

## HIV-1 潜伏库调控剂的研究进展

代娇娇, 姜向毅, 封 达, 林 浩, 刘新泳\*, 展 鹏\*

(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 潜伏库的存在导致艾滋病无法彻底治愈。因此, 迫切需要开发高效低毒、成药性良好的 HIV-1 潜伏库调控剂以实现艾滋病的功能性治愈。本文综述了 2019 年以来潜伏库调控剂的研究进展, 涵盖药物发现策略、生物活性和作用机制。本文对于发现具有临床应用价值的 HIV-1 潜伏库调控剂具有重要的指导意义。

**关键词:** 艾滋病; HIV-1 潜伏库; 功能性治愈; 激活并杀死; 阻滞并锁定

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)04-0840-13

## Advances in HIV-1 latency-regulating agents

DAI Jiao-jiao, JIANG Xiang-yi, FENG Da, LIN Hao, LIU Xin-yong\*, ZHAN Peng\*

(Department of Medicinal Chemistry, Key laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** At present, there is no cure for acquired immune deficiency syndrome (AIDS) due to HIV-1 latent reservoirs. Therefore, it urgently requires novel HIV-1 latency-regulating agents with high potency, low toxicity and favorable drug-like properties to achieve a functional cure for AIDS. Herein, we reviewed the advances in HIV-1 latency-regulating agents since 2019, including the drug discovery strategies, bioactivities, and mechanisms of these compounds. It is of great guiding significance in the development of latency-regulating agents with clinical value.

**Key words:** acquired immune deficiency syndrome; HIV-1 latent reservoirs; functional cure; shock and kill; block and lock

人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 通过攻击人体免疫细胞, 导致免疫系统受损乃至崩溃, 最终发展为艾滋病, 即获得性免疫缺陷综合征 (acquired immune deficiency syndrome, AIDS)。自 1981 年首次报道以来, 艾滋病在世界范围内迅速传播, 已成为严重威胁人类生命健康的全球性公共卫生问题。针对 HIV-1 的生命周期的关键环节, 已经有包括 (非) 核苷类逆转录酶抑制剂、整合酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、侵入抑制剂以及衣壳蛋白抑制剂等 30 余种

抗艾滋病化学实体药物被美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准上市<sup>[1]</sup>。这些不同机制药物的联合应用, 即高效抗逆转录病毒疗法 (highly active antiretroviral therapy, HAART), HAART 可以有效抑制体内病毒复制、改善患者生存质量、降低艾滋病发病率和死亡率。但由于 HIV-1 潜伏库的存在, HAART 并不能彻底清除体内病毒, 一旦停止给药, 患者体内的病毒载量会快速反弹至治疗前的水平<sup>[2]</sup>。

HIV-1 潜伏是指 HIV-1 侵入宿主细胞后, 能够持续存在、具有复制能力但转录沉默的状态。HIV-1 潜伏感染的细胞或解剖学位点称为 HIV-1 潜伏库, 被分别称为细胞储库和解剖学储库<sup>[3]</sup>。静息状态的 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞是最主要的 HIV-1 潜伏细胞储库<sup>[4]</sup>, 此外, 巨噬细胞、单核细胞和小胶质细胞等也被确证为 HIV-1 潜

收稿日期: 2023-08-02; 修回日期: 2023-10-02.

基金项目: 国家自然科学基金国际 (地区) 合作与交流项目 (82211530493);  
国家自然科学基金面上项目 (82173677); 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31).

\*通讯作者 E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0937

伏细胞储库<sup>[5]</sup>; 某些组织、器官由于抗逆转录病毒药物对其渗透性不佳, 低浓度的药物不能完全抑制病毒复制, HIV-1 得以持续低水平复制, 构成了 HIV-1 解剖学储库, 如淋巴结、中枢神经系统和尿道等<sup>[6,7]</sup>。HIV-1 潜伏库的转录沉默状态, 使其得以逃过抗逆转录病毒药物的抑制作用和免疫系统的监视, 持续存在于感染者体内, 而一旦停止 HAART, 潜伏库中的病毒会迅速转变为转录活跃状态, 进而引起病毒血症和全身性感染<sup>[8]</sup>。因此, HIV-1 潜伏库是当前治愈艾滋病的主要障碍。

HIV-1 潜伏库是由于病毒转录受到抑制而无法进行有效复制所形成的, 其建立和维持的机制十分复杂, 多种宿主因子和病毒因子均参与其中。目前报道的分子机制包括: ① 转录干扰<sup>[8]</sup>。HIV-1 基因会优先整合到转录活跃的宿主基因上, 而宿主基因的转录会干扰病毒转录前起始复合物的形成, 从而抑制 HIV-1 的转录。② 表观遗传沉默<sup>[9]</sup>。表观遗传是指在 DNA 序列不发生变化的情况下, 由于染色质结构变化而导致基因表达发生可逆和可遗传的变化, 包括核小体定位、染色质重塑、组蛋白修饰、DNA 修饰、非编码 RNA 调控等, 通过上述机制阻断 HIV-1 的表达称为表观遗传沉默。③ 转录因子的隔离<sup>[10]</sup>。HIV-1 的转录依赖于宿主转录因子, 如细胞核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)、活化 T 细胞核因子、激活蛋白-1 等。它们隔离在细胞质中, 难以进入细胞核参与 HIV-1 转录, 从而降低了 HIV-1 的转录水平。④ HIV-1 Tat 水平低下<sup>[11]</sup>。反式转录激活因子 (transactivator of transcription, Tat) 是 HIV-1 转录的重要调控蛋白。当缺乏 Tat 时, HIV-1 虽然可以启动转录, 但产生短链 RNA 后便暂停转录, 无法进行转录延伸。由于表观遗传沉默, Tat 水平低于阈值, 进一步促进 HIV-1 潜伏。⑤ HIV-1 Rev 的缺乏<sup>[12]</sup>。病毒颗粒蛋白表达调节因子 (regulator of expression of virion protein, Rev) 通过与病毒的 Rev 响应元件 (Rev response element, RRE) 相互作用, 促进未剪接和部分剪接的 mRNA 向核外转运, 从而翻译得到 HIV-1 Gag、Env、Pol 等关键结构蛋白。低水平的转录致使细胞中 Rev 的含量极低, 导致 mRNA 在核内完全降解, 进而阻断 HIV-1 的复制。⑥ MicroRNAs 的过度表达<sup>[13]</sup>。微小 RNA (microRNAs, miRNAs) 是由 18~25 个核苷酸组成的非编码 RNA, 通过碱基互补配对与目标 mRNA 结合, 造成转录抑制或者 mRNA 清除, 从而抑制蛋白的合成。在 CD4<sup>+</sup> T 细胞潜伏库中, miRNAs 的过度表达会减少 HIV-1 编码蛋白的产生, 促使 HIV-1 潜伏库的形成。

由于 HIV-1 潜伏库的存在, 难以彻底清除患者体

内的 HIV-1。现阶段, 医学界将治疗目标定为功能性治愈, 即在不接受 HAART 的情况下, 可以长期控制病毒滴度低于检测限, 且人体的免疫功能不被继续破坏。当前, 功能性治愈有两种研究较为深入的策略。第一种是“激活并杀死” (shock and kill) 策略<sup>[14]</sup>, 指接受 HAART 的患者同时服用潜伏激活剂 (latency reversing agents, LRA) 从而激活体内潜伏的前病毒, 然后通过病毒的细胞病变效应或 HIV-1 特异性细胞毒性 T 细胞反应杀死被激活的潜伏感染细胞 (图 1A)。在经过二十余年深入研究后, 已经鉴定了多种潜伏激活剂, 但遗憾的是目前它们在临床试验中并没有减少 HIV-1 潜伏储库<sup>[15]</sup>, 目前没有上市药物。第二种是“阻滞并锁定” (block and lock) 策略<sup>[16]</sup>, 通过使用潜伏促进剂 (latency promoting agents, LPA) 阻断 HIV-1 的转录和复制, 使潜伏感染细胞进入深度潜伏的状态, 即使中断 HAART 或者使用潜伏激活剂, 病毒也不能有效复制 (图 1B)。阻滞并锁定策略提出较晚, 目前也没有药物上市。

HIV-1 潜伏库的存在使得患者不得不终身接受 HAART, 长期服用抗逆转录病毒药物不可避免地带来病毒耐药的问题。此外, 长期用药所引起的毒副作用和经济负担会降低患者的服药依从性, 使疗效难以保证。因此, 迫切需要开发活性高、成药性好的潜伏库调控剂, 以清除或“沉默”HIV-1 潜伏库, 实现 HIV-1 感染者的功能性治愈。

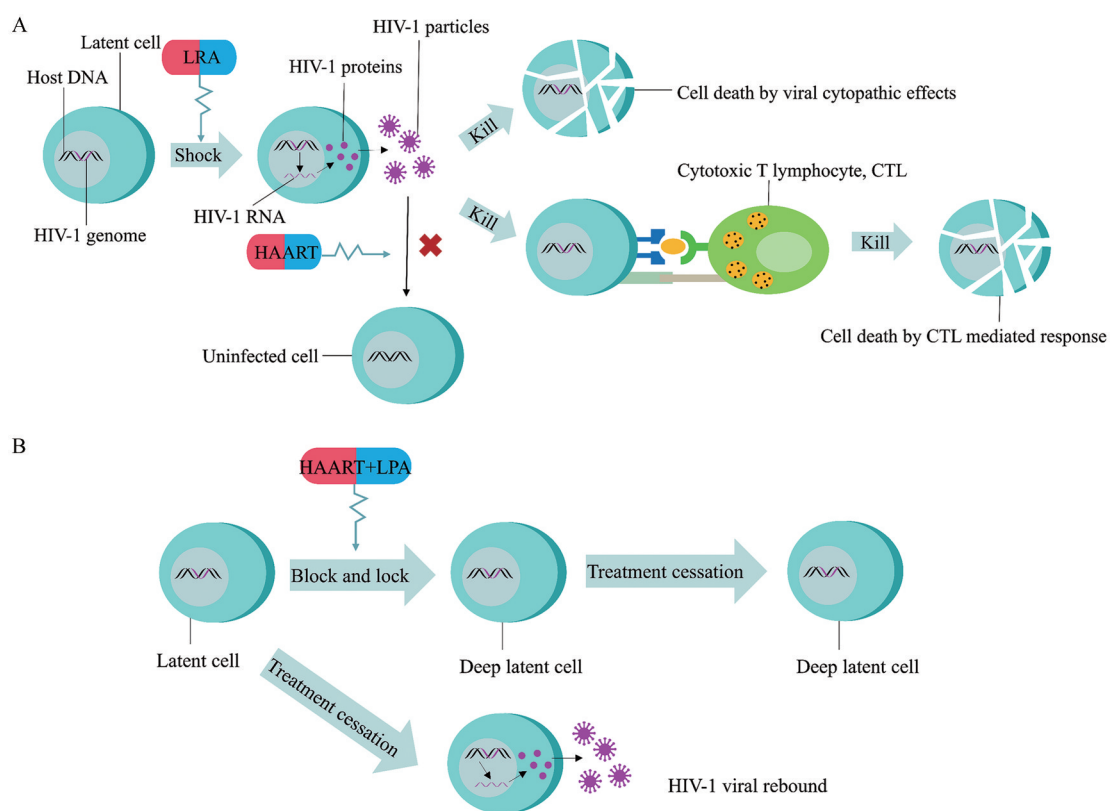
本文从药物发现策略、生物活性和作用机制等方面对近五年来 HIV-1 潜伏库调控剂研究领域的进展进行综述 (图 2), 以期为 HIV-1 潜伏库调控剂的设计与开发提供参考。

## 1 潜伏激活剂

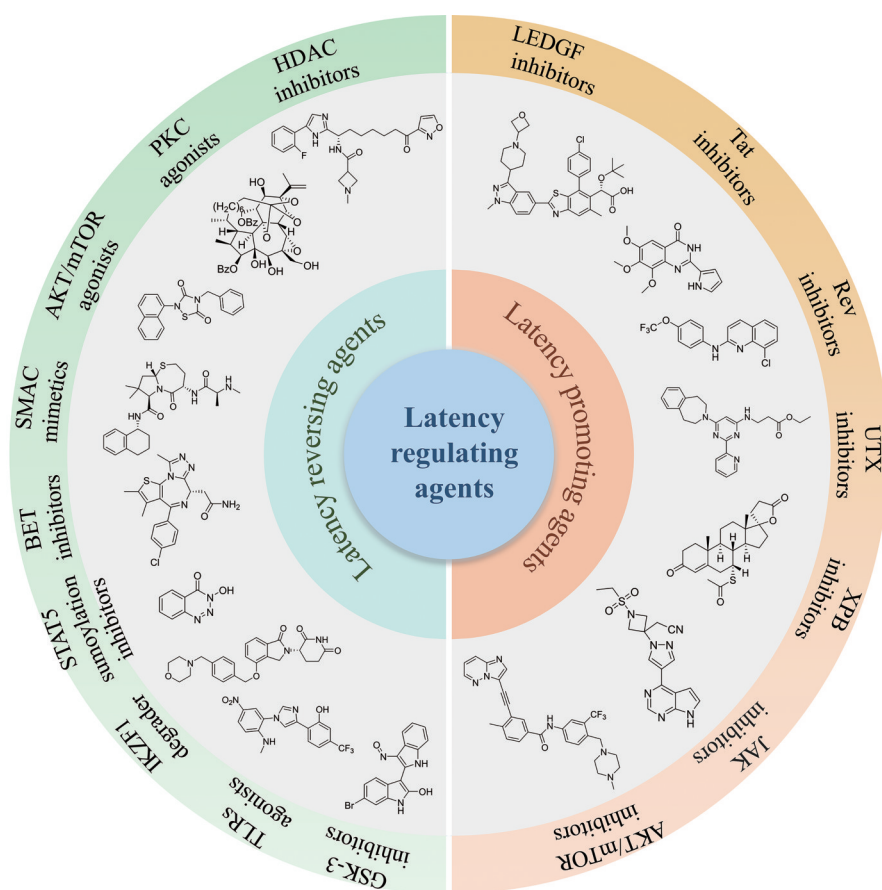
基于潜伏库的形成机制, 已有上百种小分子化合物被鉴定为潜伏激活剂, 它们作用于 HIV-1 转录的不同阶段, 通过促进病毒转录来激活 HIV-1 的表达。根据作用机制的不同, 可分为组蛋白去乙酰化酶抑制剂、DNA 甲基化抑制剂、蛋白激酶 C 激动剂、溴结构域及其外域抑制剂等。

### 1.1 组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDAC) 抑制剂

HDAC 是一类调控组蛋白翻译后修饰的蛋白酶家族, 可催化组蛋白 N 端赖氨酸残基的去乙酰化, 进而增强组蛋白与 DNA 之间的相互作用, 使染色质结构处于紧密状态, 不易于基因转录。在目前已报道的 18 种人源 HDAC 中, 根据序列同源性可分为四类<sup>[17]</sup>。其中, Zn<sup>2+</sup> 依赖性的 I 类 HDAC 参与了 HIV-1 潜伏库的形成<sup>[18]</sup>, 包括 HDAC1、2、3 和 8 四种亚型。抑制 HIV-1 患者体内的 I 类 HDAC 可提高组蛋白的乙酰化程度, 促进基因表达, 从而激活 HIV-1 潜伏库。



**Figure 1** Approaches to achieve functional cure. A: The shock and kill strategy; B: The block and lock strategy



**Figure 2** The classic latency regulating-agents reported in the last five years

异羟肟酸类化合物是一类经典的HDAC抑制剂,通过异羟肟酸基团与 $Zn^{2+}$ 螯合来抑制HDAC活性。代表性药物伏立诺他(**1**, vorinostat, 图3)在临床试验中可促进患者HIV-1 RNA的表达,但并不能减少HIV-1潜伏库,而且会干扰HIV-1特异性细胞毒性T淋巴细胞反应<sup>[19]</sup>。2021年, Lu等<sup>[20]</sup>报道的伏立诺他衍生物**2**(图3)可选择性抑制HDAC1和HDAC8,其 $IC_{50}$ 分别为72.5和442  $nmol \cdot L^{-1}$ 。细胞水平的实验结果表明,化合物**2**在0.3  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 的浓度下能显著诱导p24抗原和HIV-1 mRNA的表达,且在此浓度下未表现出明显的细胞毒性。此外,**2**还能下调HIV-1受体CD4和辅助受体CCR5的表达,降低细胞被HIV-1感染的风险。为探究**2**激活HIV-1潜伏库的机制,研究者用**2**处理潜伏细胞系ACH-2细胞48 h后进行了免疫印迹(Western blot, WB)试验,发现化合物**2**以剂量依赖性方式提高组蛋白的乙酰化水平并激活NF- $\kappa$ B通路。

2019年, Bresciani等<sup>[21]</sup>报道了以乙基酮作为 $Zn^{2+}$ 螯合基团的新型I类HDAC抑制剂**3** [ $IC_{50(HDAC1)} = 13 nmol \cdot L^{-1}$ ,  $IC_{50(HDAC2)} = 18 nmol \cdot L^{-1}$ ,  $IC_{50(HDAC3)} = 12 nmol \cdot L^{-1}$ ]。结构生物学研究表明**3**(图3)结构中的酮可形成水合物并与 $Zn^{2+}$ 形成双齿螯合作用。此外,酮与

$Zn^{2+}$ 结合位点下方有一口袋未被占据(图4A)。为充分占据该口袋以增强靶标亲和力, Liu等<sup>[22]</sup>用异噁唑酮取代乙基酮结构得到的化合物**4**(图3),对I类HDAC具有良好的抑制作用 [ $IC_{50(HDAC1)} = 0.1 nmol \cdot L^{-1}$ ,  $IC_{50(HDAC2)} = 0.47 nmol \cdot L^{-1}$ ,  $IC_{50(HDAC3)} = 0.087 nmol \cdot L^{-1}$ ]。细胞实验表明,**4**具有强效的潜伏激活作用( $EC_{50} = 4.7 nmol \cdot L^{-1}$ )。共晶结构表明化合物**4**和**3**与靶标HDAC2的结合模式相似,但**4**的异噁唑片段可延伸至锌离子下方的口袋,与His141、Cys152等氨基酸残基形成氢键(图4B)。靶标亲和力测试结果表明**3**与HDAC结合的驻留时间仅有5.6 min;而**4**则表现出慢结合、慢解离的特征,驻留时间长达35 h,结合动力学性质显著提升。

**1.2 蛋白激酶C (protein kinase C, PKC) 激动剂**  
NF- $\kappa$ B是HIV-1转录的正调节因子,可结合HIV-1启动子的增强子区来激活HIV-1的转录。在细胞质中,NF- $\kappa$ B与其抑制蛋白I $\kappa$ B (inhibitory kappa B)结合形成无活性的复合物。PKC是一类磷脂依赖性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,激活PKC可促进I $\kappa$ B的磷酸化并引起I $\kappa$ B降解,从而恢复NF- $\kappa$ B的活性。PKC激动剂多来源于天然产物,目前瑞香烷型二萜类、佛波醇二萜酯类以及大环内酯类化合物的研究较为广泛。

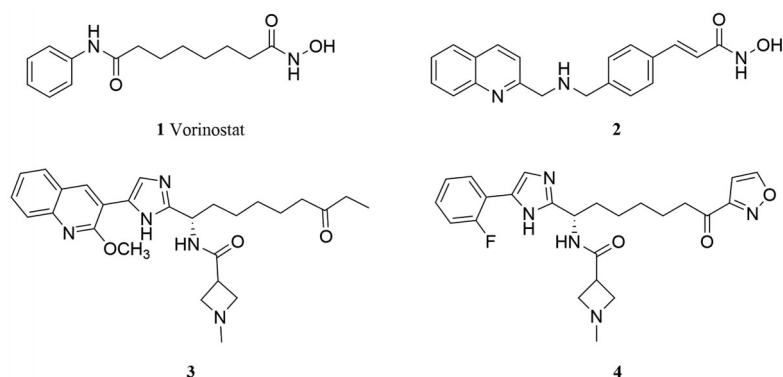


Figure 3 The structures of compounds 1-4

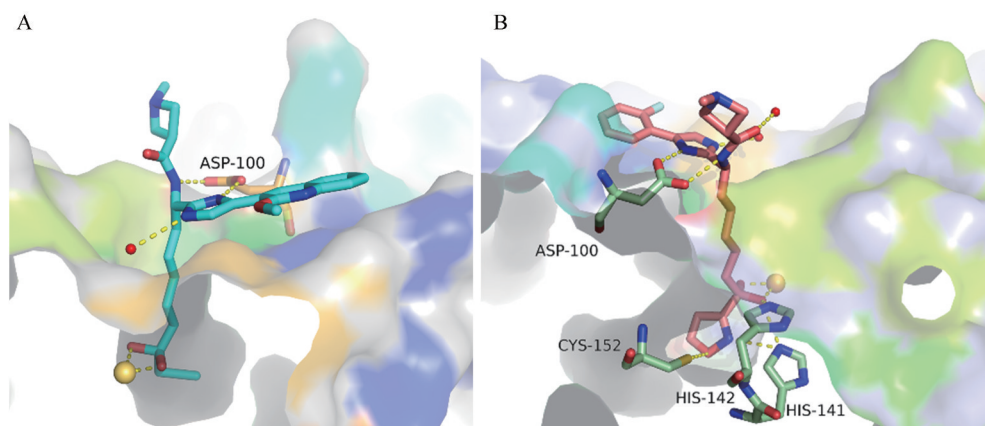


Figure 4 X-ray crystal structures of compound **3** (A, PDB code: 6WBW) and compound **4** (B, PDB code: 6XDM) bound to HDAC2. These figures were shown in PyMOL

2019年, Feng等<sup>[23]</sup>从黄芩花中提取分离得到的瑞香烷型二萜化合物**5**(图5, 专利保护的R基团未公布)表现出显著的HIV-1潜伏激活作用, 在 $10\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下促进HIV-1的转录且不会引起T淋巴细胞的全面活化。机制研究表明, **5**通过激活PKC进而提高活性NF- $\kappa$ B的水平最终促进HIV-1的转录。此外, **5**能够上调转录延伸因子ELL2 (eleven-nineteen lysine-rich leukemia gene 2)的mRNA和蛋白水平, 从而促进病毒的转录延伸。

瑞香科植物 *Gnidia sericocephala* 在南非地区常被用于抗艾滋病治疗, 2022年, Tembeni等<sup>[24]</sup>利用高效液相色谱法从该植物的根部分离得到化合物**6**(图5)。在细胞水平的抗病毒活性测试中, **6**表现出良好的抗HIV-1活性 ( $\text{EC}_{50} = 0.03\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和较高的选择指数 ( $\text{SI} > 500$ )。随后, 研究者利用流式细胞术发现**6**在 $0.15\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下能激活潜伏的HIV-1, 进一步的研究表明该化合物通过激活PKC来发挥潜伏激活作用。

化合物**7** (gnidimacrin, 图5) 是从近心格尼迪木 *Gnidia subcordata* Meisn 中分离得到的瑞香烷型二萜化合物。体外活性测试表明, **7**在 $20\ \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下能显著降低潜伏库的DNA水平并减少HIV-1细胞储库, 且不会引起 $\text{CD}4^+$  T细胞的全面活化和刺激炎症因子的产生<sup>[25]</sup>。WB试验结果显示**7**通过激活PKC发挥潜伏激活作用。随后, Liu等<sup>[26]</sup>对**7**的C-3、C-5、C-20和C-2'四个位点的取代基进行修饰并合成了29个衍生物。活性测试结果表明, C-5和C-20的羟基对化合物**7**的活性至关重要, C-2'的修饰对活性影响较小, C-3的苯甲酸酯可替换为其他的芳香酯基团以增强活性。

化合物**8** (wikstroelide E, 图5) 是从河朔堯花 *Wikstroemia chamaedaphne* 的花蕾中提取的瑞香烷型二萜化合物。2021年, Li等<sup>[27]</sup>使用荧光显微技术发

现**8**在纳摩尔水平可显著激活潜伏的HIV-1, 且在 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下没有细胞毒性。机制研究表明**8**通过激活PKC, 进而促进NF- $\kappa$ B进入细胞核, 最终增强HIV-1的表达。

佛波醇二萜酯类化合物是另一类的研究广泛的PKC激动剂。2020年, 研究者<sup>[28]</sup>从大戟科植物 *Euphorbia amygdaloides* ssp. *semiperfoliata* 分离得到4-脱氧佛波醇酯衍生物**9**(图5), 具有抑制HIV-1感染 ( $\text{IC}_{50} = 0.64\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和诱导HIV-1的转录 ( $\text{EC}_{50} = 2.9\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的双重作用。通过流式细胞术检测, 发现**9**以浓度依赖性的方式下调MT-2细胞表面受体CD4和辅助受体CXCR4、CCR5的表达。此外, 通过测定荧光素酶活性发现其可以通过激活PKC进而增强NF- $\kappa$ B的转录正调控作用。与抗逆转录病毒药物在细胞中联用时, **9**的潜伏激活作用不受影响且与抗逆转录病毒药物表现出协同作用。

2000年, Nacro等<sup>[29]</sup>以PKC的内源性配体二酰甘油(**10**, 图5)为先导化合物, 运用构象限制策略, 设计并合成了具有高亲和力的PKC激动剂**11**(图5)。2021年, Matsuda等<sup>[30]</sup>发现**11**在ACH-2细胞和U1细胞中均能诱导病毒表达,  $\text{EC}_{50}$ 分别为 $0.87$ 和 $1.81\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且 $\text{CC}_{50} > 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, 流式细胞术检测结果显示该化合物在HIV-1潜伏感染细胞中可引起凋亡蛋白酶caspase-3较高水平的激活, 而在未感染细胞中仅引起低水平的caspase-3激活效应, 表明**11**可以选择性地诱导HIV-1潜伏感染细胞凋亡。

研究表明二酰甘油衍生物与PKC的结合模式为细胞膜-二酰甘油衍生物-PKC的三元复合物<sup>[31]</sup>。为增强化合物**11**与细胞膜的疏水作用, 从而提高该化合物与PKC的亲合力, 2023年, Ishii等<sup>[32]</sup>设计并合成了一系列含不

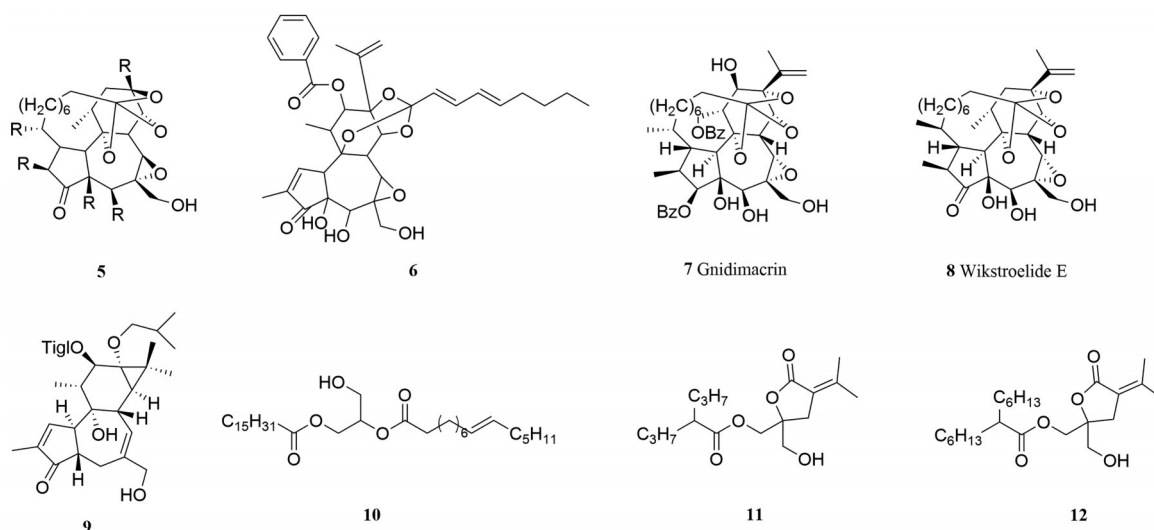


Figure 5 The structures of compounds 5–12

同酰基侧链的化合物 **11** 的衍生物, 其中化合物 **12** (图 5) 表现出最强的潜伏激活效应 ( $EC_{50} = 0.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。此外, **12** 与 PKC 的亲合力比 **11** 提高了 5 倍。

**1.3 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (protein kinase B/mammalian rapamycin target protein, AKT/mTOR) 激活剂** AKT 和 mTOR 均是人体内重要的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。mTOR 具有两种不同的多蛋白复合物形式, 分别是 mTORC1 和 mTORC2。mTORC2 可以磷酸化 AKT 的 Ser473 位点, 促进其激活<sup>[33]</sup>。活化的 AKT 可磷酸化 I $\kappa$ B 激酶, 提高活性 NF- $\kappa$ B 的水平, 从而促进 HIV-1 的转录<sup>[34]</sup>。因此, 激活 AKT/mTOR 是激活 HIV-1 潜伏库的有效途径。

糖原合成酶激酶-3 (glycogen synthase-kinase 3, GSK-3) 是 mTOR 的负性调节因子, 抑制 GSK-3 可促进 mTOR 的活化。2021 年, Gramatica 等<sup>[35]</sup>用 GSK-3 抑制剂化合物 **13** (图 6) 处理 HIV-1 潜伏感染的细胞, 发现该化合物在  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下可促进病毒的复制, 且不影响细胞活力。机制研究表明 **13** 通过激活 AKT/mTOR 信号通路, 促进 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合, 进而增强 HIV-1 的转录。流式细胞术检测结果显示 **13** 不会干扰细胞毒性 T 淋巴细胞和自然杀伤细胞的功能, 有利于激活潜伏库后的“杀死”过程。但遗憾的是, 感染猴免疫缺陷病毒 (simian immunodeficiency virus, SIV) 的恒河猴口服或者静脉注射 **13**, 没有引起病毒潜伏库的明显激活。因此, 需要对 **13** 进行进一步优化以提高潜伏激活效应并改善药代动力学性质。

**1.4 第二线粒体衍生的半胱天冬酶激活剂 (second mitochondria-derived activator of caspase, SMAC) 模拟物** SMAC 是一种线粒体蛋白, 可拮抗凋亡抑制蛋

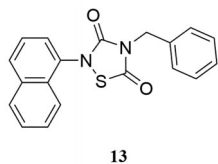


Figure 6 The structure of compound **13**

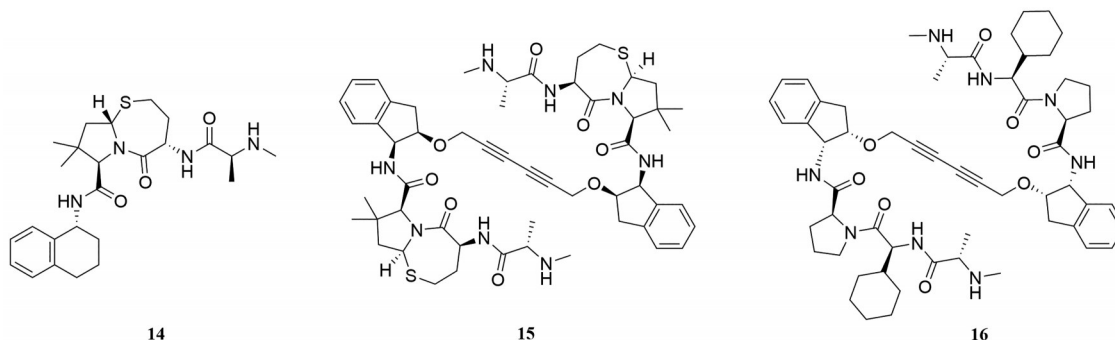


Figure 7 The structures of compounds **14-16**

白从而促进细胞凋亡。通过模拟 SMAC N 端的 AVPI 四肽序列所合成的小分子多肽, 被称为 SMAC 模拟物, 是凋亡抑制蛋白的抑制剂<sup>[36]</sup>。2015 年, Pache 等<sup>[37]</sup>通过全基因组 RNA 干扰筛选, 发现凋亡抑制蛋白 BIRC2 通过阻碍非经典的 NF- $\kappa$ B 通路从而抑制 HIV-1 的转录。随后用 BIRC2 的小分子抑制剂, SMAC 模拟物化合物 **14** (图 7) 处理人胚肾 293T 细胞, 观察到 HIV-1 的复制水平提高。而当 NF- $\kappa$ B 的结合位点突变失活后, 化合物 **14** 诱导 HIV-1 复制的作用丧失, 说明 **14** 通过抑制 BIRC2, 进而增强非经典的 NF- $\kappa$ B 通路, 促进 HIV-1 的复制。

二聚体的 SMAC 模拟物已被证实可以与凋亡抑制蛋白的两个基序相结合, 从而具有更强的亲和力<sup>[38]</sup>。2020 年, Pache 等<sup>[39]</sup>设计并合成了化合物 **14** 的二聚体化合物 **15** (图 7)。相较于 **14**, **15** 在 Jurkat 潜伏细胞系中表现出更强的潜伏激活作用。此外, **15** 的药代动力学性质显著优于 **14**, 在小鼠血浆中浓度约为同等剂量下的 **14** 的 20 倍。在感染 HIV-1 的人源化小鼠模型中, **15** 可促进 HIV-1 的复制且不引起 T 细胞的全面活化。

2020 年, Nixon 等<sup>[40]</sup>报道了一个具有强效潜伏激活作用的 SMAC 模拟物化合物 **16** (图 7)。在接受抗逆转录病毒疗法 (antiretroviral therapy, ART) 的 HIV-1 感染的 BLT 小鼠中, 化合物 **16** 可诱导其血液和组织中 HIV-1 mRNA 水平显著提高。此外, 向接受 ART 的感染 SIV 的恒河猴静脉输注 **16**, 发现恒河猴的血浆病毒载量显著升高; 恒河猴的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中的 HIV-1 mRNA 水平也远高于未输注化合物 **16** 的恒河猴。但遗憾的是, **16** 并未减少 SIV 储库。**16** 具有良好的安全性, 在 BLT 小鼠和恒河猴中均不会引起全身毒性和 CD4<sup>+</sup> T 细胞的全面活化。WB 试验结果说明 **16** 通过激活非经典的 NF- $\kappa$ B 通路来促进潜伏的 HIV-1 表达。基因集富集分析结果显示 NF- $\kappa$ B 的富集, 这进一步证实非经典的 NF- $\kappa$ B 是 **16** 发挥潜伏激活作用的靶点。

**1.5 溴结构域及其外域 (bromodomain and extra-terminal, BET) 抑制剂** BET 蛋白家族是一类十分保

守的转录调控因子家族, 家族成员包括BRD2、BRD3、BRD4和BRDT, 其中对BRD4的研究最为深入。BRD4具有两个保守的N端溴结构域(BD1和BD2)、一个末端外结构域和一个C端结构域。其中C端结构域可与正性转录延伸因子(positive transcription elongation factor b, P-TEFb)特异性结合, 招募P-TEFb至基因的启动子或增强子区域<sup>[41]</sup>。P-TEFb是由细胞周期蛋白T1和细胞周期蛋白依赖性激酶9(cyclin dependent kinase, CDK9)组成的复合物, 可调控基因转录。RNA聚合酶II(RNA polymerase II, RNA Pol II)在启动子处启动转录, 但由于负性延伸因子和敏感性诱导因子的作用, 使得RNA Pol II在启动子近端处暂停, 导致转录无法延伸。在人体内, 由BRD4招募P-TEFb至基因的启动子区域, 随后CDK9磷酸化RNA Pol II的羧基末端结构域以及负性延伸因子和敏感性诱导因子, 解除转录抑制, 促进转录延伸。而在HIV-1的转录过程中, 由Tat招募P-TEFb并与反式激活应答元件(transactivation response, TAR)结合, 介导P-TEFb重新启动转录延伸。因而, 在HIV-1感染的细胞内, BRD4与Tat竞争性结合P-TEFb, 抑制BRD4可促进Tat介导的HIV-1的转录, 从而激活潜伏的病毒储库<sup>[42]</sup>。

2019年, Liang等<sup>[43]</sup>报道了一个对BRD4具有高选择性的BET抑制剂化合物**17**(图8)。在潜伏细胞系Jurkat T细胞和ACH-2细胞中, 该化合物均以剂量依赖性和时间依赖性的方式激活潜伏的HIV-1。实时荧光定量逆转录PCR试验结果显示**17**在 $1\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下可激活从患者体内分离的CD4<sup>+</sup>T细胞中HIV-1的表达。此外, **17**还能下调细胞表面受体CD4和辅助受体CXCR4、CCR5, 可抑制HIV-1引发新一轮感染。**17**的细胞毒性较低, 在Jurkat T细胞、ACH-2细胞和入外周血单核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)等细胞系中的 $\text{CC}_{50}$ 在 $124.94\sim 358.17\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内。机制研究表明, **17**可使得P-TEFb从BRD4处解离, 进而促进Tat与P-TEFb结合, 提高病毒的转录水平。此外, **17**可提高CDK9在Thr186处的磷酸化水平, 从而提高CDK9的催化活性。

BET抑制剂化合物**18**(图8)作为晚期实体瘤和血液系统恶性肿瘤的单一疗法或与尼沃单抗联用, 已进入I/IIa期临床试验。2022年, Huang等<sup>[44]</sup>发现**18**在J-Lat潜伏细胞系中具有良好的潜伏激活作用( $\text{EC}_{50} = 30.82\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 且分别与抗逆转录病毒药物齐多夫定、奈韦拉平和茚地那韦联用后, 仍保持高水平的潜伏激活作用。此外, **18**可显著提高从患者体内分离的PBMCs中的HIV-1 RNA水平, 且细胞毒性低( $\text{CC}_{50} > 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , MTT法); 流式细胞术检测结果表明**18**

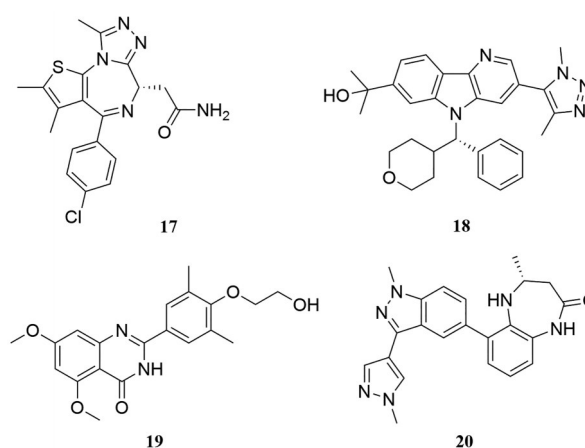


Figure 8 The structures of compounds 17–20

不会引起CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的全面活化, 说明其具有较高的安全性。WB试验结果表明该化合物通过提高CDK9的磷酸化水平, 促进CDK9的激活, 从而增强HIV-1的转录。

化合物**19**(图8)是选择性结合于BD2的BET抑制剂, 已进入III期临床试验, 评估其对高危心血管疾病、血脂异常等疾病的疗效。2019年, Zhang等<sup>[45]</sup>报道**19**在 $10\sim 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内可激活多种潜伏细胞系和从患者体内分离的CD4<sup>+</sup>T细胞中HIV-1表达, 且与HDAC抑制剂或PKC激动剂具有潜伏激活协同作用。此外, **19**还能降低细胞表面的HIV辅助受体CCR5和CXCR4的表达, 说明其可以降低细胞对HIV-1的易感性。CCK-8细胞实验表明, **19**在不同细胞系中的 $\text{CC}_{50}$ 均大于 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 具有较低的细胞毒性。机制研究表明, **19**可提高CDK9在Thr186处的磷酸化水平, 减少BRD4与启动子的结合, 从而促进Tat介导的转录延伸, 激活HIV-1的表达。此外, **19**以剂量依赖性的方式诱导ACH-2细胞发生G1/G0细胞周期阻滞, 从而选择性诱导潜伏细胞凋亡。

Tat相互作用蛋白(Tat-interactive protein, TIP60)是一个相对分子质量为60 kD的乙酰转移酶, 可以乙酰化组蛋白H4的赖氨酸位点。乙酰化组蛋白H4是募集BRD4至HIV-1启动子的关键因子之一, 因此抑制TIP60可以减少BRD4与HIV-1启动子的结合, 从而促进Tat招募P-TEFb。2021年, Zheng等<sup>[46]</sup>报道了一个BRD4和TIP60的双重抑制剂**20**(图8), **20**在多种潜伏细胞系中均能诱导HIV-1的表达, 且 $\text{CC}_{50}$ 在 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。流式细胞术检测结果表明, **20**不会引起T细胞的全面活化和刺激炎症因子的产生, 而且能减少由PKC激动剂引起的细胞炎症因子的释放, 说明其安全性良好。用**20**处理ACH-2细胞48 h后, 检测到TIP60水平下调、BRD4招募的P-TEFb显著减少而CDK9的

磷酸化水平增加, 这表明 **20** 通过抑制 BRD4 和 TIP60, 从而促进 Tat 与 P-TEFb 的结合, 增强 HIV-1 的转录。

**1.6 信号传导和转录激活蛋白 5 (signal transducer and activator of transcription 5, STAT5) SUMO 化修饰抑制剂** STAT5 是一种能与特定的 DNA 结合并调控相应基因表达的蛋白质。STAT5 经 SUMO 化修饰后以非活性形式存在于细胞质中, 而发生磷酸化修饰后, STAT5 被激活并转移至细胞核中调节基因表达。2017 年, Bosque 等<sup>[47]</sup>发现苯并三唑类化合物与苯并三嗪类化合物通过抑制 STAT5 的 SUMO 化修饰来发挥潜伏激活作用, 其中苯并三嗪类化合物 **21** (图 9) 具有最强的潜伏激活作用。2020 年, Sorensen 等<sup>[48]</sup>测试了 **21** 和 23 个市售的苯并三嗪类化合物对 STAT5 的 SUMO 化修饰的抑制活性, 其中包括 **21** 在内的 8 个化合物表现出抑制作用。随后, 测试这些化合物对 STAT5 磷酸化的作用, 结果显示化合物 **21**~**24** (图 9) 以剂量依赖性的方式增加 STAT5 的磷酸化水平并激活潜伏的 HIV-1。

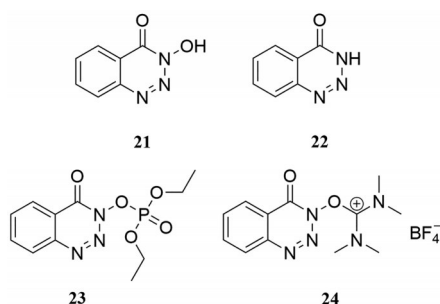


Figure 9 The structures of compounds 21–24

**1.7 家族锌指转录因子 1 (ikaros family zinc finger 1, IKZF1) 降解剂** 2022 年, Ne 等<sup>[49]</sup>采用 dCas9 靶向染色体和组蛋白富集策略结合质谱分析, 发现 IKZF1 是参与 HIV-1 潜伏库形成的宿主蛋白。IKZF1 通过与多梳抑制复合物 2 (polycomb repressive complex 2, PRC2) 相互作用, 促进 PRC2 催化组蛋白 H3 的 Lys27 三甲基化, 使基因处于低水平表达状态或基因表达沉默<sup>[50]</sup>。敲除 J-Lat A2 细胞中的 IKZF1, 可显著提高 HIV-1 的表达。沙利度胺衍生的免疫调节药物对 E3 泛素连接酶底物识别受体 CRBN (cereblon) 具有较高的亲和力, 可介导 IKZF1 的泛素化降解<sup>[51]</sup>。化合物 **25** (iberdomide, 图 10) 对 CRBN 具有高度的亲和力, 正处于临床试验阶段。用 **25** 处理 HIV-1 潜伏感染的原代 CD4<sup>+</sup> T 细胞, 可观察到显著的 HIV-1 激活且不会引起 T 细胞的全面活化。此外, 已被美国 FDA 批准上市的来那度胺 (**26**, lenalidomide, 图 10) 和泊马度胺 (**27**, pomalidomide, 图 10), 同样能促进 IKZF1 的泛素化降解从而激活潜伏病毒。

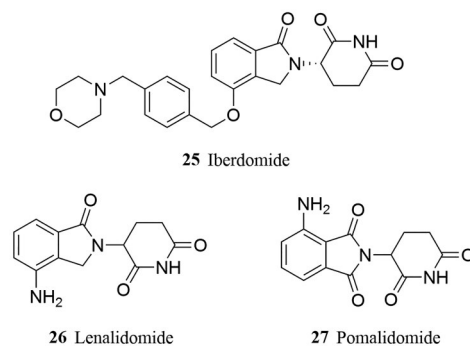


Figure 10 The structures of compounds 25–27

### 1.8 Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 激动剂

TLRs 是一类模式识别受体, 可以识别侵入机体的病原体和内源性损伤信号, 进而启动炎症应答信号通路, 诱导细胞分泌炎症因子, 增强免疫激活反应<sup>[52]</sup>。2019 年, Cen 等<sup>[53]</sup>从 14 000 个化合物中筛选出可结合 TLR1 进而激活 TLR2 的化合物 **28** (图 11)。**28** 能上调 CD8<sup>+</sup> T 细胞、NK 细胞和树突状细胞水平, 具有免疫调节作用。2021 年, Duan 等<sup>[54]</sup>发现化合物 **28** 通过激活 TLR2, 从而促进 PBMCs 产生炎症细胞因子, 如肿瘤坏死因子  $\alpha$  和白细胞介素-6, 最终激活潜伏的病毒。**28** 在 U1 潜伏细胞系中也以剂量依赖性和时间依赖性的方式激活 HIV-1 表达。转录组学分析和 WB 试验结果均表明 **28** 活化 TLR2 后可激活其下游信号通路如 NF- $\kappa$ B 通路和促分裂原活化蛋白激酶通路, 进而促进 HIV-1 的表达。流式细胞术检测结果显示 **28** 可以激活单核细胞、NK 细胞、B 细胞和部分 T 细胞, 且不引起 T 细胞广泛性活化。此外, **28** 能促使 NK 细胞分泌颗粒酶 CD107a 及 IFN- $\gamma$ , 从而增强其毒性功能。上述结果说明 **28** 具有激活潜伏库和杀死病毒的双重作用。

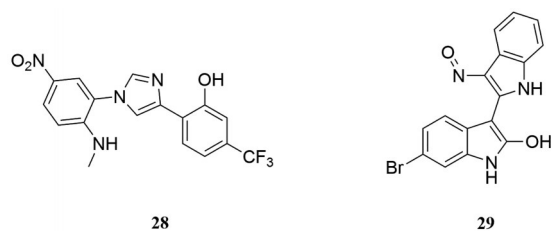


Figure 11 The structures of compounds 28 and 29

### 1.9 糖原合酶激酶-3 (glycogen synthase kinase-3, GSK-3) 抑制剂

Wnt 下游的  $\beta$ -catenin/TCF1 信号通路已被证实是 HIV-1 转录的正调控因子<sup>[55]</sup>。GSK-3 是 Wnt 信号通路的负调控因子, 可促进  $\beta$ -catenin 的磷酸化, 从而促进  $\beta$ -catenin 的降解。因此, 抑制 GSK-3 可激活 Wnt 信号通路, 进而提高 HIV-1 的转录水平。2022 年, Wen 等<sup>[56]</sup>报道 GSK-3 抑制剂 **29** (图 11) 在 ACH-2 细胞

系和 Jurkat T 细胞系中均以剂量依赖性的方式激活 HIV-1 表达。为进一步验证 **29** 的潜伏激活作用, 研究人员用  $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 **29** 处理从患者体内分离的 PBMCs, 观察到细胞内 HIV-1 mRNA 水平显著升高。此外, **29** 还能激活感染 SIV 的恒河猴体内的潜伏病毒。机制研究表明 **29** 通过降低  $\beta$ -catenin 的磷酸化水平, 促进  $\beta$ -catenin 转运至细胞核与 TCF1 结合, 增强 TCF1 与 HIV-1 的启动子结合和改变组蛋白的表观遗传修饰, 最终激活 HIV-1 的表达。

## 2 潜伏促进剂

不同于潜伏激活剂, 潜伏促进剂通过调节宿主因子或者病毒因子来抑制 HIV-1 的复制, 促使潜伏病毒进入深度潜伏状态, 从而推迟或避免停药后的病毒反弹。根据作用机制的不同, 可分为晶状体上皮源性生长因子抑制剂、组蛋白去甲基化酶抑制剂、Tat 抑制剂和 Rev 抑制剂等。

### 2.1 晶状体上皮源性生长因子 (lens epithelium-derived growth factor, LEDGF) 抑制剂

LEDGF 又称为 p75 蛋白, 是 HIV-1 整合酶的辅助因子, 可增加整合酶的稳定性和促使病毒 DNA 整合至宿主基因组上<sup>[57]</sup>。LEDGF 抑制剂通过干扰整合酶-LEDGF 的相互作用来抑制 HIV-1 的复制。2021 年, Bruggemans 等<sup>[58]</sup>报道的 LEDGF 抑制剂化合物 **30** (图 12) 对野生型 HIV-1 具有良好的抗病毒活性 ( $\text{EC}_{50} = 2.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。此外, **30** 在纳摩尔水平浓度下可促进 HIV-1 潜伏, 抑制潜伏病毒再激活。机制研究表明 **30** 通过改变病毒 DNA 的整合位点, 使病毒 DNA 整合至转录沉默的基因序列中, 从而促进 HIV-1 潜伏。**30** 作为临床前候选药物, 具有较高的体外代谢稳定性和良好的口服药代动力学性质。但在食蟹猴体内试验发现 **30** 具有尿路毒性, 阻碍其后续研究<sup>[59]</sup>。

为进一步探究 LEDGF 抑制剂对 HIV-1 潜伏库的影响, Janssens 等<sup>[60]</sup>采用单细胞分支 DNA 成像技术, 测定 LEDGF 抑制剂化合物 **31** (图 12) 对 HIV-1 的整合位点、转录水平、潜伏激活的影响。实验结果表明 **31** 以剂量依赖性的方式抑制病毒转录和潜伏库再激活。但是, 即使在  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的浓度下, **31** 也不能完全抑制 HIV-1 复制, 说明单独使用 LEDGF 抑制剂并不能完全阻断病毒复制。机制研究表明 **31** 可使前病毒整合至转录沉默的基因序列中, 从而降低病毒的转录水平。

### 2.2 Tat 抑制剂

如 1.5 小节所述, Tat 是 HIV-1 进行转录延伸不可或缺的蛋白质。当 Tat 蛋白水平低于阈值时, 病毒的转录将停滞在转录起始阶段, 无法进行转录延伸。2021 年, Zhou 等<sup>[61]</sup>报道化合物 **32** (图 12) 可有效抑制 HIV-1 潜伏库的再激活, 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下可消除 PKC 激动剂的潜伏激活效应。WB 试验结果表明 **32** 可诱导 Tat 蛋白的降解, 从而阻断 Tat 介导的转录延伸。此外, **32** 可降低促核染色质转录因子 (facilitates chromatin transcription, FACT) 的表达。FACT 蛋白是组蛋白伴侣蛋白, 可以促进 RNA Pol II 介导的转录。因此, 降低 FACT 蛋白的水平可抑制病毒的转录。**32** 可诱导 HIV-1 潜伏感染细胞的选择性凋亡。**32** 具有较低的细胞毒性 ( $\text{CC}_{50} = 68.63 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。流式细胞术检测表明 **32** 不会诱导 T 细胞的全面活化。

### 2.3 Rev 抑制剂

HIV-1 Rev 是介导未剪接和部分剪接的病毒 mRNA 从细胞核转运至细胞质的重要调控蛋白。当 Rev 不能正常发挥其功能时, 病毒 mRNA 将在细胞核内被降解, 导致 HIV-1 的复制被阻断。化合物 **33** (图 12) 是一个强效的潜伏促进剂, 其通过与帽结合复合物直接结合来抑制 Rev 介导的 mRNA 转运<sup>[62]</sup>。在一项非随机、开放标签的 Ib/IIa 临床试验中, **33** 表现

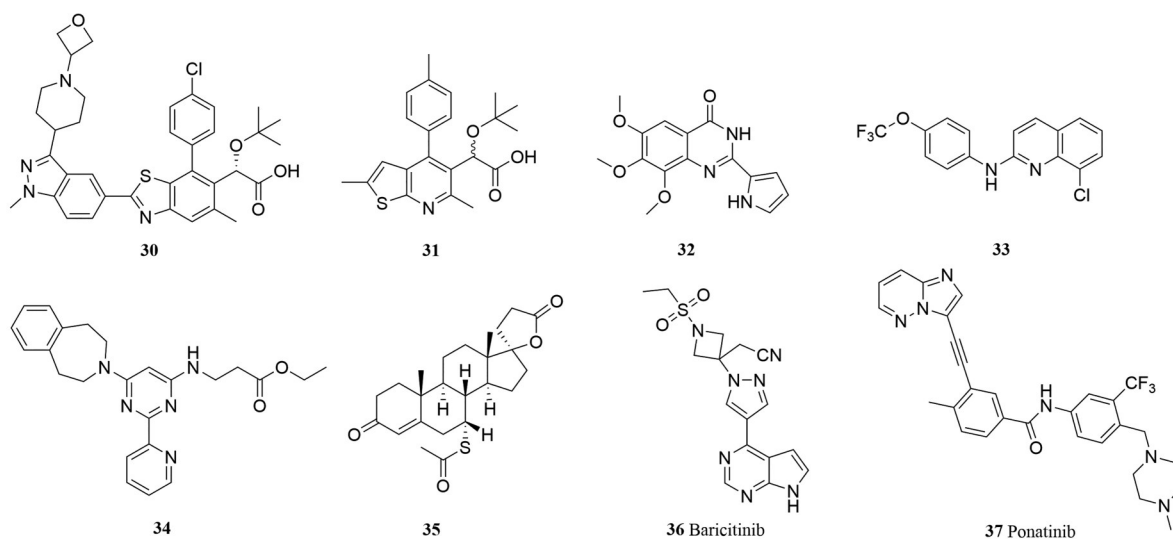


Figure 12 The structures of compounds 30–37

出降低 HIV-1 潜伏储库、慢性免疫激活和慢性炎症的三重作用<sup>[63]</sup>。但遗憾的是, **33** 的作用短暂, 停止用药后即恢复到原状。尽管如此, **33** 的安全性良好, 在临床试验中没有受试者发生严重的不良反应。

## 2.4 组蛋白去甲基化酶抑制剂

组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化是转录抑制的标志<sup>[64]</sup>。组蛋白去甲基化酶 UTX 可降低其甲基化水平进而促进转录。因此, 抑制 UTX 可提高组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化水平, 从而抑制病毒基因的转录, 促进病毒潜伏。2021 年, Nguyen 等<sup>[65]</sup>报道敲除潜伏细胞中 UTX 或使用 UTX 抑制剂 **34** (图 12), 均能抑制潜伏病毒的再激活。除了增强组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸的三甲基化, **34** 还通过促进 DNA 甲基转移酶 3A 募集至 HIV-1 启动子, 进而提高 DNA 甲基化水平最终抑制病毒转录。然而, 当停止给药 **34** 后, 潜伏细胞中组蛋白和 DNA 甲基化水平恢复到初始状态, 说明通过组蛋白和 DNA 甲基化诱导表观遗传沉默难以长期沉默 HIV-1 前病毒。

## 2.5 着色性干皮病 b 组 (xeroderma pigmentosum group b, XPB) 蛋白抑制剂

XPB 蛋白是通用转录因子 TFIIH 的重要亚基, 可在转录起始位点局部解开 DNA 双链从而促进转录起始。因此, 抑制 XPB 亚基可干扰病毒的转录, 从而抑制潜伏病毒的再激活。螺内酯 (**35**, 图 12) 是一种醛固酮竞争性抑制剂, 用于治疗水肿性疾病。近年来, 有研究证明螺内酯可诱导 XPB 的蛋白酶体降解<sup>[66-68]</sup>, 从而抑制急性 HIV 感染<sup>[69]</sup>。2021 年, Mori 等<sup>[70]</sup>报道螺内酯在潜伏细胞系中以剂量依赖性的方式抑制 HIV-1 的转录, 且能显著降低潜伏激活剂的效应。WB 试验结果说明螺内酯通过诱导 XPB 的降解从而抑制 HIV-1 的复制。螺内酯具有强效的抗 HIV-1 作用, 不需联合使用抗逆转录病毒药物, 仅用螺内酯就可阻断细胞中 HIV-1 的复制。但停止给药后, HIV-1 的复制水平迅速提升, 细胞中的 XPB 蛋白含量也恢复到正常水平, 说明螺内酯不具有长效的表观遗传控制作用。

## 2.6 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) 抑制剂

JAK 是一类非受体型酪氨酸激酶, 通过催化其下游底物 STAT 的酪氨酸磷酸化从而发挥促进细胞生长、抗凋亡和调节免疫系统等重要作用。JAK 抑制剂 **36** (baricitinib, 图 12) 于 2018 年被美国 FDA 批准治疗类风湿性关节炎。2021, de Armas 等<sup>[71]</sup>发现 **36** 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下可显著减少 HIV-1 潜伏感染细胞的数量。其可能的机制为 JAK 抑制剂可降低细胞的活化水平从而阻断 HIV-1 诱导的细胞活化, 通过促进细胞的凋亡从而减少潜伏感染细胞的数量。

## 2.7 AKT/mTOR 抑制剂

如 1.3 小节所述, AKT-mTOR 信号通路通过激活 NF- $\kappa$ B 从而促进病毒转录。因此, 抑制 AKT-mTOR 信号通路可降低病毒的复制水平。2023 年, Huang 等<sup>[72]</sup>采用高通量筛选, 从 1 701 个美国 FDA 批准上市的小分子化合物库中筛选出潜伏促进剂帕纳替尼 (**37**, ponatinib, 图 12)。帕纳替尼是酪氨酸激酶抑制剂, 临床上用于治疗慢性粒细胞白血病和急性淋巴细胞白血病。研究者发现帕纳替尼在不同的潜伏细胞系和从患者体内分离的 CD4<sup>+</sup> T 细胞中均能抑制潜伏激活剂诱导的 HIV-1 激活效应, 且不具有明显的细胞毒性。WB 试验结果表明帕纳替尼通过降低 AKT 和 mTOR 的磷酸化水平进而抑制病毒复制, 促进病毒潜伏。

## 3 总结与展望

病毒潜伏库是当前治愈艾滋病的主要障碍。为调控 HIV-1 潜伏库, 实现功能性治愈, 人们提出“激活并杀死”和“阻滞并锁定”两种策略, 使用潜伏库调控剂“激活”或“沉默”潜伏库。药物重定位、天然产物活性物质的分离与筛选和高通量筛选等药物化学策略的运用, 成功发现了多种小分子潜伏库调控剂。随后, 采用荧光素酶实验、定量病毒生长实验、实时荧光定量逆转录 PCR 实验和流式细胞术等实验测定化合物的潜伏库调控活性。WB 实验、染色质免疫共沉淀实验、蛋白质组学分析、转录组学分析等方法的综合运用确证化合物的作用机制。

迄今为止, 已有上百种化合物被确证为潜伏激活剂, 其中数个候选药物已进入临床试验, 如 HDAC 抑制剂 panobinostat、vorinostat、romidespin 和 PKC 激动剂 prostratin、bryostatin-1 等, 但它们的临床试验结果并未达到预期<sup>[15,73,74]</sup>。当前发现的 HDAC 抑制剂虽然可以激活潜伏的 HIV-1 转录, 但不能有效地减少 HIV-1 潜伏库。这可能是由于 HIV-1 潜伏库形成机制的复杂性和异质性<sup>[75]</sup>, 导致潜伏激活剂的对不同潜伏细胞的作用不同<sup>[76,77]</sup>。此外, 在未及时接受 ART 的患者中, 绝大多数的潜伏细胞存在 CTL 逃逸突变, 导致被激活的潜伏细胞不一定能被免疫系统杀死<sup>[78]</sup>。PKC 激动剂是目前最有效的潜伏激活剂, 但其可能会引起 T 细胞的全面活化从而带来不良反应<sup>[79]</sup>。为增强潜伏激活效应和减少不良反应, 可以联合使用几种机制不同的潜伏激活剂。此外, 应增强机体的免疫应答或诱导潜伏感染细胞凋亡以强化“杀死”阶段。TLR 激动剂和 SMAC 模拟物具有激活潜伏库和增强宿主免疫功能的双重作用, 因此是潜伏激活剂研究的重要方向。

潜伏促进剂虽然研究较晚, 但其展现了巨大的潜力与优势。潜伏促进剂能阻断病毒的复制, 与抗逆转录病毒药物具有协同作用。此外, 靶向病毒因子所引

起的不良反应小,不会引起免疫激活。但目前的潜伏促进剂不能长期阻断潜伏库的再激活,开发能长期甚至彻底锁定潜伏库的沉默状态的潜伏促进剂是未来研究的目标。

虽然目前没有潜伏库调控剂上市,但随着结构生物学的快速发展, HIV-1 潜伏库的形成机制将更加清晰,为药物设计提供更多的指导信息。此外,参与潜伏库形成的生物大分子大多在其他疾病中已有深入研究,采用药物重定位策略,结合高通量筛选技术能快速发现优良的潜伏库调控剂。另外,针对 HIV-1 潜伏库的形成所涉及的宿主因子和病毒因子十分复杂的特点,除了联合用药,还可以设计单分子多靶点药物,以期获得活性高、毒性低的潜伏库调控剂。近年来,以蛋白靶向嵌合体技术和核酸降解技术为特征的多特异性结合策略逐步在抗病毒领域受到关注,有望成为调控 HIV-1 潜伏库关键蛋白或核酸的新途径<sup>[80]</sup>。最后,“激活并杀死”和“阻滞并锁定”虽然是两种截然相反的策略,但在治疗策略上并不是非此即彼,可以联合使用以期实现艾滋病的功能性治愈。接受 HAART 的 HIV-1 患者序贯服用潜伏库调控剂,先使用潜伏激活剂清除容易被激活的潜伏感染细胞,随后使用潜伏促进剂使难以被激活的潜伏病毒进入深度潜伏状态,从而实现功能性治愈。

**作者贡献:** 展鹏对论文进行整体的构思和修改;代娇娇负责全文的撰写;姜向毅、封达和林浩对论文进行修改;刘新泳对论文进行整体的指导。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Menéndez-Arias L, Delgado R. Update and latest advances in antiretroviral therapy [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2022, 43: 16-29.
- [2] García F, Plana M, Vidal C, et al. Dynamics of viral load rebound and immunological changes after stopping effective antiretroviral therapy [J]. *AIDS*, 1999, 13: F79-86.
- [3] Eisele E, Siliciano RF. Redefining the viral reservoirs that prevent HIV-1 eradication [J]. *Immunity*, 2012, 37: 377-388.
- [4] Finzi D, Hermankova M, Pierson T, et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy [J]. *Science*, 1997, 278: 1295-1300.
- [5] Sharova N, Swingle C, Sharkey M, et al. Macrophages archive HIV-1 virions for dissemination *in trans* [J]. *EMBO J*, 2005, 24: 2481-2489.
- [6] Ganor Y, Real F, Sennepin A, et al. HIV-1 reservoirs in urethral macrophages of patients under suppressive antiretroviral therapy [J]. *Nat Microbiol*, 2019, 4: 633-644.
- [7] Lorenzo-Redondo R, Fryer HR, Bedford T, et al. Persistent HIV-1 replication maintains the tissue reservoir during therapy [J]. *Nature*, 2016, 530: 51-56.
- [8] Lenasi T, Contreras X, Peterlin BM. Transcriptional interference antagonizes proviral gene expression to promote HIV latency [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4: 123-133.
- [9] Verdikt R, Hernalsteens O, Van Lint C. Epigenetic mechanisms of HIV-1 persistence [J]. *Vaccines*, 2021, 9: 514.
- [10] Hokello J, Sharma AL, Tyagi M. Efficient non-epigenetic activation of HIV latency through the T-cell receptor signalosome [J]. *Viruses*, 2020, 12: 868.
- [11] Karn J. The molecular biology of HIV latency: breaking and restoring the Tat-dependent transcriptional circuit [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2011, 6: 4-11.
- [12] Yukl SA, Kaiser P, Kim P, et al. HIV latency in isolated patient CD4<sup>+</sup> T cells may be due to blocks in HIV transcriptional elongation, completion, and splicing [J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10: eaap9927.
- [13] Chiang K, Sung TL, Rice AP. Regulation of cyclin T1 and HIV-1 replication by microRNAs in resting CD4<sup>+</sup> T lymphocytes [J]. *J Virol*, 2012, 86: 3244-3252.
- [14] Deeks SG. HIV: shock and kill [J]. *Nature*, 2012, 487: 439-440.
- [15] Fidler S, Stöhr W, Pace M, et al. Antiretroviral therapy alone *versus* antiretroviral therapy with a kick and kill approach, on measures of the HIV reservoir in participants with recent HIV infection (the RIVER trial): a phase 2, randomised trial [J]. *Lancet*, 2020, 395: 888-898.
- [16] Kessing CF, Nixon CC, Li C, et al. *In vivo* suppression of HIV rebound by didehydro-cortistatin A, a "block-and-lock" strategy for HIV-1 treatment [J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 600-611.
- [17] Gregoretti IV, Lee YM, Goodson HV. Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis [J]. *J Mol Biol*, 2004, 338: 17-31.
- [18] Keedy KS, Archin NM, Gates AT, et al. A limited group of class I histone deacetylases acts to repress human immunodeficiency virus type 1 expression [J]. *J Virol*, 2009, 83: 4749-4756.
- [19] Jones RB, O'Connor R, Mueller S, et al. Histone deacetylase inhibitors impair the elimination of HIV-infected cells by cytotoxic T-lymphocytes [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: 1004287.
- [20] Lu W, Yang C, Xu X, et al. A novel selective histone deacetylase I inhibitor CC-4a activates latent HIV-1 through NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Life Sci*, 2021, 267: 118427.
- [21] Bresciani A, Ontoria JM, Biancofiore I, et al. Improved selective class I HDAC and novel selective HDAC3 inhibitors: beyond hydroxamic acids and benzamides [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2019, 10: 481-486.
- [22] Liu J, Kelly J, Yu W, et al. Selective class I HDAC inhibitors based on aryl ketone zinc binding induce HIV-1 protein for clearance [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 1476-1483.
- [23] Feng ZM. Investigation on the Mechanism of Daphnane Diterpene NB6 and Resveratrol Activating Latent HIV (瑞香烷型二

- 萜化合物 NB6 及白藜芦醇激活潜伏 HIV 作用机制的研究 [D]. Xiamen: Xiamen University, 2019.
- [24] Tembeni B, Sciorillo A, Invernizzi L, et al. HPLC-based purification and isolation of potent anti-HIV and latency reversing daphnane diterpenes from the medicinal plant *Gnidia sericocephala* (thymelaeaceae) [J]. *Viruses*, 2022, 14: 1437.
- [25] Lai W, Huang L, Zhu L, et al. Gnidimacrin, a potent anti-HIV diterpene, can eliminate latent HIV-1 *ex vivo* by activation of protein kinase C  $\beta$  [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 8638-8646.
- [26] Liu Q, Cheng YY, Li W, et al. Synthesis and structure-activity relationship correlations of gnidimacrin derivatives as potent HIV-1 inhibitors and HIV latency reversing agents [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 6958-6971.
- [27] Li SF, Liang X, Wu XK, et al. Discovering the mechanisms of wikstroelide E as a potential HIV-latency-reversing agent by transcriptome profiling [J]. *J Nat Prod*, 2021, 84: 1022-1033.
- [28] De la Torre-Tarazona HE, Jiménez R, Bueno P, et al. 4-Deoxyphorbol inhibits HIV-1 infection in synergism with antiretroviral drugs and reactivates viral reservoirs through PKC/MEK activation synergizing with vorinostat [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 177: 113937.
- [29] Nacro K, Bienfait B, Lee J, et al. Conformationally constrained analogues of diacylglycerol (DAG). 16. How much structural complexity is necessary for recognition and high binding affinity to protein kinase C? [J]. *J Med Chem*, 2000, 43: 921-944.
- [30] Matsuda K, Kobayakawa T, Kariya R, et al. A therapeutic strategy to combat HIV-1 latently infected cells with a combination of latency-reversing agents containing DAG-lactone PKC activators [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 636276.
- [31] Katti SS, Krieger IV, Ann J, et al. Structural anatomy of protein kinase C C1 domain interactions with diacylglycerol and other agonists [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2695.
- [32] Ishii T, Kobayakawa T, Matsuda K, et al. Synthesis and evaluation of DAG-lactone derivatives with HIV-1 latency reversing activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 256: 115449.
- [33] Bridges D, Saltiel AR. Phosphoinositides: key modulators of energy metabolism [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1851: 857-866.
- [34] Dan HC, Ebbs A, Pasparakis M, et al. Akt-dependent activation of mtorc1 complex involves phosphorylation of mTOR (mammalian target of rapamycin) by I $\kappa$ B kinase  $\alpha$  (IKK $\alpha$ ) [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289: 25227-25240.
- [35] Gramatica A, Schwarzer R, Brantley W, et al. Evaluating a new class of Akt/ mTOR activators for HIV latency-reversing activity *ex vivo* and *in vivo* [J]. *J Virol*, 2021, 95: e02393-20.
- [36] Fulda S. Smac mimetics as IAP antagonists [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2015, 39: 132-138.
- [37] Pache L, Dutra MS, Spivak AM, et al. BIRC2/cIAP1 suppresses HIV-1 transcription and can be targeted by Smac mimetics to promote reversal of viral latency [J]. *Cell Host Microbe*, 2015, 18: 345-353.
- [38] Cossu F, Milani M, Mastrangelo E, et al. Structural basis for bivalent Smac-mimetics recognition in the IAP protein family [J]. *J Mol Biol*, 2009, 392: 630-644.
- [39] Pache L, Marsden MD, Teriete P, et al. Pharmacological activation of non-canonical NF- $\kappa$ B signaling activates latent HIV-1 reservoirs *in vivo* [J]. *Cell Rep Med*, 2020, 1: 100037.
- [40] Nixon CC, Mavigner M, Sampey GC, et al. Systemic HIV and SIV latency reversal *via* non-canonical NF- $\kappa$ B signalling *in vivo* [J]. *Nature*, 2020, 578: 160-165.
- [41] Guo J, Zheng Q, Peng Y. BET proteins: biological functions and therapeutic interventions [J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 243: 108354.
- [42] Bisgrove DA, Mahmoudi T, Henklein P, et al. Conserved P-TEFb-interacting domain of BRD4 inhibits HIV transcription [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 13690-13695.
- [43] Liang T, Zhang X, Lai F, et al. A novel bromodomain inhibitor, CPI-203, serves as an HIV-1 latency-reversing agent by activating positive transcription elongation factor b [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 164: 237-251.
- [44] Huang XS, Tian RR, Ma MD, et al. Bromodomain and extraterminal inhibitor BMS-986158 reverses latent HIV-1 infection *in vitro* and *ex vivo* by increasing CDK9 phosphorylation and recruitment [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15: 338.
- [45] Zhang X, Lin J, Liang T, et al. The BET bromodomain inhibitor apabetalone induces apoptosis of latent HIV-1 reservoir cells following viral reactivation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 98-110.
- [46] Zheng T, Chen P, Huang Y, et al. CPI-637 as a potential bifunctional latency-reversing agent that targets both the BRD4 and TIP60 proteins [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 686035.
- [47] Bosque A, Nilson KA, Macedo AB, et al. Benzotriazoles reactivate latent HIV-1 through inactivation of STAT5 SUMOylation [J]. *Cell Rep*, 2017, 18: 1324-1334.
- [48] Sorensen ES, Macedo AB, Resop RS, et al. Structure-activity relationship analysis of benzotriazine analogues as HIV-1 latency-reversing agents [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e00888-20.
- [49] Ne E, Crespo R, Izquierdo-Lara R, et al. Catchet-MS identifies IKZF1-targeting thalidomide analogues as novel HIV-1 latency reversal agents [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: 5577-5598.
- [50] Oravec A, Apostolov A, Polak K, et al. Ikaros mediates gene silencing in T cells through polycomb repressive complex 2 [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8823.
- [51] Schafer PH, Ye Y, Wu L, et al. Cereblon modulator iberdomide induces degradation of the transcription factors Ikaros and Aiolos: immunomodulation in healthy volunteers and relevance to systemic lupus erythematosus [J]. *Ann Rheum Dis*, 2018, 77: 1516-1523.
- [52] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*,

- 2011, 34: 637-650.
- [53] Cen X, Zhu G, Yang J, et al. TLR1/2 specific small-molecule agonist suppresses leukemia cancer cell growth by stimulating cytotoxic T lymphocytes [J]. *Adv Sci*, 2019, 6: 1802042.
- [54] Duan S, Xu X, Wang J, et al. TLR1/2 agonist enhances reversal of HIV-1 latency and promotes NK cell-induced suppression of HIV-1-infected autologous CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *J Virol*, 2021, 95: e00816-21.
- [55] Waterman ML, Fischer WH, Jones KA. A thymus-specific member of the HMG protein family regulates the human T cell receptor enhancer [J]. *Genes Dev*, 1991; 5: 656-669.
- [56] Wen J, Li X, Zhao QX, et al. Pharmacological suppression of glycogen synthase kinase-3 reactivates HIV-1 from latency via activating Wnt/ $\beta$ -catenin/TCF1 axis in CD4<sup>+</sup> T cells [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11: 391-405.
- [57] Poeschla EM. Integrase, LEDGF/p75 and HIV replication [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2008, 65: 1403-1424.
- [58] Bruggemans A, Vansant G, Balakrishnan M, et al. GS-9822, a preclinical LEDGIN candidate, displays a block-and-lock phenotype in cell culture [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65: e02328-20.
- [59] Roberts RA, Campbell RA, Sikakana P, et al. Species-specific urothelial toxicity with an anti-HIV noncatalytic site integrase inhibitor (NCINI) is related to unusual pH-dependent physico-chemical changes [J]. *Toxicol Sci*, 2021, 183: 105-116.
- [60] Janssens J, De Wit F, Parveen N, et al. Single-cell imaging shows that the transcriptional state of the HIV-1 provirus and its reactivation potential depend on the integration site [J]. *MBio*, 2022, 13: e00007-22.
- [61] Zhou C, Huang Y, Li Y, et al. A new small-molecule compound, Q308, silences latent HIV-1 provirus by suppressing Tat- and FACT-mediated transcription [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65: e00470-21.
- [62] Campos N, Myburgh R, Garcel A, et al. Long lasting control of viral rebound with a new drug ABX464 targeting Rev-mediated viral RNA biogenesis [J]. *Retrovirology*, 2015, 12: 30.
- [63] Bernal S, Puertas MC, Morón-López S, et al. Impact of obefazimod on viral persistence, inflammation, and immune activation in people with HIV on suppressive antiretroviral therapy [J]. *J Infect Dis*, 2023. DOI: 10.1093/infdis/jiad251.
- [64] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function [J]. *Cell*, 2007, 128: 693-705.
- [65] Nguyen K, Dobrowolski C, Shukla M, et al. Inhibition of the H3K27 demethylase UTX enhances the epigenetic silencing of HIV proviruses and induces HIV-1 DNA hypermethylation but fails to permanently block HIV reactivation [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17: e1010014.
- [66] Alekseev S, Ayadi M, Brino L, et al. A small molecule screen identifies an inhibitor of DNA repair inducing the degradation of TFIIH and the chemosensitization of tumor cells to platinum [J]. *Chem Biol*, 2014, 21: 398-407.
- [67] Elinoff JM, Chen LY, Dougherty EJ, et al. Spironolactone-induced degradation of the TFIIH core complex XPB subunit suppresses NF- $\kappa$ B and AP-1 signalling [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114: 65-76.
- [68] Ueda M, Matsuura K, Kawai H, et al. Spironolactone-induced XPB degradation depends on CDK7 kinase and SCFFBXL18 E3 ligase [J]. *Genes Cells*, 2019, 24: 284-296.
- [69] Lacombe B, Morel M, Margottin-Goguet F, et al. Specific inhibition of HIV infection by the action of spironolactone in T cells [J]. *J Virol*, 2016, 90: 10972-10980.
- [70] Mori L, Jenike K, Yeh YJ, et al. The XPB subunit of the TFIIH complex plays a critical role in HIV-1 transcription, and XPB inhibition by spironolactone prevents HIV-1 reactivation from latency [J]. *J Virol*, 2021, 95: e01247-20.
- [71] de Armas LR, Gavegnano C, Pallikkuth S, et al. The effect of JAK1/2 inhibitors on HIV reservoir using primary lymphoid cell model of HIV latency [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 720697.
- [72] Huang T, Cai J, Wang P, et al. Ponatinib represses latent HIV-1 by inhibiting AKT-mTOR [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67: e00067-23.
- [73] Rasmussen TA, Tolstrup M, Brinkmann CR, et al. Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial [J]. *Lancet HIV*, 2014, 1: e13-21.
- [74] McMahon DK, Zheng L, Cyktor JC, et al. A phase 1/2 randomized, placebo-controlled trial of romidespin in persons with HIV-1 on suppressive antiretroviral therapy [J]. *J Infect Dis*, 2021, 224: 648-656.
- [75] Ait-Ammar A, Kula A, Darcis G, et al. Current status of latency reversing agents facing the heterogeneity of HIV-1 cellular and tissue reservoirs [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 3060.
- [76] Pardons M, Fromentin R, Pagliuzza A, et al. Latency reversing agents induce differential responses in distinct memory CD4 T cell subsets in individuals on antiretroviral therapy [J]. *Cell Rep*, 2019, 29: 2783-2795.e5.
- [77] Grau-Expósito J, Luque-Ballesteros L, Navarro J, et al. Latency reversal agents affect differently the latent reservoir present in distinct CD4<sup>+</sup> T subpopulations [J]. *PLoS Pathog*, 2019, 15: e1007991.
- [78] Deng K, Perteau M, Rongvaux A, et al. Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations [J]. *Nature*, 2015, 517: 381-385.
- [79] Dental C, Proust A, Ouellet M, et al. HIV-1 latency-reversing agents prostratin and bryostatin-1 induce blood-brain barrier disruption/inflammation and modulate leukocyte adhesion/transmigration [J]. *J Immunol*, 2017, 198: 1229-1241.
- [80] Zhou Y, Xu SJ, Ding D, et al. Recent advances of antiviral drugs based multispecific binding strategy [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 2203-2217.