3'-P 和 INST 的抑制活性下降显著, 而 C-7 位衍生物 **11** 和羟基的甲基化衍生物 **13** 失去抑制活性, 表明母核羟基是此类化合物发挥活性的药效特征基团。虽然羟基托酚酮类化合物对聚合酶、RNase H、IN3'-P 和 INST 具有较好的抑制活性, 但细胞水平测试发现该类化合物具有细胞毒性, 这导致其进一步的开发和利用受到限制。

2.1.3 2-羟基异喹啉-1,3-二酮衍生物类 2-羟基异喹啉-1,3-二酮 (**14**) 属于 IN/RNase H 双靶点抑制剂^[17]。此类化合物中 *N*-羟基环二酰亚胺片段的 3 个氧原子与 IN 和 RNase H 的 2 个二价金属离子都具有最佳的配位距离, 使其对这两个酶均表现出抑制活性。Billamboz 等^[18-22]通过对先导化合物 **14** 的结构修饰及定向筛选, 得到了 3 种系列衍生物 (图 3)。

对 **14** 的 C-4 位进行结构修饰得到第一系列衍生物, 不同取代基对 IN 和 RNase H 抑制活性的影响较大, 烷基、芳烷基取代产物抗 IN 和 RNase H 活性大幅度下降, 但取代苯甲酰胺衍生物 (如 **15a**) 活性有明显提高, 而甲酸甲酯衍生物 **15b** 抗 RNase H 活性达 0.061 μmol·L⁻¹, 对 IN 抑制活性也比 **14** 略高, 且细胞水平的抗 HIV 活性显著 (EC₅₀=13.44 μmol·L⁻¹)。

在 **14** 的 C-6 位引入取代苯基或联苯甲基得到第二系列衍生物, 其抗 RNase H 活性增强, 不同取代基对 IN 抑制活性的影响较大, 氯、环丙基、磺酰胺基等取代产物活性略有提高, 其中 4-磺酰胺联苯甲基衍生物 **16b** 对 RNase H 和 IN 抑制活性最好, IC₅₀ 值分别为 0.4 和 3.6 μmol·L⁻¹。

对 **14** 的 C-7 位进行衍生化得到第三系列衍生物, 此类化合物的 IN 抑制活性变化趋势与前两个系列基本一致, 卤素、取代苯基、酰胺等取代产物活性增强, 其中苯乙酰氨基衍生物 **17b** 活性达到了 0.09 μmol·L⁻¹, 但 RNase H 抑制活性明显下降。

上述研究表明, 2-羟基异喹啉-1,3-二酮是开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的重要结构骨架, 但由于此类化合物的细胞毒性较大, 在今后研究需对其进行结构优化以降低细胞毒性。

2.1.4 3-羟基嘧啶-2,4-二酮类化合物 3-羟基嘧啶-2,4-二酮 (**18**) 作为开发抗 HIV 药物的重要结构母核, 由于能特异性地与包含 2 个二价金属离子的酶活性中心结合, 使其衍生物具有抗 IN 和 RNase H 双重活性的潜力^[23]。Tang 等^[24,25]以 **18** 为结构母核, 开发了 3-羟基嘧啶-2,4-二酮类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图 4)。

对 **18** 的 C-6 位进行结构衍生化, 得到的第一系列衍生物抗 RNase H 活性基本相当, 在微摩尔水平

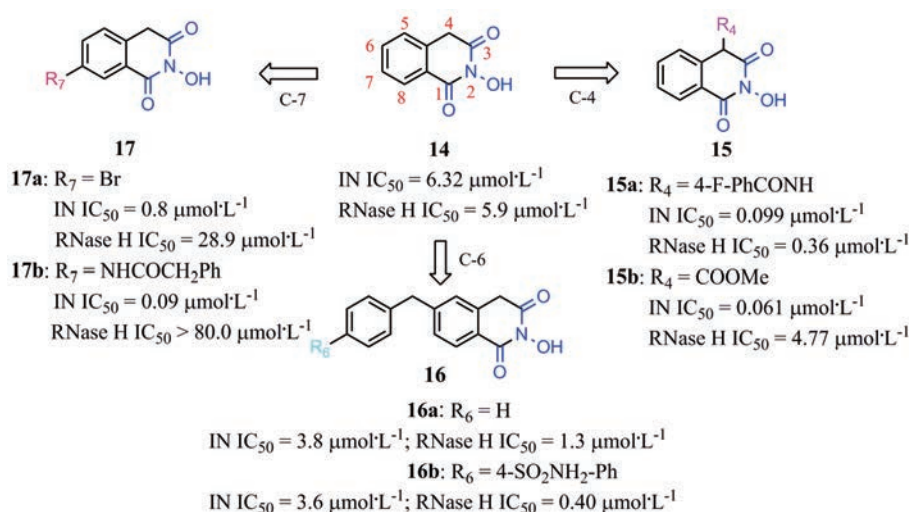


Figure 3 Structures and activities of 2-hydroxyisoquinoline-1,3-(2H,4H)-diones

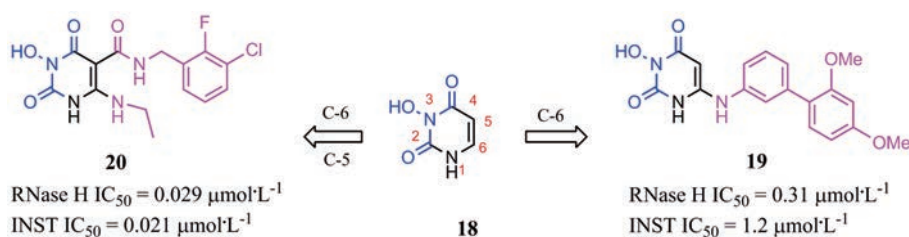


Figure 4 Structures and activities of 3-hydroxypyrimidine-2,4-diones

($IC_{50}=0.19\sim 2.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但对 IN 抑制活性在亚微摩尔水平, 且不同取代基对 IN 抑制活性的影响较为显著, 其中 2,4-二甲氧基取代产物 **19** 活性最好 ($IC_{50}=1.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

在 **18** 的 C-5 位和 C-6 位分别引入 *N*-苄基甲酰胺和烷氨基得到第二系列衍生物, 其对 RNase H 和 INST 的抑制活性均在低纳摩尔水平。在 C-5 位苯环上引入氟、氯、甲基等取代基可略微增强衍生物的抗 RNase H 活性, 但其对 INST 的抑制活性存在差异, 其中 2-氟-3-氯取代产物 **20** 抗 RNase H 和 INST 活性高, IC_{50} 值分别为 0.029 和 0.021 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且对两个靶点的均衡活性较好。此类衍生物抗 INST 活性高于 RAL, 与 DTG 相当, 对 RAL 耐药突变体 Y143C、N155H、G140S/Q148H 及 G140S/Y143H/Q148H 的抑制活性与 DTG 相似, 而且相比 RAL 和 DTG 无抗 RNase H 活性, 他的 RNase H 抑制活性十分显著。

总之, 3-羟基嘧啶-2,4-二酮可作为开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的结构母核, 由于此类化合物结构简单, 易化学合成, 理化性质好, 无细胞毒性, 安全性较好, 具有广阔的研究前景, 特别是化合物 **20** 进一步研究的潜力最大。

2.1.5 二酮酸类化合物 二酮酸 (diketo acid, DKA)

类化合物是经典的 HIV INSTIs, 能与金属离子配位的 DKA 基团和与其相连的疏水芳香基团是此类化合物的药效特征基团^[5]。近年来, 人们还发现 DKA 类化合物具有抗 RNase H 活性, 其中部分化合物对 IN 和 RNase H 显示出双重抑制活性。

吡咯基二酮酸类化合物 6-[1-(4-氟苯基)甲基-1*H*-吡咯-2-基]-2,4-二氧-5-己烯酸乙酯 (RDS1643, **21**) 属于选择性 HIV RNHIs, 对 INST 的抑制活性较弱^[26]。Costi 等^[27]用氟、氯、甲基、甲氧基、氰基等替换 RDS1643 中 4-氟苯基的氟原子, 得到了以 **22** 为代表的系列衍生物 (图 5)。该系列大部分化合物抗 INST 活性在低纳摩尔水平, 但 RNase H 抑制活性略低在微摩尔水平, 细胞水平的抗 HIV 活性在 0.2~26.3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且选择性指数很高。在此基础上, Cuzzucoli 等^[28]以 RDS1643 为先导物进行了构效关系探索, 发现新衍生物酶水平的 IN 和 RNase H 抑制活性及细胞水平的抗 HIV 活性的变化规律与 Costi 等^[27]研究结果基本一致。值得一提的是, RDS1643 的 N-1 位苯基取代衍生物 **23** 对 INST 和 RNase H 的均衡抑制活性最好, IC_{50} 值分别为 1.2 和 1.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 进一步研究的潜力较大。总之, 吡咯基二酮酸可作为开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的结构骨架, 具有广阔的研究前景。目前通过结构优化以提

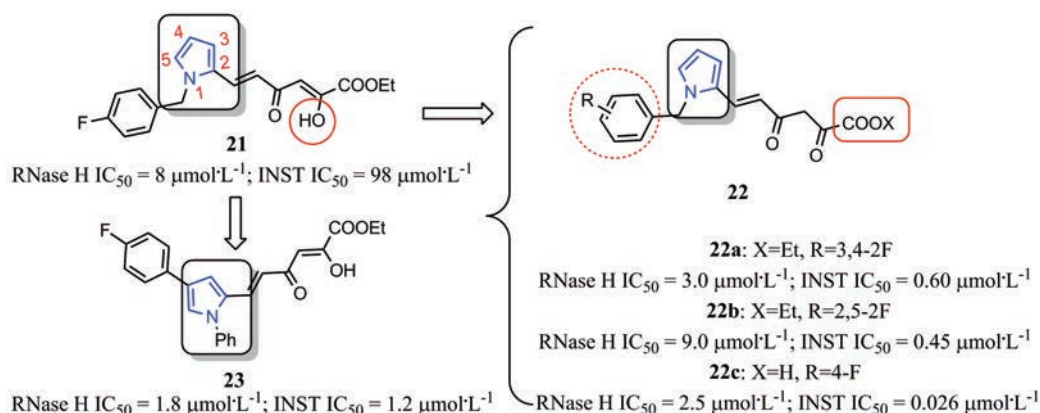


Figure 5 Structures and activities of pyrrolyl diketo acid derivatives

高抗 RNase H 活性的研究正在进行中。

喹诺酮基二酮酸类化合物 喹诺酮基二酮酸类化合物作为选择性 HIV INSTIs 较早就引起了人们的关注, 代表性化合物 **24** 抑酶活性达到了 $28 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[29,30]。根据 IN 和 RNase H 催化位点的结构相似性, Costi 等^[31]通过对先导物 **24** 的衍生化及定向筛选, 发现了喹诺酮基二酮酸类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图 6)。此类衍生物酶水平的 INST 抑制活性在低纳摩尔水平, 而 RNase H 活性略低在微摩尔水平。在此基础上, Pescatori 等^[32]移除衍生物 **25a** 的 C-7 位 4-乙酰哌嗪基, 在其 N-1 位引入取代苄基、烷基或杂环芳烷基, 进行了新的探索。发现结构修饰结果并不令人满意, 新的衍生物 INST 抑制活性水平与前述相当, 但抗 RNase H 活性显著下降甚至完全消失, 其中 **26** 为最好的衍生物, 表明 C-7 位应保持引入的含氮碱性基团。此系列部分衍生物抗 INST 活性与 RAL 和 EVG 相当, 且对 RNase H 抑制活性在微摩尔水平, 总之, 喹诺酮基二酮酸可作为开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的先导化合物, 今后研究可继续对其进行结构优化以改善其抗 RNase H 活性。

2.1.6 5-羟基吡啶-4-酮类衍生物 Kawasuji 等^[33]发现 3-羟基吡啶-4-酮是一种新的金属离子螯合骨架, 其 C-6 位引入取代甲酰胺的衍生物 **27** 是 HIV INSTIs。受此

启发, Mohammadpour 等^[34]合成了 5-羟基吡啶-4-酮类衍生物, 代表性化合物为 **28** 和 **29** (图 7), 其细胞水平的抗 HIV 活性在微摩尔水平。为探明此类化合物的具体作用靶点, Sirous 等^[35]将其分别与 IN 和 RNase H 进行了分子对接研究, 发现分子的 5-羟基吡啶-4-酮片段均能与 IN 和 RNase H 形成关键的金属离子螯合作用, C-2 位芳基能与两个靶点产生关键的强疏水相互作用, 证实 5-羟基吡啶-4-酮类化合物可作为 IN/RNase H 双靶点抑制剂的先导物。目前, 对此类化合物的结构优化及定向活性筛选正在进行中。

2.1.7 羟基吡啶羧酸类化合物 羟基吡啶羧酸骨架被证实能通过金属离子螯合作用抑制 HIV IN 和流感病毒内切核酸酶活性^[36,37]。考虑到金属离子螯合作用也是 HIV RNHIs 发挥抑酶活性的关键作用, Kankanala 等^[38]在羟基吡啶羧酸母核的 N-1 位引入苄基或二芳甲基, 合成了羟基吡啶羧酸类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图 8)。活性测试结果显示, 相比于 N-1 位苄基取代衍生物, 二芳甲基取代的系列衍生物 (如 **30** 和 **31**) 抗 IN 和 RNase H 活性更强, 在微摩尔至亚微摩尔水平, 且细胞水平的抗 HIV 活性较为显著达 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 值得进一步研究。

2.1.8 硝基苯并噁二唑类化合物 Korolev 等^[39]发现

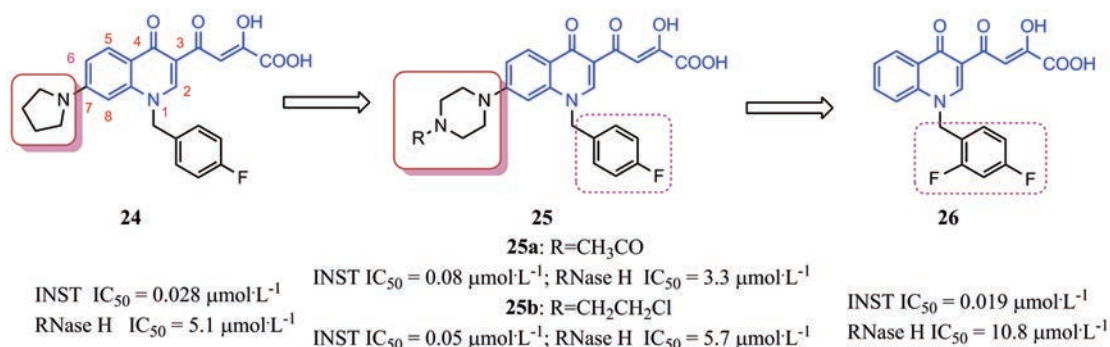


Figure 6 Structures and activities of quinolinonyl diketo acid derivatives

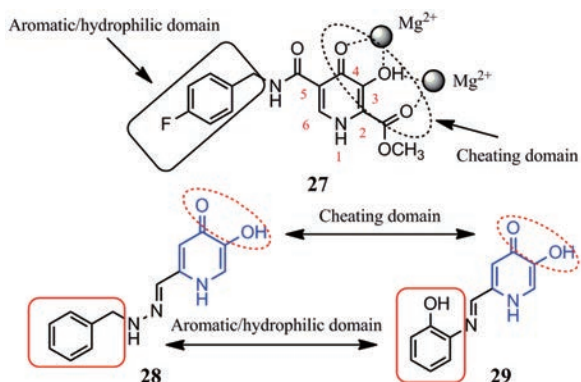


Figure 7 Structures of 5-hydroxypyridine-4-one derivatives

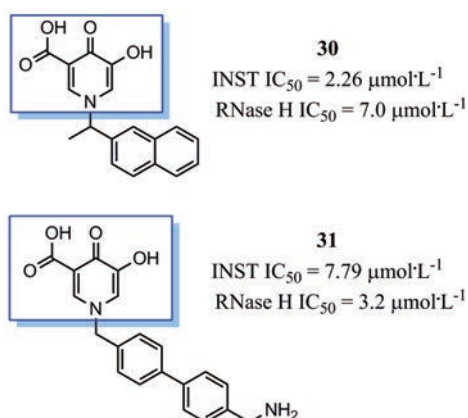


Figure 8 Structures and activities of hydroxypyridone carboxylic acids

硝基苯并噁二唑及其 *N*-氧化物 **32** 和 **33** (图9) 是选择性 HIV INSTIs, 此类化合物中的硝基是其发挥抑制活性的药效特征基团。在此基础上, Korolev 等^[40]合成了以 **34** 和 **35** 为代表的目标产物 (图9), 并对其进行了抗 IN 和 RNase H 定向活性测试, 结果显示此类化合物具有抗 IN 和 RNase H 双重活性, 有进一步研究的价值。

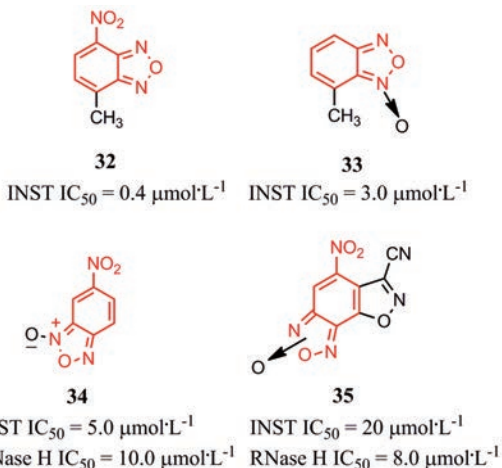


Figure 9 Structures and activities of nitrobenzofuroxane derivatives

2.1.9 *N'*-酰肼类衍生物 *N'*-酰肼类化合物属于 HIV RNHIs^[41]。Sanchez 等^[42]报道此类化合物能抑制人类晶状体上皮衍生长因子 (LEDGF/p75) 与 IN 之间的相互作用。在此基础上, Carcelli 等^[43]合成了一系列 *N'*-酰肼类化合物 (图10), 发现其酶水平的 IN 和 RNase H 抑制活性均处于微摩尔水平至低纳摩尔水平, 且细胞水平的抗 HIV 活性在微摩尔水平。构效关系研究表明, 相比于苯基上羟基的单或二取代衍生物, 三取代衍生物抗 IN 和 RNase H 活性更强, 表明苯环上三羟基为最佳的取代模式, 其中 3,4,5-三羟基取代衍生物 **36c** 对 IN 和 RNase H 的均衡抑制活性最好, IC_{50} 值分别为 0.165 和 0.18 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 有进一步研究的价值。部分 *N'*-酰肼类化合物不仅抗 IN 活性与 RAL 相当, 而且对 RNase H 的抑制活性在低纳摩尔水平, 可作为 IN/RNase H 双靶点抑制剂的先导化合物。

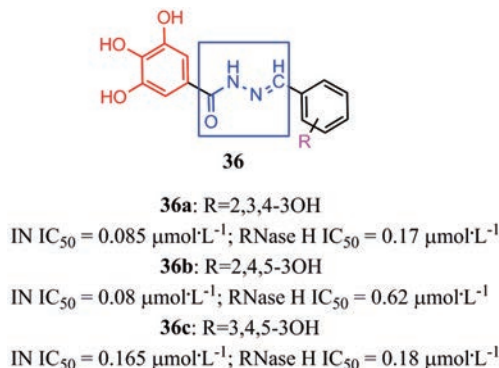


Figure 10 Structures and activities of *N'*-acylhydrazide derivatives

2.1.10 *N*-羟基噁吩并嘧啶-2,4-二酮类化合物 *N*-羟基尿嘧啶是具有金属配位性质的多功能结构母核, Tumey 等^[44]报道其衍生物 **37** (图11) 通过金属配位作用抑制核酸内切酶 FEN-1 活性。鉴于 HIV IN、RNase H 与核酸内切酶 FEN-1 的结构相似性, Kankanala 等^[45]采用生物电子等排体替换策略, 用噁吩环替换化合物 **37** 中的苯基, 得到 *N*-羟基噁吩并嘧啶-2,4-二酮类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图11)。大部分化合物 INST 抑制活性在微摩尔水平, 但抗 RNase H 活性稍高在微摩尔至低纳摩尔水平, 其中衍生物 **39** 抑酶活性高, 抗 HIV 活性好 ($EC_{50} = 7.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且无细胞毒性 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 可作为进一步研究的先导化合物。

2.1.11 1-羟基-1,8-萘啶-2(1*H*)-酮类化合物 1-羟基-1,8-萘啶-2(1*H*)-酮类化合物 **40** 是一类 HIV RNHIs, 与喹诺酮基二酮酸类双靶点抑制剂的发现思路类似, Williams 等^[46]通过对先导物 **40** 进行衍生化及定向筛选, 发现了 1-羟基-1,8-萘啶-2(1*H*)-酮类 IN/RNase H 双

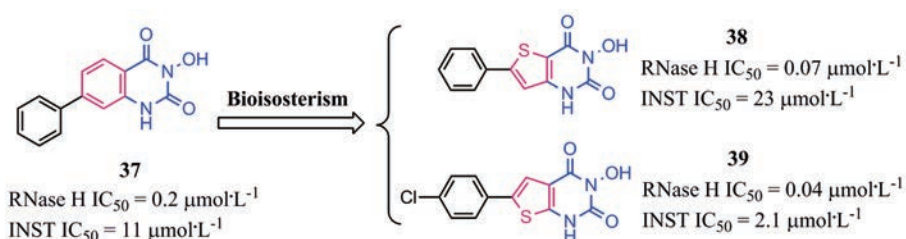


Figure 11 Structure and activities of *N*-hydroxythienopyrimidine-2,4-diones

靶点抑制剂 (图 12), 其抗 INST 活性在微摩尔水平, RNase H 抑制活性在微摩尔至低纳摩尔水平。在新的衍生物中, C-4 位苯环上引入氨基可增强其抗 RNase H 和 INST 活性, 不同位置取代的活性顺序为: 对位取代 (41c) > 间位取代 (41b) > 邻位取代 (41a), 表明苯环对位是引入氨基的最佳位置。今后结构优化可重点尝试在苯环对位引入给电子取代基作进一步探究。

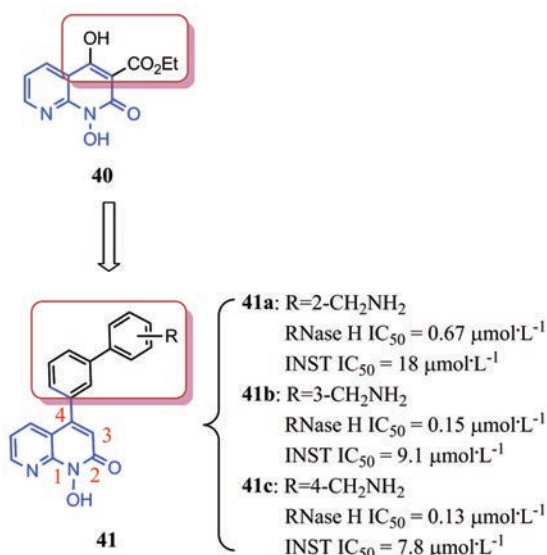


Figure 12 Structures and activities of 1-hydroxy-1,8-naphthyridin-2(1*H*)-one derivatives

2.1.12 5-羟基吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-6(5*H*)-酮类衍生物
根据大量 IN/RNase H 抑制剂中包含共平面的金属离子螯合基团和与其相连呈“T”构型的二芳基团的

观察结果提示^[22,25,38], Sun 等^[47]通过骨架跳跃策略开发了 5-羟基吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-6(5*H*)-酮类 IN/RNase H 双靶点抑制剂 (图 13), 其 IN 和 RNase H 抑制活性均处于微摩尔水平, 其中 4-氰基联苯基取代产物 42 对两个靶点的均衡抑制活性最好, IC_{50} 值分别为 1.18 和 1.77 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。总之, 5-羟基吡啶并[2,3-*b*]吡嗪-6(5*H*)-酮可作为开发 IN/RNase H 双靶点抑制剂的结构母核, 也证实了骨架跳跃策略在多靶点抗 HIV 药物开发中的可行性。

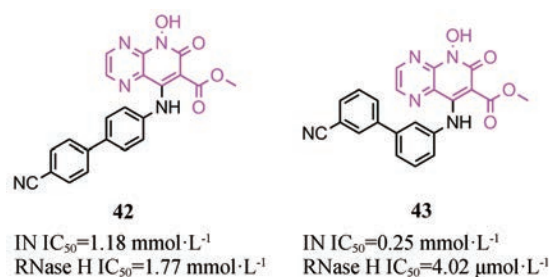


Figure 13 Structures and activities of 5-hydroxypyrido[2,3-*b*]pyridazin-6(5*H*)-one derivatives

2.2 基于合理药物设计途径发现的 HIV IN/RNase H 双靶点抑制剂

基于药效团的并合设计策略, Velthuisen 等^[48]将化合物 44 与 45 的药效特征基团进行并合, 得到了新类型衍生物 (图 14)。酶水平的 INST 和 RNase H 定向活性测试结果表明, 此类化合物抗 RNase H 活性在 0.01~0.501 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间, 但对 INST 抑制活性相对较低 (IC_{50} =0.5~15.9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。构效关系研究表明, 苯基对位引入疏水芳香基团 (苯环或吡啶环) 可提高衍

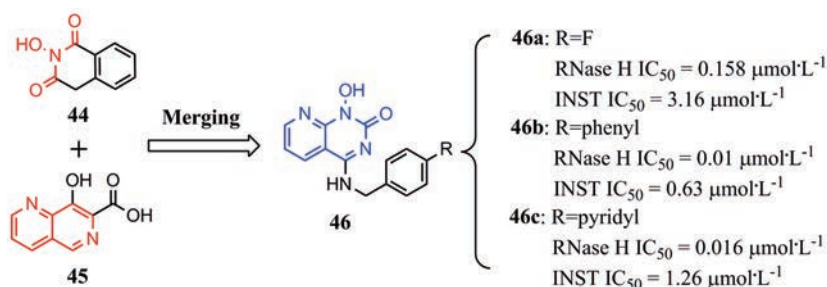


Figure 14 Structures and activities of pyridopyrimidinone inhibitors

生物的抗INST和RNase H活性。由于易化学合成,吡啶并嘧啶类化合物是开发IN/RNase H双靶点抑制剂极具吸引力的结构骨架,也证实了并合设计策略用于发现多靶点抗HIV药物的可行性。

3 结语

综上所述,近年来基于定向筛选及合理药物设计策略已发现了多类HIV IN/RNase H双靶点抑制剂,极大地推动了多靶点抗HIV药物的研发进程,但大多存在均衡抑制活性较差的缺点。相比于其他结构类型的HIV IN/RNase H双靶点抑制剂,3-羟基嘧啶-2,4-二酮类HIV IN/RNase H双靶点抑制剂抗IN和RNase H活性均在低纳摩尔水平,且对两个靶点的均衡活性较好,细胞水平的抗HIV活性也在低纳摩尔水平,细胞毒性低,安全性较好,结构简单,易化学合成,同时具有很好的理化性质和体外药动学性质,进一步结构优化的空间广阔,是最有价值的有待进一步研究的双靶点抑制剂。尽管此类化合物尚未进入临床研究阶段,但是其为设计更有效的多靶点抗HIV药物提供了结构骨架,值得进一步探索。

References

- [1] Yao C, Zhu PP, Xie D. Advances in antiretroviral therapy and drug development for AIDS [J]. Prog Pharm Sci (药 学 进 展), 2018, 42: 84-98.
- [2] Markham A. Bictegravir: first global approval [J]. Drugs, 2018, 78: 601-606.
- [3] Jones J, Taylor BS, Tieu HV, et al. CROI 2017: advances in antiretroviral therapy [J]. Top Antivir Med, 2017, 25: 51-67.
- [4] Kang JX, Zhu J, Li AX, et al. Advances on chemically synthesized dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase [J]. J Log Univ PAP (Med Sci) (武警后勤学院学报·医学版), 2018, 27: 169-176.
- [5] Liu H, Zhan P, Liu XY. Research progress of dual inhibitors targeting HIV-1 reverse transcriptase and integrase [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2013, 48: 466-476.
- [6] Tatiana I, Krystal LB, Sarafianos SG, et al. Inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity [J]. Biology, 2012, 1: 521-541.
- [7] Guo YS, Guo ZR. Design of multiple targeted drugs [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2009, 44: 276-281.
- [8] Shen XB, Ye J, Yang LL, et al. Research progress of HIV-1 integrase and its inhibitors [J]. Chin J Cell Biol (中 国 细 胞 生 物 学 学 报), 2013, 35: 1514-1524.
- [9] Zhou ZX, Sun L, Kang DW, et al. Progress on HIV-1 RT inhibitors with novel mechanism of action [J]. Acta Pharm Sin (药 学 学 报), 2018, 53: 691-700.
- [10] Deng LB, Li AX, Jin YR. Advances in the study on inhibitors of RNase H, a novel anti-HIV drug target [J]. J China Pharm Univ (中 国 药 科 大 学 学 报), 2011, 42: 578-584.
- [11] Morphy R, Rankovic Z. Designed multiple ligands. An emerging drug discovery paradigm [J]. J Med Chem, 2005, 48: 6523-6543.
- [12] Marchand C, Beutler JA, Wamiru A, et al. Madurahydroxylactone derivatives as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and RNase H [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52: 361-364.
- [13] Budihas SR, Gorshkova I, Gaidamakov S, et al. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones [J]. Nucleic Acids Res, 2005, 33: 1249-1256.
- [14] Chung S, Himmel DM, Jiang JK, et al. Synthesis, activity, and structural analysis of novel α -hydroxytropolone inhibitors of human immunodeficiency virus reverse transcriptase-associated ribonuclease H [J]. J Med Chem, 2011, 54: 4462-4473.
- [15] Semenova EA, Johnson AA, Marchand C, et al. Preferential inhibition of the magnesium-dependent strand transfer reaction of HIV-1 integrase by α -hydroxytropolones [J]. Mol Pharmacol, 2006, 69: 1454-1460.
- [16] Didierjean J, Isel C, Querre F, et al. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase, RNase H, and integrase activities by hydroxytropolones [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49: 4884-4894.
- [17] Klumpp K, Hang JQ, Rajendran S, et al. Two-metal ion mechanism of RNA cleavage by HIV RNase H and mechanism-based design of selective HIV RNase H inhibitors [J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31: 6852-6859.
- [18] Billamboz M, Suchaud V, Bailly F, et al. 4-Substituted 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as a novel class of HIV-1 integrase inhibitors [J]. ACS Med Chem Lett, 2013, 4: 606-611.
- [19] Billamboz M, Bailly F, Lion C, et al. Magnesium chelating 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones, as inhibitors of HIV-1 integrase and/or the HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H domain: discovery of a novel selective inhibitor of the ribonuclease H function [J]. J Med Chem, 2011, 54: 1812-1824.
- [20] Billamboz M, Bailly F, Lion C, et al. 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase RNase H domain: influence of the alkylation of position 4 [J]. Eur J Med Chem, 2011, 46: 535-546.
- [21] Billamboz M, Bailly F, Barreca ML, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of a series of 2-hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-diones as dual inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase and the reverse transcriptase RNase H domain [J]. J Med Chem, 2008, 51: 7717-7730.
- [22] Vernekar SK, Liu Z, Nagy E, et al. Design, synthesis, biochemical, and antiviral evaluations of C6 benzyl and C6 biaryl-methyl substituted 2-hydroxyisoquinoline-1,3-diones: dual inhibition against HIV reverse transcriptase-associated RNase H and polymerase with antiviral activities [J]. J Med Chem, 2015, 58:

- 651-664.
- [23] Vernekar SKV, Tang J, Wu B, et al. Double-winged 3-hydroxypyrimidine-2,4-diones: potent and selective inhibition against HIV-1 RNase H with significant antiviral activity [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5045-5056.
- [24] Tang J, Liu F, Nagy E, et al. 2-Hydroxypyrimidine-2,4-diones as selective active site inhibitors of HIV reverse transcriptase-associated RNase H: design, synthesis, and biochemical evaluations [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 2648-2659.
- [25] Wu B, Tang J, Wilson DJ, et al. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-dione-5-*N*-benzylcarboxamides potently inhibit HIV-1 integrase and RNase H [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 6136-6148.
- [26] Tramontano E, Esposito F, Badas R, et al. 6-[1-(4-Fluorophenyl)methyl-1*H*-pyrrol-2-yl]-2,4-dioxo-5-hexenoic acid ethyl ester a novel diketo acid derivative which selectively inhibits the HIV-1 viral replication in cell culture and the ribonuclease H activity *in vitro* [J]. *Antivir Res*, 2005, 65: 117-124.
- [27] Costi R, Métifiot M, Esposito F, et al. 6-(1-Benzyl-1*H*-pyrrol-2-yl)-2,4-dioxo-5-hexenoic acids as dual inhibitors of recombinant HIV-1 integrase and ribonuclease H, synthesized by a parallel synthesis approach [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 8588-8598.
- [28] Cuzzucoli Crucitti G, Métifiot M, Pescatori L, et al. Structure-activity relationship of pyrrolyl diketo acid derivatives as dual inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease H domain [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 1915-1928.
- [29] Di Santo R, Costi R, Roux A, et al. Novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: design, synthesis, biological activities, and mechanism of action [J]. *J Med Chem*, 2006, 49: 1939-1945.
- [30] Di Santo R, Costi R, Roux A, et al. Novel quinolinonyl diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: design, synthesis, and biological activities [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 4744-4750.
- [31] Costi R, Métifiot M, Chung S, et al. Basic quinolinonyl diketo acid derivatives as inhibitors of HIV integrase and their activity against RNase H function of reverse transcriptase [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 3223-3234.
- [32] Pescatori L, Métifiot M, Chung S, et al. *N*-Substituted quinolinonyl diketo acid derivatives as HIV integrase strand transfer inhibitors and their activity against RNase H function of reverse transcriptase [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 4610-4623.
- [33] Kawasuji T, Johns BA, Yoshida H, et al. Carbamoyl pyridone HIV-1 integrase inhibitors. 2. Bi- and tricyclic derivatives result in superior antiviral and pharmacokinetic profiles [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 1124-1135.
- [34] Mohammadpour M, Sadeghi A, Fassihi A, et al. Synthesis and antioxidant evaluation of some novel ortho-hydroxypyridine-4-one iron chelators [J]. *Res Pharm Sci*, 2012, 7: 171-179.
- [35] Sirous H, Zabihollahi R, Aghasadeghi MR, et al. Docking studies of some 5-hydroxypyridine-4-one derivatives: evaluation of integrase and ribonuclease H domain of reverse transcriptase as possible targets for anti-HIV-1 activity [J]. *Med Chem Res*, 2015, 24: 2195-2212.
- [36] Fujishita T, Mikamiyama M, Kawai M, et al. Substituted 3-hydroxy-4-pyridone derivative: US, US8835461 [P]. 2014-09-16.
- [37] Johns BA, Kawasuji T, Weatherhead JG, et al. Carbamoyl pyridone HIV-1 integrase inhibitors 3. A diastereomeric approach to chiral nonracemic tricyclic ring systems and the discovery of dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 5901-5916.
- [38] Kankanala J, Kirby KA, Liu F, et al. Design, synthesis and biological evaluations of hydroxypyridone carboxylic acids as inhibitors of HIV reverse transcriptase-associated RNase H [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 5051-5062.
- [39] Korolev SP, Kondrashina OV, Druzhilovsky DS, et al. Structural-functional analysis of 2,1,3-benzoxadiazoles and their *N*-oxides as HIV-1 integrase inhibitors [J]. *Acta Nat*, 2013, 5: 63-72.
- [40] Korolev SP, Pustovarova MA, Starosotnikov AM, et al. Nitrobenzofuroxane derivatives as dual action HIV-1 inhibitors [J]. *Biomed Khim*, 2016, 62: 725-728.
- [41] Gong Q, Menon L, Ilina T, et al. Interaction of HIV reverse transcriptase ribonuclease H with an acylhydrazone inhibitor [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 77: 39-47.
- [42] Sanchez TW, Debnath B, Christ F, et al. Discovery of novel inhibitors of LEDGF/p75-IN protein-protein interactions [J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21: 957-963.
- [43] Carcelli M, Rogolino D, Gatti A, et al. Chelation motifs affecting metal-dependent viral enzymes: *N*'-acylhydrazone ligands as dual target inhibitors of HIV-1 integrase and reverse transcriptase ribonuclease H domain [J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 440-450.
- [44] Tumey LN, Bom D, Huck B, et al. The identification and optimization of a *N*-hydroxy urea series of flap endonuclease 1 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15: 277-281.
- [45] Kankanala J, Kirby KA, Huber AD, et al. Design, synthesis and biological evaluations of *N*-hydroxy thienopyrimidine-2,4-diones as inhibitors of HIV reverse transcriptase-associated RNase H [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 141: 149-161.
- [46] Williams PD, Staas DD, Venkatraman S, et al. Potent and selective HIV-1 ribonuclease H inhibitors based on a 1-hydroxy-1,8-naphthyridin-2(1*H*)-one scaffold [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 6754-6757.
- [47] Sun L, Gao P, Dong G, et al. 5-Hydroxypyrido[2,3-*b*]pyrazin-6(5*H*)-one derivatives as novel dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H and integrase [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 6: 714-724.
- [48] Velthuisen EJ, Johns BA, Gerondelis P, et al. Pyridopyrimidinone inhibitors of HIV-1 RNase H [J]. *Eur J Med Chem*, 2014, 83: 609-616.