

HIV-1 核衣壳蛋白 NCp7 的功能及其抑制剂研究进展

王云华^{1,2}, 杨柳萌¹, 郑永唐^{1*}

(1. 中国科学院昆明动物研究所动物模型和人类疾病机理重点实验室, 分子免疫药理学实验室, 云南 昆明 650223; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: NCp7 在 HIV-1 生活周期中多个步骤发挥重要的核酸分子伴侣作用。抑制 NCp7 的功能可阻断 HIV-1 复制。NCp7 含有两个高度保守的锌指结构, 对 NCp7 的功能起决定性作用。锌指结构突变将导致 HIV-1 丧失感染能力。NCp7 抑制剂可望成为下一代不容易产生耐药突变的抗 HIV-1 药物。本文就 NCp7 抑制剂目前的研究进展作简略综述。

关键词: HIV; 核衣壳蛋白; 锌指结构; 抑制剂

中图分类号: R978.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)03-0165-05

Function and inhibitors of HIV-1 nucleocapsid protein 7

WANG Yun-hua^{1,2}, YANG Liu-meng¹, ZHENG Yong-tang¹

(1. *Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, and Laboratory of Immunopharmacology, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, China;*
2. *Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China*)

Abstract: HIV-1 nucleocapsid protein 7 (NCp7) is a highly basic protein with two CCHC type zinc fingers. It plays critical roles in multiple stages of HIV-1 life cycle and function as a nucleic acid chaperon. Mutation in NCp7 will reduce the replication of HIV-1 dramatically. Inhibition of the function of NCp7 will block the replication of HIV-1. NCp7 inhibitors are expected to be a novel class anti-HIV-1 drugs that are not likely to induce drug-resistance mutations. Here we focus on the NCp7 inhibitors that are under developing.

Key words: HIV-1; nucleocapsid protein 7; inhibitor

艾滋病(AIDS)是人类免疫缺陷病毒(HIV)引起的致死性传染病,严重威胁着人类的健康和全球经济的发展。自美国1981年发现首例AIDS患者以来,该病迅速在全球范围内广泛流行。据世界卫生组织统计,全球HIV感染者累计7 000万人,目前每年约增500多万HIV新发感染病例。中国AIDS流行态势较为严重,HIV感染者的人数已居亚洲第2

位,全球第14位。据中国卫生部统计结果显示,截至2005年底,中国现有HIV感染者约65万人,感染人数正在以每年30%的速度增长。

由于疫苗研制无根本性的突破,抗HIV药物治疗仍是目前防治AIDS的主要途径之一。目前临床上应用的抗艾滋病药物主要有逆转录酶抑制剂、蛋白水解酶抑制剂和融合抑制剂。用这些药物进行高效抗逆转录病毒治疗(HAART)能够抑制HIV携带者的病毒复制,延长寿命,但不能完全清除病毒。另外,现有药物的毒副作用大,容易产生耐药性。因此,需要人们不断地研究和开发具有新的作用机制和新的作用靶点的新型抗HIV药物。HIV-1核衣壳蛋白NCp7(nucleocapsid protein 7)在HIV-1生活周期多个步骤中发挥重要作用。因此,NCp7成为近年来抗HIV药

收稿日期:2006-11-24

基金项目:国家“十五”科技攻关计划(2004BA719A14);云南省科技攻关计划(2004NG12)

作者简介:王云华,男,在读博士研究生,研究方向:抗HIV药物筛选研究,Tel:0871-5126855,E-mail:yunhua1977@sina.com

* 通讯作者:郑永唐,男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:抗HIV药物和病毒免疫学。Tel/Fax:0871-5195684,E-mail:zhengyt@mail.kiz.ac.cn

物研究的重要靶点之一。国内目前还未见开展相关实验研究的报道和相关介绍。本文对近年来在 NCp7 功能及其抑制剂研究方面的进展做简要综述。

1 NCp7 结构与功能

NCp7 是由蛋白酶切割 Gag 多蛋白前体产生的一个 55 个氨基酸的小分子碱性蛋白,相对分子质量约为 7ku。它含有 2 个在逆转录病毒中高度保守的 CCHC 型锌指结构(Cys-X₁-Cys-X₂-His-X₂-Cys, X 为任意氨基酸残基)。该结构以高度的亲和力与锌离子结合后形成两个在空间上非常接近的球状结构域,对 NCp7 的生理功能起着决定性的作用^[1]。

NCp7 可与多种病毒蛋白/核酸以及宿主蛋白相互作用,在 HIV-1 生活周期的多个阶段多个步骤发挥重要的功能。病毒生活周期的早期,需要宿主的 tRNA 结合到病毒 RNA 的引物结合位点(primer binding site, PBS),以起始病毒基因组的逆转录。在体外,NCp7 通过改变 tRNA 结构,促进其结合 PBS 而加强了逆转录的起始作用^[2]。在此过程中 NCp7 与 tRNA 有两个相互作用位点,NCp7 中的碱性氨基酸推动了 NCp7-RNA 复合物的形成,而锌指结构保证了 NCp7 以适当的方向与 RNA 相互作用^[3]。NCp7 促进 tRNA/PBS 复合物形成的具体机制还不清楚。

逆转录开始时,NCp7 直接与逆转录酶的两个亚基相互作用并募集逆转录酶形成逆转录复合物^[4]。在逆转录过程中,NCp7 能够打开 RNA 模板以及单链 DNA cTAR 序列的高级结构,加速新合成负链的链转移^[5],稳定 DNA 链之间的相互作用促进正链转移^[6]。另外,NCp7 还可以打开 RNA 形成的高级结构,减少逆转录酶在 RNA 模板上的停顿,并加强 RNase H 的活性,促进负链 DNA 的合成。在前病毒整合阶段,NCp7 稳定整合酶与长末端重复序列(long terminal repeats, LTR)的相互作用,促使形成稳定的整合复合物^[7]。

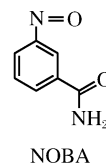
在病毒成熟阶段,NCp7 识别包装信号,加速 RNA 链茎-环结构之间的链交换过程,促进双链 RNA 形成^[8]。NCp7 与 ATP 结合盒蛋白家族 E(ATP-binding cassette protein family E, ABCE)的相互作用是病毒包装所必需的^[9]。NCp7 还可以保护 DNA 不被宿主细胞降解,并能够结合到 LTR 序列的多个位点,促进 LTR 的启动子活性。

由于 NCp7 在病毒周期中的重要作用,而病毒对 NCp7 突变的耐受度又很低,因此 NCp7 是一个很有吸引力的药物作用靶点,其抑制剂的研究工作也日益受到重视,目前已筛选出一些对 NCp7 有抑制作用的化合物。

2 NCp7 的抑制剂

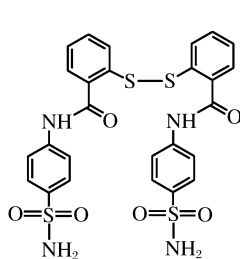
2.1 3-亚硝基苯甲酰胺(3-nitrosobenzamide, NOBA)和 6-亚硝基-1, 2-苯并吡喃酮(6-nitroso-1, 2-benzopyrone, NOBP)

NOBA 和 NOBP 是最早筛选到的 NCp7 抑制剂,它们通过氧化作用使锌指结构上半胱氨酸的巯基之间形成二硫键,破坏 NCp7 的结构,使其失去核酸结合能力,从而抑制其功能^[10]。NOBA 不但可以抑制 HIV-1 的复制,还可以抑制猴免疫缺陷病毒(SIV)的复制。该化合物选择性比较差,对宿主蛋白的锌指结构也有抑制作用,因此毒性较大。对该类化合物的发现表明,用 NCp7 抑制剂治疗 HIV-1 是可行的。

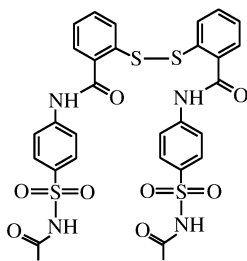


2.2 2, 2'-联硫基二苯甲酰胺(2, 2'-dithiobisbenzamide, DIBA)衍生物

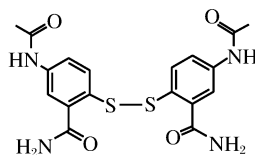
由于 NOBA 的选择性差,因此要将 NCp7 抑制剂用于抗 HIV 治疗就必须筛选新的毒性较小的化合物。为此,美国国立癌症研究所(NCI)对其化合物库中代表 14 万个化合物空间结构的 2 000 个代表性化合物进行了筛选,发现其中一些具有 NCp7 抑制活性,DIBA 就是其中的一类^[11]。与 NOBA 相比,这些化合物具有较好的选择性,而且对不同的病毒株、耐药株均有类似的抑制活性,其 EC₅₀ 值为 0.5 ~ 10 μmol · L⁻¹。其中 PD159206 获批准进入 I 期临床试验,但其临床效果不理想。对其作用机制研究发现,DIBA 类化合物引起细胞间或病毒颗粒间 gag 蛋白广泛交联,影响蛋白酶的酶切,从而抑制病毒成熟颗粒释放。经处理的成熟病毒颗粒则会由于 NCp7 的交联而不能起始逆转录过程^[12]。但 DIBA 对还原性环境敏感,稳定性较差。其后对 DIBA 进行了广泛的修饰改造和构效关系研究,均未取得大的进展。



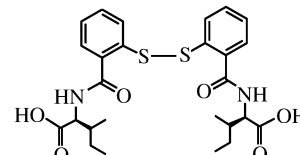
PD022551



PD156202



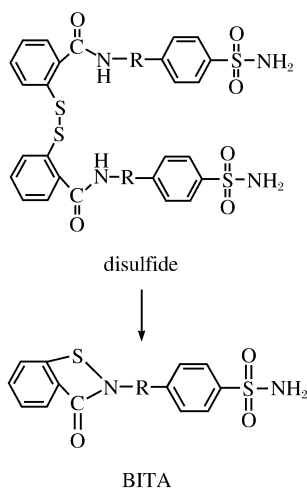
PD024886



PD159206

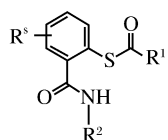
2.3 苯并异噻唑酮 (benzothiazolones, BITA) 类衍生物

BITA 是 DIBA 联硫键断裂后形成的产物。由于去掉了联硫键并且形成五元环状结构, BITA 的稳定性得到提高, 但抗病毒活性和细胞毒性的改善并不显著。



2.4 吡啶链烷基硫羧酸酯 (pyridinioalkanoyl thioesters, PATE) 类化合物

在 DIBA 和 BITA 的基础上改造得到了 PATE 类化合物; 该类化合物共价结合 NCp7 的 Cys³⁶ 和 Cys⁴⁹, 导致 NCp7 构象改变, 丧失功能。其抗病毒活性 EC₅₀ 一般在 5 μmol · L⁻¹ 以下。该类化合物选择性作用于 HIV-1 NCp7, 而不与其他含锌指结构的蛋白反应, 细胞毒性小。因而该类化合物的选择指数可达 100 左右^[13]。

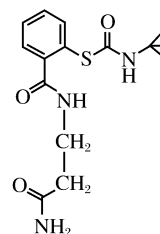


PATE

R¹= 取代苯环或支链烷基
R²= 烷基甲酰胺
R³= 位置可变的小取代基

经进一步修饰和结构改造, 发现了硫羧代氨基甲酸酯 (thiol-carbamates, TICA) 类化合物。TICA 的

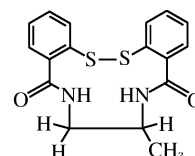
活性得到显著提高, 如下图所列化合物的选择指数可达 300 以上。但 TICA 在缓冲溶液或血浆中很不稳定, 限制了该类化合物的应用。



PATE 类化合物是目前研究最多的一类 NCp7 抑制剂, 目前已经对该类化合物进行了大量的结构改造和构效关系研究。相对于 DIBA, PATE 的细胞毒性下降, 所以治疗指数提高了。在还原性环境下的稳定性也得到了显著改善。但其抗病毒活性并没有显著提高。综合考虑其抗病毒活性、细胞毒性、稳定性等因素, PATE 目前未能进入临床试验。

2.5 2,2'-二噻二苯甲酰胺 (cyclic 2,2'-dithiobisbenzamide, SRR-SB3)

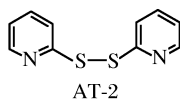
SRR-SB3 是一种大环二酰胺化合物, 具有较好的抑制效果, 抑制不同 HIV-1 病毒株复制的 EC₅₀ 约为 2 μmol · L⁻¹ 左右, 对多种核苷类抑制剂、非核苷类抑制剂和蛋白酶抑制剂耐药株均有较好的抑制效果, 同时对 HIV-2 和 SIV 也有抑制作用^[14]。



SRR-SB3

2.6 2,2'-联硫基二吡啶 (aldriethiol-2, AT-2)

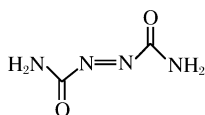
AT-2 通过共价修饰 NCp7 锌指结构的 Cys³⁶, Cys³⁹ 和 Cys⁴⁹, 逐出锌离子而灭活 HIV。经 AT-2 处理的病毒颗粒逆转录受到抑制, 但其表面蛋白的构象及功能均不受影响, 因而可以作为良好的免疫原^[15]。



AT-2

2.7 偶氮二甲酰胺 (azodicarbonamide, ADA)

在体外实验中, ADA 对 HIV 有较好的抑制效果, 而且选择性较好, 不会对宿主的锌指结构产生影响。ADA 是第一个进入临床试验的 NCp7 抑制剂, 结果表明其毒性低, 对经其他药物治疗的晚期患者有一定的作用, 而且在体外实验和临床试验中均没有观察到耐药株的产生^[16]。



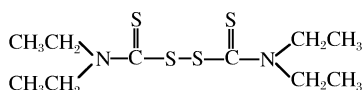
ADA

2.8 乙基顺丁烯二酰亚胺 (N-ethylmaleimide, NEM)

NEM 能够与半胱氨酸的巯基反应生成稳定的 Cys-NEM。NEM 与 NCp7 Cys⁴⁹ 反应后改变了 NCp7 的构象, 从而导致其活性丧失。但与寡核苷酸结合的 NCp7 可受到保护, 不与 NEM 反应, 而且 NCp7 与寡核苷酸的结合越强, 这种保护作用就越明显, 暗示 NEM 与寡核苷酸竞争锌指结构活性中心^[17]。

2.9 双硫仑 (disulfiram)

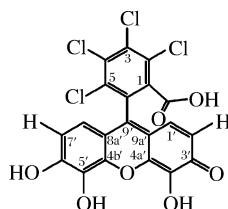
双硫仑是乙醛脱氢酶的抑制剂, 在临床上用来治疗酒精中毒。与上述化合物的作用方式不同, 它通过螯合锌离子来抑制病毒的复制, 这种抑制可以通过添加锌离子来解除^[18]。



双硫仑

2.10 苯甲酸类化合物 [2,3,4,5-四氯-6-(4',5',6'-三羟基-3'-羧基-3H-占吨-9'-基)苯甲酸]

该类化合物是核苷类似物, 研究表明该类化合物可与 NCp7 结合, 但添加 BSA 可以抑制或解除这种结合, 表明二者是非共价结合的。目前对其结合方式还不清楚^[19]。



苯甲酸类化合物

2.11 其他化合物

除了上述化合物之外, 另外还有报道一些合成多肽 (如环肽 RB2121)、寡核苷酸以及一些抗肿瘤、抗菌或抗病毒药物 (如四环素、道诺霉素、新霉素 B 等) 也能够抑制 NCp7 与 RNA 的相互作用, 暗示了这些药物在抗 HIV 治疗中的应用前景^[20]。

3 结语

在目前的抗 HIV 治疗中, 耐药性是一个不容忽视的问题, 随着各种抗病毒药物的广泛使用, 耐药病毒株也开始流行, 因此需要不断寻找新的药物靶点。NCp7 在病毒生活周期中发挥着重要作用, 而 NCp7 的锌指结构高度保守, 病毒对该位点的突变耐受度很低, 因此, NCp7 成为一个很有吸引力的治疗靶点。目前发现的 NCp7 抑制剂中, 绝大多数化合物都能有效抑制多种 HIV-1 耐药病毒株的复制, 而且由于锌指结构在逆转录病毒中高度保守, 这些化合物对 HIV-2 和 SIV 也有良好的抑制效果。在体外实验及临床试验中也没有发现 NCp7 抑制剂耐药株产生。NCp7 抑制剂可能是下一代有效而不容易产生耐药性的抗 HIV 药物。但由于疗效与毒性等原因, 目前还没有获准在临床上使用。国内目前还未见相关的研究报道, 本实验室初步建立了相关的筛选方法, 从天然产物中筛选具有抑制其活性的化合物, 为 NCp7 抑制剂的研发提供实验依据。可以预见, NCp7 抑制剂开发成功将为抗 HIV 治疗提供一种更好的选择。

参 考 文 献

- [1] Cruceanu M, Gorelick RJ, Musier-Forsyth K, et al. Rapid kinetics of protein-nucleic acid interaction is a major component of HIV-1 nucleocapsid protein's nucleic acid chaperone function [J]. *J Mol Biol*, 2006, 363(5):867-877.
- [2] Hargittai MR, Gorelick RJ, Rouzina I, et al. Mechanistic insights into the kinetics of HIV-1 nucleocapsid protein-facilitated tRNA annealing to the primer binding site [J]. *J Mol Biol*, 2004, 337(4):951-968.
- [3] Tisne C, Roques BP, Dardel F. Specific recognition of primer tRNA Lys 3 by HIV-1 nucleocapsid protein: involvement of the zinc fingers and the N-terminal basic extension [J]. *Biochimie*, 2003, 85(5):557-561.
- [4] Lener D, Tanchou V, Roques BP, et al. Involvement of HIV-1 nucleocapsid protein in the recruitment of reverse transcriptase into nucleoprotein complexes formed *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(50):33781-33786.
- [5] Heilman-Miller SL, Wu T, Levin JG. Alteration of nucleic acid structure and stability modulates the efficiency of minus-strand transfer mediated by the HIV-1 nucleocapsid protein [J]. *J Biol*

- Chem*, 2004, 279:44154-44165.
- [6] Egele C, Schaub E, Ramalanjaona N, *et al.* HIV-1 nucleocapsid protein binds to the viral DNA initiation sequences and chaperones their kissing interactions[J]. *J Mol Biol*, 2004, 342(2): 453-466.
- [7] Poljak L, Batson SM, Ficheux D, *et al.* Analysis of NCp7-dependent activation of HIV-1 cDNA integration and its conservation among retroviral nucleocapsid proteins [J]. *J Mol Biol*, 2003, 329(3):411-421.
- [8] Cruceanu M, Urbaneja MA, Hixson CV, *et al.* Nucleic acid binding and chaperone properties of HIV-1 Gag and nucleocapsid proteins[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(2):593-605.
- [9] Lingappa JR, Dooher JE, Newman MA, *et al.* Basic residues in the nucleocapsid domain of Gag are required for interaction of HIV-1 gag with ABCE1 (HP68), a cellular protein important for HIV-1 capsid assembly [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(7): 3773-3784.
- [10] Yu X, Hathout Y, Fenselau C, *et al.* Specific disulfide formation in the oxidation of HIV-1 zinc finger protein nucleocapsid p7 [J]. *Chem Res Toxicol*, 1995, 8(4):586-590.
- [11] Tummino PJ, Scholten JD, Harvey PJ, *et al.* The *in vitro* ejection of zinc from human immunodeficiency virus (HIV) type 1 nucleocapsid protein by disulfide benzamides with cellular anti-HIV activity[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(3):969-973.
- [12] Campbell S, Oshima M, Mirro J, *et al.* Reversal by dithiothreitol treatment of the block in murine leukemia virus maturation induced by disulfide cross-linking [J]. *J Virol*, 2002, 76(19): 10050-10055.
- [13] Srivastava P, Schito M, Fattah RJ, *et al.* Optimization of unique, uncharged thioesters as inhibitors of HIV replication[J]. *Bioorg Med Chem*, 2004, 12(24):6437-6450.
- [14] Mahmood N, Jhaumeer-Lauloo S, Sampson J, *et al.* Anti-HIV activity and mechanism of action of macrocyclic diamide SRR-SB3[J]. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50(12):1339-1342.
- [15] Rossio JL, Esser MT, Suryanarayana K, *et al.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity with preservation of conformational and functional integrity of virion surface proteins [J]. *J Virol*, 1998, 72(10):7992-8001.
- [16] Goebel FD, Hemmer R, Schmit JC, *et al.* Phase I/II dose escalation and randomized withdrawal study with add-on azodicarbonamide in patients failing on current antiretroviral therapy[J]. *AIDS*, 2001, 15(1):33-45.
- [17] Morcock DR, Thomas JA, Gagliardi TD, *et al.* Elimination of retroviral infectivity by *N*-ethylmaleimide with preservation of functional envelope glycoproteins [J]. *J Virol*, 2005, 79(3): 1533-1542.
- [18] Shian SG, Kao YR, Wu FY, *et al.* Inhibition of invasion and angiogenesis by zinc-chelating agent disulfiram[J]. *Mol Pharmacol*, 2003, 64(5):1076-1084.
- [19] Stephen AG, Worthy KM, Towler E, *et al.* Identification of HIV-1 nucleocapsid protein; nucleic acid antagonists with cellular anti-HIV activity[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 296(5):1228-1237.
- [20] Turner KB, Hagan NA, Fabris D. Inhibitory effects of archetypical nucleic acid ligands on the interactions of HIV-1 nucleocapsid protein with elements of Psi-RNA[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(5):1305-1316.

药物与临床

苏尼替尼、索拉非尼Ⅲ期临床试验结果

最近《新英格兰医学杂志》的2篇研究性论文报道,2项国际性Ⅲ期临床试验结果表明,新型小分子激酶抑制剂苏尼替尼(sunitinib)和索拉非尼(sorafenib)延长了转移性肾细胞癌(RCC)病人的无进展生存时间。苏尼替尼试验中,750名从未接受过治疗的RCC病人随机进入苏尼替尼治疗11个月组(试验组)或干扰素- α 治疗5个月组(对照组)。盲样肿瘤成像分析表明,试验组具有较高的客观响应率。整个预后危险评价表明,试验组疗效更佳。两组之间的整体生存率无显著性差异,但最终的生存结果还未报道。

索拉非尼试验中,903名从未接受过治疗的RCC病人随机进入标准治疗加索拉非尼组(试验组)或标准治疗组(对照组)。试验组平均无进展生存时间高于对照组(5.5月:2.8月),且盲样分析表明,试验组响应率或病情稳定率要明显高于对照组。试验组整体生存率高于对照组,但无显著差异。

2项临床研究均表明激酶抑制剂疗法可引起毒性不良反应,但使用苏尼替尼的病人生活质量更高。这些药物进一步的安全性、有效性评价尚在进行中。

(刘念)