二酮酸衍生物对 AIDS 的治疗作用

韩凤昭[1]，王　林[2]
（1. 沈阳药科大学，沈阳　110000；2. 军事医学科学院放射与辐射医学研究所，北京　100850）

摘要：由于人类免疫缺陷病毒（HIV）因病毒高水平突变而产生对多种药物的耐药性，迫切需要发现新的治疗靶点。研究证明 HIV 整合酶在 HIV 周期中呈正态分布，有可能作为 HIV 治疗的一个新靶点。发现许多化合物在体外能够抑制整合酶，但有抗病毒活性且细胞毒性较低者很少。二酮酸衍生物具有高选择性抗病毒活性，且细胞毒性较低，是目前最具前景的整合酶抑制剂。其中某些化合物近来已进入临床试验阶段。

关键词：HIV；AIDS；高活性抗逆转录病毒治疗方法（HAART）；整合酶抑制剂；二酮酸
中图分类号：R978.7　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001-0971（2007）03-0219-03

AIDS 是目前世界上对人类健康威胁严重的疾病。自从 20 世纪 80 年代初期开始流行，至今约有 2 000万人死亡，且有4 000万人受感染。该疾病在给全世界带来灾难性的同时，也给科学界带来了挑战。研究者用不到 10 年的时间找到了 AIDS 的病因，通过敏感性实验对感染者进行了鉴别，同时也发现了第一个治疗药物齐多夫定（AZT）。大量研究工作改变了 AIDS 的发展趋势，使其由绝症转变为一种慢性疾病。1997 年，高活性抗逆转录病毒治疗（HAART）方法被作为一种标准的治疗方法应用于临床。HAART 大大提高了病人的存活率，正确使用可抑制病毒复制，诱导免疫恢复。然而此治疗方法耗时长，长期使用出现了耐药性，这就需要寻找新的治疗方法。虽然 FDA 尚未批准任何一种整合酶抑制剂应用于临床，但研究证明它是一类很有前景的 AIDS 治疗药物。

1　HIV 的治疗靶点

HIV 的生命周期为介入治疗提供了不同的潜在治疗靶点。这些抗 HIV 治疗可能的药理学机制包括：（1）抑制 CD4 与其受体的结合；（2）阻断病毒与宿主细胞膜的融合；（3）抑制细胞核对病毒基因的输入或输出；（4）抑制整合过程；（5）抑制病毒突变。HIV 基因组包含的 9 个基因，可对 15 种病毒蛋白进行编码，其中 3 种开放读框可对 Gag，pol 和 Env 等多聚蛋白进行编码，这些蛋白在病毒周期后期经过蛋白水解变成单个的结构蛋白。其余的基因对非结构性调节和辅助蛋白具有重要作用，而后二者对 vif，vpu，nef，vpr，rev 和 tat 的成功复制必不可少。3 种 pol 蛋白：逆转录酶，蛋白酶和整合酶，在病毒复制周期中发挥了必需酶的功能。近 20 年来研究的主要目标就是基于其功能设计可抑制这些酶活性的药物。批准用于临床的 20 种药物中，有 19 种靶向作用的蛋白是由 pol 基因编码的，他们分别属于核苷逆转录酶抑制剂、核酸逆转录酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。

2　整合酶蛋白

HIV 整合酶是一种能将病毒 DNA 整合到宿主细胞基因组的酶，其独具的特性，使它成为抗 HIV 治疗的一个安全的特异性靶点。整合酶是由 pol 基因编码的，在病毒成熟的过程中它作为 Pol 蛋白的一部分被 HIV-1 蛋白酶传递到 32 ku 的蛋白中。这个酶含有 288 个氨基酸，包含 3 个区域。

氨基酸 50～212 对应于催化区域，其中含有活性位点的 $D_{64}D_{116}E_{152}$ 残基，在不同的 HIV-1 中是一个保守基序。这个基序在多核苷酸磷酸转移酶（如逆转录病毒整合酶、细菌转位酶、RNaseH 和 RuvC）家族中也是高度保守的。整合酶的活性位点处于此领域中。N 端区域的氨基酸 1～50，在逆转录整合酶中是高度保守的。该区域任一种氨基酸的突变都能破坏整合和加工反应。C 端区域的氨基酸 212～288 与其他逆转录酶显示出最低水平的同源性。其核磁共振结构与 Scr 同源 3 区域（SH3）相似，SH3 可与脯氨酸富集区结合，从而介导蛋白间的相互作

收稿日期：2006-12-04
作者简介：韩凤昭，女，在读硕士研究生，研究方向：主要从事药理学研究，Tel：，E-mail：hfengzhao@ sina. com. cn

用。病毒复制过程中,逆转录酶和整合酶可发生功能性相互作用,但其他的蛋白间相互作用很少发生。另一方面,C 端区域能够介导不依赖于离子的非特异性 DNA 结合,加速寡聚化,而其突变将大大减少整合酶介导的反应。整合酶蛋白有限的溶解度阻碍了对其结构的研究,但已经确定的是,3 个区域可各自独立形成二聚体,这与那些只包含催化中心和 C 端区域的重组蛋白是相似的。然而,一个四聚体更适合发生整合酶、病毒 DNA 和基因组 DNA 之间的复杂相互作用。

整合酶催化病毒 DNA 进入宿主基因组中需要两步分开的化学反应:一为 3′端加工,二为链转移(ST)或整合反应。逆转录完成后,在细胞质中发生 3′端加工反应,病毒双链 cDNA 的每个 3′端均去除两个核苷酸。CA 二核苷酸基序的 3′侧立即发生末端核苷酸裂解,而其在逆转录病毒中得以保存,且位于病毒 cDNA 的长末端重复系列(LTR)U3 和 U5 的末端。反应完成后,两个羟基基团暴露出来,并在链转化反应中攻击基因组 DNA 互补链的一对磷酸二酯键。3′端加工反应之后,包含有病毒 cDNA 的前整合复合物(PIC)和利于细胞核输入和整合的机构必须易位至核内。像 HIV-1 这样的病毒能够感染非分裂型细胞,而逆转录病毒如鼠白血病病毒则需要破坏核膜或细胞进行有丝分裂以使 PIC 接近宿主细胞。因此,PIC 的核易位在 HIV 介导的发病机制中起了重要作用。尽管在整合过程中识别了一些辅助因子,但其确切作用和机制尚不清楚。

3　整合酶抑制剂

目前具有低细胞毒性并对整合酶有显著特异性抗病毒作用的整合酶抑制剂还很少。有两种整合酶抑制剂正在进行临床试验。HIV 整合作用的几种潜在靶点包括:(1)DNA 整合酶相互作用;(2)酶的多聚化;(3)3′端加工;(4)PIC 进入细胞核中;(5)ST 反应;(6)整合后 DNA 的修饰。

整合酶抑制剂可分为 5 类:(1)天然产物;(2)DNA 结合剂;(3)合成化合物,如肼类、硫氮杂 ▮ 盐(thiazepines)、香豆素和喷他脒衍生物等;(4)羟基化芳香族化合物;(5)二酮酸(DKA)衍生物。DKA 衍生物是目前最具前景的直接作用于病毒整合酶的抗病毒化合物。此类化合物的基本结构为二酮连接一个酸基团和芳香基团。

DKA 衍生物具有的 5 种特性使其成为强效抗病毒剂并对 HIV-1 整合酶有很强的特异性。首先,DKA 在体外无细胞系统抑制整合酶;整合酶的酶活性可用生物化学方法检测,其中用于模拟 LTR 的寡聚核苷酸和重组整合酶可用来评价 3′端加工和 ST 反应。然而体外反应不同于体内整合,因为只有一个 DNA 末端整合到 LTR 样寡聚核苷酸上。经检测,DKA 的 IC_{50} 达到微摩尔浓度水平。其次,DKA 衍生物对感染细胞表现出抗病毒活性是其抑制整合酶活性的结果。细胞中 2 种 LTR 循环的蓄积和 HIV 向宿主染色体组整合数量的减少证明了这一点。IC_{50} 在抗病毒的过程中也达到微摩尔浓度水平。第三,DKA 表现出较低的细胞毒性,其抗病毒分析表明,50% 细胞毒性浓度(CC_{50})比 IC_{50} 高 50 倍以上。因此,以 CC_{50}/IC_{50} 值计算的治疗指数(TI)是很高的。第四,接触 DKA 的病毒通过选择具有整合酶基因变异的病毒株而对其产生耐药性。第五,因为人体整合酶缺少细胞同源性,所以 DKA 无法干扰正常的细胞生化反应,从而直接影响到此类化合物的 TI。然而,最近研发的 2 种 DKA 可在体外抑制 RAG1/2,还有一些 DKA 能够抑制 RNAseH,但需要比阻断病毒整合酶更高的浓度。

β-二酮酸作为第一种对 HIV-1 整合酶有高选择性的整合酶抑制剂是由 Shionogi & Co Ltd 公司和 Merck 研究实验室独立发现的。其专利报道的一系列包含有 DKA 结构的吲哚类化合物,均可作为整合酶抑制剂且体外检测显示其 IC_{50} 均低于 10 μmol · L^{-1}。迄今仅一种 DKA 能与 HIV-1 形成共结晶,即 1-(5-氯吲哚基-3-基)-3-羟基-3-(2H-四唑-5-基)-丙烯酮(5CITEP)。晶体结构显示,5CITEP 结合于整合酶催化中心区域的 3 个催化酸残基 $D_{64}D_{116}E_{152}$ 中间。5CITEP 是体外 ST 反应的强效抑制剂(IC_{50} < 5 μmol · L^{-1}),但其在体外对 3′端加工的抑制作用则弱了很多(IC_{50} > 35 μmol · L^{-1})。然而 5CITEP 在细胞培养系统中没有表现出抗病毒活性。分子中的芳香环结构决定了对 ST 的选择性,而酸官能团中的四唑基团则与该化合物和整合酶活性位点之二价金属离子的相互作用有关。

S-1360 是唯一一种由 Shionogi & Co Ltd 公司发现并进入临床的化合物。S-1360 与 5CITEP 的主要区别在于 S-1360 是三唑基而不是四唑基团。S-1360 可在纳摩尔级浓度抑制体外 ST 反应和细胞内病毒复制的浓度分别为 20 和 200 nmol · L^{-1},而其 CC_{50} 则为 12 μmol · L^{-1}。健康志愿者的Ⅰ期临床试

验表明,口服 S-1360 具有良好的耐受性和药物代谢动力学特性,这促使 S-1360 进入Ⅱ期临床试验。Shionogi & Co Ltd 公司还申请了其他系列的 DKA 专利,这些化合物在芳香环部分含有杂环,其中一些体外抑制整合酶的 IC_{50}处于低微摩尔水平。

L-708906 和 L-731988 是活性最高且研究最充分的两个化合物,体外细胞分析显示其 IC_{50}值分别为 80 和 150 nmol·L^{-1};二者还能抑制细胞培养中的 HIV-1 病毒复制,IC_{50}低于 2 μmol·L^{-1}且 CC_{50}高于 50 μmol·L^{-1}。与 5CITEP 相比,Merck 化合物如 L-708906 在抑制 ST 反应方面的选择性更高,而它们对 ST 反应的 IC_{50}相当,但对 3′端加工反应的 IC_{50}具有显著差异性,L-708906 高于 1 000 μmol·L^{-1}而 5CITEP 仅为 35 μmol·L^{-1}。因此 L-708906 对 ST 反应的选择性至少比 5CITEP 大 28 倍。后来又发现了新的萘啶氨甲酰类整合酶抑制剂,包含 L-870810 和 L-870812。L-870810 和 L-870812 因含有 β-羟基酮结构而被认定为 DKA 衍生物。二者均可选择性抑制 ST 反应,IC_{50}分别为 15 和 40 nmol·L^{-1}。口服吸收的 L-870810 可产生抗病毒活性,并能对抗野生型具多重耐药性的 HIV-1,HIV-2 和 SIV,其 IC_{50}值为 4 nmol·L^{-1}。口服 L-870812 具有良好的药代动力学特性,近来还发现该化合物能够抑制病毒血症,维持 $CD4^+$细胞数量,并诱导感染 SIV 的猕猴病毒特异性细胞的免疫反应。经过初步的安全性评价之后,L-870810 已进入健康志愿者的Ⅰ期临床试验。近年来,美国大的制药公司还报道了其他类型的整合酶抑制剂。

4　整合酶抑制剂的耐药性

虽然负责编码整合酶的 HIV 基因组区域与负责编码逆转录酶和蛋白酶的相比更为保守,但一旦整合酶抑制剂作为药物广泛应用于临床,也有可能对整合酶抑制剂产生耐药性。事实上,在持续增加 S-1360 和 L-708906 用药浓度之后,对病毒链进行的基因型分析结果表明,活性位点附近或 DNA 与整合酶的结合区发生了几种突变。对选择性病毒株的表型分析表明,此类病毒株对控制其选择性的化合物敏感性很低。而且,病毒株可对 DKA 产生交叉耐药性,但在观察 DKA 对逆转录酶,蛋白酶和病毒进入抑制剂的作用时未发现交叉耐药性。由此可认为突变后病毒的适应性大大降低了。DKA 衍生物 L-870810 诱导的病毒耐药性是由特定活性位点的突变(F121Y,T125K,V151I 和 V72I)引起的,这在其他 DKA 衍生物从未有过报道。总之,获得的数据表明,需要不止一种的突变才能破坏整合酶的催化活性或者病毒感染性。然而,在细胞培养中,细胞短时间内对 DKA 产生的耐药性和选择性病毒株的交叉耐药性对临床应用有着重要影响。

5　前景与展望

目前寻找新的整合酶抑制剂的速度较慢,受试药物大多对整合酶缺少选择性或者有很强的细胞毒性。尽管如此,能干扰整合酶介导的 ST 反应的 2 个整合酶抑制剂 L-870810 和 S-1360,虽然存在毒性和体内有效性的问题,已分别进入Ⅰ期和Ⅱ期临床试验阶段,均有望获准上市。新的整合酶抑制剂将包括拥有 C 端区域在内的不同靶点的药物和能阻止整合酶二聚化或寡聚化或干扰酶活性必需的构象变化的配体。整合酶与细胞蛋白的相互作用是病毒 PIC 进入宿主 DNA 所必需的,也将是产生抑制作用的一个靶点。不管 HIV 感染新疗法的研发前景多么令人乐观,新抗逆转录病毒制剂的研发必须考虑到如何确保 AIDS 持续蔓延并难以控制的不发达国家能获得这些新药。

欢迎订阅　　欢迎投稿　　欢迎刊登广告