

综 述

HIV 进入抑制剤的研究进展*

张浩圆 吴文言**

(中山大学生命科学学院 广州 510275)

摘要 随着对 HIV 进入细胞过程的了解,各种进入抑制剤相继问世,目前主要有三大类:吸附抑制剤、辅助受体抑制剤和融合抑制剤。对其中具有代表性的进入抑制剤研究进展进行了介绍,一些进入抑制剤已经进入到临床试验阶段,其中融合抑制剤 T20 在 2003 年便被 FDA 批准可同其他 ARTs 联合用于治疗 HIV 感染者,CCR5 拮抗剂 Maraviroc 在 2007 年 8 月被 FDA 批准上市。

关键词 HIV 抑制剤 病毒进入

中图分类号 Q81

自 1981 年第一例 HIV 病人被发现,30 年来,数千万人被 HIV 夺去了生命,目前全球大约有 3 400 万 HIV 感染者^[1]。2009 年,新的 HIV 感染者约为两百九十万,超过两百万人死于 AIDS 相关疾病,HIV 已经成为全球最致命的四大流行性疾病之一,至今还没有安全有效的 HIV 疫苗问世,因此,开发 HIV 治疗药物成为防治疾病的主要策略。

目前被 FDA 批准上市的药物主要是:核苷类反转录酶抑制剤、非核苷类反转录酶抑制剤和蛋白酶类抑制剤,这些抑制剤能有效延缓免疫系统的破坏,降低被感染的概率,缓解病情的发展,但是无法清除病毒,而且长期服用后会产生较为严重的副作用和引起病毒变异并产生抗性。据报道,超过 25% 的新感染者是由反转录酶抗性病毒株引起的^[2]。因此研究者将目标转向其他的抗病毒靶标,而阻止 HIV 进入药物被认为是最富有潜力的 HIV 治疗手段,其中 HIV 融合抑制剤 T20 在 2003 年获得 FDA 批准可同其他 ARTs (antiretroviral therapies, 抗反转录病毒疗法) 联合用于治疗 HIV 感染者,CCR5 拮抗剂 Maraviroc 在 2007 年 8 月被 FDA 批准上市。

1 HIV 进入过程

HIV 进入细胞涉及到三个步骤(图 1):首先是病毒表面的包膜糖蛋白 gp120 与 CD4 分子高亲和力结合,引发 gp120 的构象发生改变,暴露出同辅助受体(如 CCR5) V3 区结合的隐藏位点,接着同辅助受体结合,引发第二次构象变化,导致 gp41 插入宿主细胞膜内;当 gp120 与 gp41 解离后,gp41 的 NHR (N-terminal heptad repeat) 和 CHR (C-terminal heptad repeat) 相互作用形成 6-螺旋束结构,使病毒粒子和细胞膜紧密接触,最终导致膜融合,使得 HIV 病毒粒子进入宿主细胞^[4]。通过对 HIV 进入过程的研究,一些新的药物作用靶标被发现,其中辅助受体 CCR5 和 CXCR4 尤其备受关注。

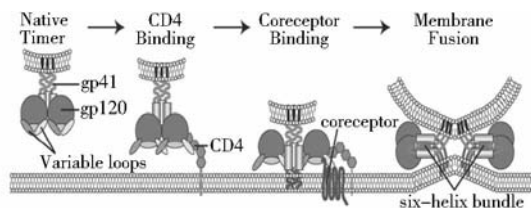


图 1 HIV 入侵过程^[3]

Fig. 1 The HIV entry process^[3]

2 吸附抑制剤

HIV 进入细胞的第一步,便是病毒包膜糖蛋白

收稿日期:2010-12-21 修回日期:2011-02-09

* 国家自然科学基金项目(30772722)、广州市科技计划项目(2009J1-C541)资助项目

** 通讯作者,电子邮箱:lsswwy@mail.sysu.edu.cn

gp120 吸附到 CD4 受体细胞上并同 CD4 受体结合。任何能够阻止这一过程发生的药物,都可能有效抑制 HIV 的感染,大多数吸附抑制剂对 R5 和 X4 嗜性的病毒都有很好的抑制作用,能够有效延缓病情的发展。吸附抑制剂主要有带负电荷的多聚阴离子,针对 gp120 和 CD4 受体各功能域的单克隆抗体,以及同各功能域相互作用的小分子。

由于包膜糖蛋白 gp120 的某些区域带有大量正电荷,多聚阴离子能与这些区域非特异性结合,从而阻止 gp120 与 CD4 受体结合。研究表明:硫酸葡聚糖、环糊精硫酸酯、肝磷脂等都能有效阻止 HIV 病毒的非特异性吸附^[5],但由于作用强度较低、口服吸收差,目前主要作为一种有效的局部杀微生物剂在使用。Cyanovirin-N(CV-N)是一种由蓝藻合成分泌的天然蛋白质,分子质量约为 11kDa,能够特异地结合到 gp120 的高甘露糖区域,在极低的浓度下便能有效地抑制 HIV 病毒对靶细胞的吸附,体内外实验均证明 Cyanovirin-N 比以 gp120 为靶标的抗体 2G12 和 PRO2000 有着更强的抗病毒活性^[6],为此,科学家正在寻找一种有效的低成本大规模表达 Cyanovirin-N 蛋白的技术^[7]。

PRO542 是一种重组四聚体 CD4-IgG2 抗体样融合蛋白,通过将人源 IgG2 重链和轻链的可变区部分用 CD4 的 D1 和 D2 区取代而构成。PRO542 是模拟 CD4 受体的结构,能同病毒包膜糖蛋白 gp120 结合,从而阻止了病毒吸附到 CD4 受体细胞上。I / II 期临床试验均证明其具有良好的耐受性、抗病毒活性和低的毒性,尤其在用于 HIV 重症感染者治疗时取得了更好的疗效,同时未检测到相应的抗体存在,对 X4 嗜性的病毒也有明显的抑制作用^[8]。Progenics 公司目前正在将 PRO542 作为一种职业性或产前 HIV 暴露后用药进行研究。

BMS-378806 和 BMS-488043 是由 Bristol—Myers Squibb 公司开发的两种新的小分子吸附抑制剂,通过特异地作用于 gp120,导致其与 CD4 和 CCR5 结合区域发生构象改变,从而阻止 HIV 病毒进入靶细胞,IC₅₀ 约为 5Nm,这两种药都有很好的药动学特性和口服利用率。BMS-378806 由于在 I 期临床试验中不能暴露其靶标从而终止了进一步的试验;而 BMS - 488043 在体外对 X4 嗜性、R5 嗜性和 R5/X4 双嗜性病毒株都有抑制作用,临床 I 期的实验结果表明该化合物具有好的口服利用度,并且无明显毒性,目前已经进入到临床 II 期试验阶段^[9]。

TNX-355 是一种针对 CD4 的人源化单克隆抗体,通过连接到 CD4 的 D2 区域,阻止 CD4 诱导的前连接复合物的构象改变。由于所有 HIV-1 型病毒和宿主细胞结合都要通过 CD4,因此 TNX-355 可阻断所有 HIV-1 型病毒的入侵。I 期临床试验表明 TNX-355 能够明显降低 HIV-1 病毒粒子的负载和提高 CD4⁺ 细胞的含量,每周或每两周注射一次是安全的,没有检测到相应的免疫原反应和药物副作用现象,耐受性较好,抗病毒活性也很高^[10],目前已进入到临床 II 期试验。

CADA (cyclotriazadisulfonamide) 类似物具有极高的抗 HIV 活性,结合实验表明,CADA 并不直接与 CD4 受体或病毒包膜糖蛋白结合。进一步的研究发现,CADA 类似物在 CD4 的下游调控中具有特殊功能,通过分析 CD4 的 mRNA 表达水平,表明 CADA 复合物并不在转录水平而主要在翻译水平发挥作用,从细胞培养基中除去 CADA,CD4 细胞能完全恢复其正常的表达水平。这类复合物在亚微摩尔水平便对各种类型的 HIV-1 型病毒具有极高的抑制作用,与反转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、整合酶抑制剂、gp41 融合抑制剂 T20、CXCR4 抑制剂、AMD3100 等联合使用时有协同增效作用^[11]。

3 辅助受体类抑制剂

3.1 CCR5 抑制剂

1996 年,在发现 CD4 分子是病毒在细胞膜上的受体 10 多年后,科学家才发现 CCR5 和 CXCR4 是 HIV 入侵的辅助受体,使趋化因子及其类似物成为了首选的 HIV 进入抑制剂。Liu 等^[12]研究发现在正常人群中存在天然的 CCR5Δ32 纯合子类型,这类人群对 HIV-1 感染表现出高度抗性,同时并未出现任何生理异常现象,这使 CCR5 成为了一个理想的抗 HIV 靶标。在 HIV 入侵过程中,先是 CCR5 的 N 端同病毒包膜糖蛋白 gp120 结合,引发 gp120 和 CCR5 自身的构象发生变化,暴露出 gp120 的 V3 区,接着 V3 区同 CCR5 的胞外第二环相互接触,引起进一步的反应^[13]。理论上,任何能封阻 CCR5 的 N 端和胞外第二环,以及作用于 CCR5 其他结构域诱发 CCR5 构象产生特异变化或下调 CCR5 表达量的药物,都能有效抑制 HIV 的入侵。因此,各种 CCR5 拮抗剂不断涌现,Maraviroc 已经被 FDA 批准上市,其他很多抑制剂也进入了临床试验阶段。

在三个 CC 类化学趋化因子中,RANTES 的抑制效应最强。RANTES 是一种天然的 β 趋化因子配体,能抑制 HIV 的复制,其作用机理是:一方面通过空间位阻

效应阻断 gp120 与 CCR5 的结合;另一方面通过下调细胞表面 CCR5 的表达,即阻断 CCR5 内吞之后的再循环。但 RANTES 会引发 CCR5 介导的下游信号调控,导致比较严重的副作用。通过对 RANTES 的 N 端进行修饰去除其信号转导功能,保留其与 CCR5 的结合能力得到了 AOP- RANTESHE 和 NNY- RANTES,两者均能在 nmol/L 水平抑制 R5 嗜性的病毒复制^[14]。通过将野生型的第一位和第五位的半胱氨酸突变为丝氨酸,得到了 C1、C5- RANTES,这是第一个不具有竞争性抑制作用的 RANTES 衍生物,但仍保留了很高的抗 HIV 活性^[15],研究发现几乎所有的 RANTES 修饰物均具有使 CCR5 受体内源化并调控细胞表面的 CCR5 表达量的作用,从而抑制 HIV 病毒的复制。由于 RANTES 衍生物都是蛋白质,不能口服,容易同细胞表面的蛋白聚糖结合产生聚合效应,因此在注射后可能显示特殊的药物动力学,使 RANTES 衍生物尚未开发成为有效的 HIV 治疗药物。

PRO140 是一种比较有希望的 CCR5 抑制剂,为人源化的抗 CCR5 的单克隆抗体,能覆盖 CCR5 的多个胞外结构域,有效阻止 gp120 同 CCR5 的结合,目前已被 FDA 列入快速批准候选药物。非常有趣的是,PRO140 在抑制病毒感染时对于 CCR5 介导的信号转导却没有明显的抑制作用,这可能避免了像其他的 CCR5 拮抗剂一样由于阻断了 CCR5 的正常功能而带来的副作用。同其他小分子化合物相比,抗体类药物具有高度的靶标特异性,能将非特异性靶标带来的副作用和毒性降到最低。在 I / II 期临床实验中,PRO140 均表现出良好的抗病毒活性、半衰期较长、耐受性好等特点,同时未检测到抗性病毒株的出现^[16],在与其它 CCR5 小分子拮抗剂联合使用时,能产生协同增强效应^[17]。

TAK-779 是第一种 CCR5 的非肽类小分子拮抗剂,在 nmol/L 水平便能抑制 RANTES 同表达 CCR5 的 CHO 细胞结合,TAK-779 通过连接到 CCR5 的细胞外侧面,跨膜 α 螺旋 1、2、3、7 形成的袋状结构内,选择性抑制以 CCR5 为靶标的趋化因子同其结合。虽然 TAK-779 没有显示出任何的毒性,但由于口服效用较低限制了它的进一步发展。TAK-779 的改进型 TAK-652 在临床实验中发现,对 HIV 的不同亚型均显示出更高的抗病毒活性,其 IC_{50} 约为 0.25 nmol/L,在临床前动物实验中发现 TAK-652 能通过口服的方式有效地发挥活性^[18],目前已进入到临床 II 期试验阶段。进一步的改进导致了 TAK-220 的发现,TAK-220 在 nmol/L 水平便

显示出极强的抗 HIV-1 活性,而且能口服、靶标特异性强、代谢稳定性较好,目前已进入临床试验阶段^[19]。

Maraviroc 是一种苯胺酰胺类化合物,在 nmol/L 水平便能发挥抗病毒作用,Maraviroc 是通过连接到 CCR5 受体的细胞外侧面,跨膜 α 螺旋 2、3、6、7 形成的袋状结构内,其与 TAK-779 的结合位点是不同的。放射性配体结合实验证实:Maraviroc 阻断了 gp120 同 CCR5 的结合,导致膜融合过程无法发生,从而阻止了病毒的入侵^[20]。尽管 Maraviroc 能抑制 CCR5 的某些下游信号调控,但它并没有引发细胞内钙离子的释放和 CCR5 的内化,表明 Maraviroc 是缺乏 CCR5 激动剂活性的。在临床试验中展示出良好的口服药效性,于 2007 年 8 月被 FDA 批准上市。Maraviroc 是第一个应用于治疗的辅助受体拮抗剂,与目前使用的 HIV 治疗药物作用机制完全不同,为当前出现耐药性的 HIV 患者提供了新的选择,同时也能降低抗性病毒株的出现概率。但 Maraviroc 的长期使用可能诱发 R5 嗜性的病毒株向 X4 嗜性的病毒株转变,同时不可避免的会出现抗 Maraviroc 的 R5 嗜性病毒株。有报道称 Maraviroc 的抗性病毒株已经产生,通过 gp120 的 V3 区突变,使病毒株能应用已经结合 Maraviroc 的 CCR5 辅助受体进入细胞^[21]。

Vicriviroc 是一种小分子脲嘧啶类化合物,同其第一代产物 Ancriviroc 相比,Vicriviroc 具有更高的抗病毒活性和更好的药动学特征。这两种药物都具有好的口服效果,通过结合到 CCR5 跨膜区形成的空穴内抑制其与 gp120 的结合。由于高剂量的 Ancriviroc 将导致 CNS 副作用和引起心律异常,使得 Ancriviroc 的进一步临床试验被终止。通过对 Ancriviroc 的改进导致了 Vicriviroc 的发现,Vicriviroc 对多种 HIV-1 型病毒株均具有较高的抑制作用,在同其他药物联合使用时具有显著的协同增强效应^[22]。Robert 等^[23]研究发现 gp120 的 V3 区和 C4 区上的氨基酸突变,将影响 gp120 同 CCR5 的 N 端和胞外第二环的结合,进而导致病毒抗药性的产生。由于 III 期临床试验发现,同目前流行的 HIV 治疗药物相比,Vicriviroc 并未展示出应有的优越性,Merck 公司被迫于 2010 年 6 月宣布终止 Vicriviroc 的进一步试验。另外比较理想的脲嘧啶类化合物还有 AD-101 和 INCB9471^[24]。AD-101 通过阻止 gp120/CD4 复合物同 CCR5 的相互作用,表现出极好的抗病毒潜力,目前已进入到临床试验阶段。INCB9471 对更多的 HIV-1 型,包括某些抗性亚型都具有抑制作用,目前已

经进入到临床 III 期试验。

3.2 CXCR4 抑制剂

CXCR4 也是一种趋化因子受体,随着病情的发展,R5 嗜性的病毒将向 X4 嗜性转化,使病毒获得能够利用 CCR5/CXCR4 的能力,因此开发 CXCR4 拮抗剂是十分必要的。理想的 CXCR4 拮抗剂是既能阻止 HIV 的入侵,又不影响 CXCR4 介导的下游信号调控和引起 CXCR4 的内在化。然而,在个体发育的许多过程中 CXCR4 都发挥着极其重要的作用。例如,在老鼠基因组中敲除 CXCR4 基因将导致不正常的大脑发育和胚胎致死效应^[25],这使得 CXCR4 拮抗剂的开发变得颇为艰难。

目前,CXCR4 的拮抗剂主要是模拟其天然配体 SDF-1 的结构。例如,由 18 个氨基酸残基组成的 T22、14 个氨基酸残基组成的 T134 和 T140。它们通过特异地连接到辅助受体 CXCR4 的胞外环上,阻断了 CXCR4 同 gp120 的结合。同 T22 相比,T134 和 T140 拥有更低的毒性和更高的抗病毒活性^[26-27]。进一步的研究表明,4 个氨基酸残基,Arg2、NaI3、Try5、Arg14 对于 T140 发挥作用是必须的,这一发现导致了 FC131 的发现,其 IC₅₀ 大约为 38nmol/L^[28]。Daelemans 等合成了由 9 个氨基酸残基组成的 CGP64222,能特异性地阻断 gp120 同辅助受体 CXCR4 的连接,在 nmol/L 水平便显示出极好的抗病毒活性,进一步的研究揭示 CGP64222 阻止了 Tat 蛋白和 TAR 因子的相互作用^[29]。

AMD3100 是一种小分子环胺类似物,在 nmol/L 水平便显示出良好的抗病毒活性,但由于注射 AMD3100 后会起引起心律失常而在临床 II 期被终止。有趣的是,在接受 AMD3100 治疗的病人中发现,AMD3100 有动员骨髓造血干/祖细胞进入外周血循环的效果^[30],导致其被 FDA 批准作为一种造血干细胞动员药物而上市。另一种环胺类似物 AMD3465,比 AMD3100 显示出更好的抗病毒能力,但仍然不能通过口服的方式给药。环胺类药物的作用机制是由于带有大量的正电荷能同 CXCR4 上的酸性氨基酸相互作用,从而阻止病毒的入侵。第三代产物 AMD070 在结构上与前两代产物是完全不同的,并具有良好的口服效用^[31],同 CXCR4 的特异结合性也非常高。AMD070 同 AMD3465 的作用位点相似,对 X4 和 R5/X4 嗜性的病毒株显示出相同的抑制效应,由于在临床前毒性试验中,AMD070 导致肝的组织学异常,而终止了进一步试验。目前还未有 CXCR4 类拮抗剂在临床中展示出良好活性的报道,但几种正

在研究的拮抗剂,证明有很好的抑制 X4 嗜性病毒的活性^[32-33]。

4 融合抑制剂

gp41 是 HIV 的另一个包膜糖蛋白,其通过非共价键同 gp120 相连,介导 HIV 进入细胞的膜融合。gp120 先后同 CD4 和 CCR5 结合,导致 gp120 的结构重排,从而引起 gp41 的 FP 区暴露,以便插入细胞膜内。同时 gp41 的 NHR 和 CHR 区,将形成一个稳定的 6-螺旋束结构,以拉近病毒同细胞之间的距离,最终导致膜融合过程的发生。因此,任何能阻止 6-螺旋束形成的分子,便能抑制 HIV 的融合过程,这使得 FP(fusion peptide)、NHR 和 CHR 区成为融合过程的作用靶点。

T20 是一种模拟 gp41 的 CHR 区的由 36 个氨基酸残基组成的多肽,其作用机制是:通过竞争连接到 gp41 的 NHR 区阻止了 6-螺旋束和融合位点的形成,从而抑制了病毒的入侵,在 2003 年,T20 被 FDA 批准同其他 ARTs 联合用于治疗感染病人试验。Magombedze 等^[34]研究发现,T20 同融合抑制剂或蛋白酶抑制剂联合使用,比同反转录酶类抑制剂联合使用具有更强的抗病毒效果。由于 T20 在体内的抗病毒活性较低,半衰期较短,易引起病毒变异,皮下注射位点反应明显,而且 III 期临床试验发现,接受 T20 治疗的病人有着更高的感染细菌性肺炎的概率^[35],使得 T20 更多的作为二线抗病毒药物和用于急救治疗药物。第二代产物 T1249(tifuvirtide)是由 39 个氨基酸残基组成的多肽,由 gp41 的 CHR、和 TRD(tryptophan-rich domain)序列组成,临床试验中表现出比 T20 更高的抗病毒活性和更长的半衰期,对 HIV-1、HIV-2、SIV 型毒株和大多数的 T20 抗性病毒株均具有良好的抑制作用,但因合成困难而终止了进一步的临床试验。第三代产物 T1144 是由 38 个氨基酸残基组成的多肽,由 gp41 的 PBD(pocket-binding domain)和 HR(heptad repeat)序列组成,但突变了其中的几个氨基酸残基,以增强其螺旋性和形成 6-螺旋束的稳定性,显示出比 T20 更高的抗病毒活性和更好的药动学特征,对 T20 抗性毒株同样具有抑制作用,且不易引发病毒产生抗性突变,表明 T1144 有着诱人的发展前景^[36]。

C34 是由 gp41 的 PBD 和 CHR 区组成的多肽,通过结合到 gp41 的 NHR 区而抑制 6-螺旋束的形成,从而阻止病毒的入侵。尽管 C34 尚未被批准用于临床试验,但 C34 展示出比 T20 更强的抗病毒能力和更高的

稳定性,有发展为新一代融合抑制剂的潜力,科学家正在努力对 C34 进行改造,以进一步提高 C34 的抗病毒能力和稳定性^[37-38]。在改造过程中发现,把 gp41 第 183 位的丝氨酸取代为丙氨酸能显著提高其抗病毒活性,通过 X 射线晶体衍射发现,这一取代增强了融合抑制剂与 NHR 的疏水性结合^[39]。以 CHR 区为基础的多肽还有 CP32、Sifuvirtide、SC34EK 等,它们同 T20 相比,均展示出更好的抗病毒活性和更高的稳定性,对 T20 抗性病毒株也具有抑制作用,其中 Sifuvirtide 已经完成了临床 II 期试验^[40]。

C52L 由 gp41 的 CHR 和 TRD 两部分重组而成,在体外实验中,通过连接到 gp41 的 NHR 区,在 nmol/L 水平便能强烈地抑制各种 HIV-1 型病毒,对 T20 抗性病毒株也具有有效的抑制作用^[41]。HR212 由两分子的 HR2(C-terminal heptad repeat)和一分子的 HR1(N-terminal heptad repeat)组成,连接顺序是 HR2-HR1-HR2。HR212 能与 gp41 暴露出的 HR2 区域形成稳定的 6-螺旋束结构,阻止 gp41 介导的膜融合过程,在 nmol/L 水平便能很好的阻止各种 HIV-1 型毒株的入侵,同 T20 相比,具有更高的抗病毒活性和更好的稳定性,而且能有效抑制 T20 抗性病毒株,表明 HR212 有发展为新一代融合抑制剂的潜力^[42]。由于 C52L 和 HR212 均能在大肠杆菌中表达和纯化,其成本比人工合成多肽低很多,同 T20 和 T1249 相比, C52L 和 HR212 拥有更好的商业应用前景。

目前大多数的融合抑制剂都是多肽,不宜口服,而且成本较高,因此小分子融合抑制剂仍然是药物开发的主要目标。ADS-J1 是第一个被报道的小分子融合抑制剂,通过连接到 gp41 的 NHR 区,从而阻止膜融合过程的发生,在 $\mu\text{mol/L}$ 水平便展示出良好的抗病毒活性。进一步的研究表明,ADS-J1 是通过同 NHR 区的 K574 氨基酸残基相连,阻止了其同 CHR 区的 D632 氨基酸残基相连;而 NHR 区的 K574 氨基酸残基同 CHR 区的 D632 氨基酸残基相连形成盐桥,是形成稳定的 6-螺旋束的一个重要步骤^[43]。但 ADS-J1 含有磺酸基团和含氮基团,有诱发肿瘤的潜在危险,因此并不是一个十分理想的候选药物。

PRP103611 是三萜类衍生物,作用于 gp41 的环状区,能在 nmol/L 水平展示出良好的抗病毒能力。通过对 PRP103611 抗性病毒株分析,发现 gp41 第 84 位丝氨酸的突变会使病毒获得足够的抗药性,可能机制是 84 位的丝氨酸突变为一个极性氨基酸,导致了 gp41 结

构的改变,从而影响了 gp120-gp41 复合物的稳定性。PRP103611 的立体异构体 IC9564 显示出同样的抗病毒能力,研究发现,IC9564 诱导 gp120 产生一个无关的结构改变,这种改变使其不能触发 gp41 的结构重排,阻止了膜融合过程^[44]。

5 不同抑制剂的协同效应

由于不同的进入抑制剂是在 HIV 入侵过程的不同阶段发挥作用。例如,Maraviroc 在病毒粒子同 CD4 结合后,在 gp41 介导的膜融合之前发挥作用,而 T20 在 gp41 介导的膜融合过程中发挥作用;使得不同种类进入抑制剂的协同效应成为临床研究的重点。许多进入抑制剂能延缓 HIV 进入细胞的过程,从而相对增加了病毒粒子对其他进入抑制剂的敏感性。Ji 等^[45]研究发现,在单克隆单体、辅助受体类抑制剂和 T20 之间,有明显的协同增强效应。Pan 等^[46]研究发现, T20 同 T1249 或 T1144 联合使用具有显著的协同增强效应,对由其中某种拮抗剂单独引发的抗药病毒株也具有很高的抑制作用,而三者同时使用则显示出超高的协同增强效应。这些发现为治疗 HIV 病人提供了新的策略,作用于不同靶标或是同一靶标不同功能域的抑制剂联合使用,由于协同增强效应,能显著提高抗病毒活性,同时也可减少用药剂量和延缓抗性病毒株的产生^[11,17,47]。

6 新的双功能抑制剂

基于当前的协同给药原理,Kopetzki 等^[48]设计了一种双功能抑制剂 BFFI,期望这种设计能减少药物间相互影响及其毒性,以及延缓抗性病毒株的出现。BFFI 是由 CCR5 的单克隆抗体通过共价键与一种融合抑制剂 T-2635 相连,对于 R5 嗜性的病毒, BFFI 展示出比 CCR5 的单克隆抗体和融合抑制剂 T-2635 单独使用时更强的抑制作用,但对 X4 和 R5/X4 嗜性的病毒则没有抑制作用。通过锚定模型发现, BFFI 需要通过它的 CCR5 单克隆抗体部分连接到细胞上才能发挥抑制作用,对于没有表达 CCR5 辅助受体的细胞, BFFI 则不能发挥其抑制作用,因此不能阻挡 X4 嗜性病毒的入侵^[48]。为了克服此缺陷, Jekle 等^[49]又设计了一种新的双功能抑制剂 CD4-BFFI, CD4-BFFI 是将 CD4 的单克隆抗体 6314 和融合抑制剂 T-651 通过连接子连接起来。这种新的双功能抑制剂比单克隆抗体 6314 和融

合抑制剂 T-651 单独使用时或联合使用时都具有更高的抗病毒活性,对单克隆抗体 6314 和融合抑制剂 T-651 有抗性的病毒株也具有相当强的抑制作用,更为重要的是,这种双功能抑制剂对几乎所有种类的 HIV-1 型病毒株都具有完全的抑制作用^[49]。尽管这种新的抑制剂还没有进入到临床实验阶段,不排除有某些潜在的风险,但这种设计提供了一个很好的启示,双(多)功能拮抗剂有望成为未来蛋白质类抑制剂的重要发展方向。

参考文献

- [1] Huang L M, Jeang K T. HIV-1 at age 25: some thoughts for Taiwan and China. *J Formos Med Assoc*, 2008, 107:907-908.
- [2] Louie M, Markowitz M. Goals and milestones during treatment of HIV-1 infection with antiretroviral therapy: A pathogenesis-based perspective. *Antiviral Res*, 2002, 55(1):15-25.
- [3] Tilton J C, Doms R W. Entry inhibitors in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Research*, 2010, 81:91-100.
- [4] Moore J P, Doms R W. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(19):10598-10602.
- [5] Callaha L N, Phelan M, Mallinson M, et al. Dextran sulfate blocks antibody binding to the principal neutralizing domain of human immunodeficiency virus type 1 without interfering with gp120-CD4 interactions. *J Virol*, 1991, 65(3):1543-1550.
- [6] Fischetti L, Barry S M, Hope T J, et al. HIV-1 infection of human penile explant tissue and protection by candidate microbicides. *Aids*, 2009, 23:319-328.
- [7] Xiong S, Fan J, Kitazato K. The antiviral protein cyanovirin-N: the current state of its production and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86:805-812.
- [8] Jacobson J M, Israel R J, Lowy I, et al. Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48(2):423-429.
- [9] Kadow J, Wang H G, Lin P F. Small-molecule HIV-1 gp120 inhibitors to prevent HIV-1 entry: An emerging opportunity for drug development. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006, 7(8):721-726.
- [10] Jacobson, J M, Kuritzkes D R, Godofsky E, et al. Safety, Pharmacokinetics, and antiretroviral activity of multiple doses of ibalizumab (formerly TNX-355), an anti-CD4 monoclonal antibody, in human immunodeficiency virus type 1-infected adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53(2):450-457.
- [11] Vermeire K, Brouwers J, Herreweghe Y V, et al. CADA, a Potential anti-HIV microbicide that specifically targets the cellular CD4 receptor. *Current HIV Research*, 2008, 6(3):246-256.
- [12] Liu R, Paxton W A, Choe S, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell*, 1996, 86:367-77.
- [13] Huang C C, Lam S N, Acharya P, et al. Structures of the CCR5 N terminus and of a tyrosine-sulfated antibody with HIV-1 gp120 and CD4. *Science*, 2007, 317:1930-1934.
- [14] Simmons G, Clapham P R, Picard L, et al. Potent inhibition of HIV-1 infectivity in macrophages and lymphocytes by a novel CCR5 antagonist. *Science*, 1997, 276(5310):276-279.
- [15] Polo S, Nardese V, De Santis C, et al. Enhancement of the HIV-1 inhibitory activity of RANTES by modification of the N-terminal region: Dissociation from CCR5 activation. *Eur J Immunol*, 2000, 30(11):3190-3198.
- [16] Jacobson J M, Lalezari J, Thompson M A, et al. Phase 2a Study of the CCR5 Monoclonal Antibody PRO 140 Administered Intravenously to HIV-Infected Adults. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010, 54(10):4137-4142.
- [17] Ji C, Zhang J, Dioszegi M, et al. CCR5 small molecule antagonists and monoclonal antibodies exert potent synergistic antiviral effects by co-binding to the receptor. *Mol. Pharmacol*, 2007, 72:18-28.
- [18] Seto M, Aikawa K, Miyamoto N, et al. Highly potent and orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological activities of 1-benzazocine derivatives containing a sulfoxide moiety. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2006, 49(6):2037-2048.
- [19] Cécile L T, Françoise G, Yongbiao G, et al. TAK-220, a novel small-molecule CCR5 antagonist, has favorable anti-human immunodeficiency virus interactions with other antiretrovirals *in vitro*. *American Society for Microbiology*, 2005, 49(8):3483-3485.
- [20] Dorr P, Westby M, Dobbs S, et al. Maraviroc (UK-427,857), a potent, orally bioavailable, and selective small-molecule inhibitor of chemokine receptor CCR5 with broad-spectrum anti-human immunodeficiency virus type1 activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(11):4721-4732.
- [21] Tilton J C, Wilen C B, Didigu C A, et al. A maraviroc-resistant HIV-1 with narrow cross-resistance to other CCR5 antagonists depends on both N-terminal and extracellular loop domains of drug-bound CCR5. *J Virol*, 2010, 84(20):10863-10876.
- [22] Strizki J M, Tremblay C, Xu S, et al. Discovery and characterization of vicriviroc (SCH 417690), a CCR5 antagonist with potent activity against human immunodeficiency virus type 1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005, 49(12):4911-

- 4919.
- [23] Robert A O, Hou Y, Lei B, et al. Clinical resistance to vicriviroc through adaptive V3 loop mutations in HIV-1 subtype D gp120 that alter interactions with the N-terminus and ECL2 of CCR5. *Virology*, 2010,400:145-155.
 - [24] Seibert C, Ying W, Gavrilo S, et al. Interaction of small molecule inhibitors of HIV-1 entry with CCR5. *Virology*, 2006, 349(1):41-54.
 - [25] Zou Y R, Kottmann A H, Kuroda M, et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature*, 1998, 393(6685):595-599.
 - [26] Arakaki R, Tamamura H, Premanathan M, et al. T134, a small-molecule CXCR4 inhibitor, has no cross-drug resistance with AMD3100, a CXCR4 antagonist with a different structure. *J Virol*, 1999, 73(2):1719-1723.
 - [27] Tamamura H, Xu Y, Hattori T, et al. A low-molecular-weight inhibitor against the chemokine receptor CXCR4: A strong anti-HIV peptide T140. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998, 253(3):877-882.
 - [28] Fujii N, Oishi S, Hiramatsu K, et al. Molecular-size reduction of a potent CXCR4-chemokine antagonist using orthogonal combination of conformation- and sequence-based libraries. *AngewChem Int Ed Engl*, 2003, 42(28):3251-3253.
 - [29] Daelemans D, Schols D, Witvrouw M, et al. A second target for the peptoid Tat/transactivation response element inhibitor CGP64222: Inhibition of human immunodeficiency virus replication by blocking CXCR4-chemokine receptor 4-mediated virus entry. *Mol Pharmacol*, 2000, 57(1):116-124.
 - [30] Liles W C, Rodger E, Broxmeyer H E, et al. Augmented mobilization and collection of CD34 + hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Transfusion*, 2005, 45: 295-300.
 - [31] Stone N D, Dunaway S B, Flexner C, et al. Multipledose escalation study of the safety, pharmacokinetics, and biologic activity of oral AMD070, a selective CXCR4 receptor inhibitor, in human subjects. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51(7): 2351-2358.
 - [32] Murakami T, Kumakura S, Yamazaki T, et al. The novel CXCR4 antagonist KRH-3955 is an orally bioavailable and extremely potent inhibitor of human immunodeficiency virus type 1 infection: comparative studies with AMD3100. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53:2940-2948.
 - [33] Iwasaki Y, Akari H, Murakami T, et al. Efficient inhibition of SDF-1 α -mediated chemotaxis and HIV-1 infection by novel CXCR4 antagonists. *Cancer Sci*, 2009, 100: 778-781.
 - [34] Magombedze G, Garira W, Mwenje, E. Modelling the immunopathogenesis of HIV-1 infection and the effect of multidrug therapy: the role of fusion inhibitors in HAART. *Math Biosci Eng*, 2008, 5(3):485-504.
 - [35] Trotter B, Walmsley S, Reynes J, et al. Safety of enfuvirtide in combination with an optimized background of antiretrovirals in treatment-experienced HIV-1-infected adults over 48 weeks. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2005,40(4):413-421.
 - [36] Dwyer J J, Wilson K L, Davison D K, et al. Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12772-12777.
 - [37] Soonthornsata B, Tian Y S, Utachee P, et al. Design and evaluation of antiretroviral peptides corresponding to the C-terminal heptad repeat region (C-HR) of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Virology*, 2010, 405: 157-164.
 - [38] Huang W, Groothuys S, Heredia A, et al. Enzymatic glycosylation of triazole-linked GlcNAc/Glc-Peptides: synthesis, stability and anti-HIV activity of triazole-linked HIV-1 gp41 glycopeptide C34 analogues. *ChemBioChem*, 2009,10(7) 1234-1242.
 - [39] Watabe T, Terakawa Y, Watanabe K, et al. X-ray crystallographic study of an HIV-1 fusion inhibitor with the gp41 S138A substitution. *J Mol Biol*, 2009, 392:657-665.
 - [40] FusoGen. Available at: <http://www.fusogen.com/en/indexen.asp.html>. Date accessed; August 2, 2010].
 - [41] Deng Y, Zheng Q, Ketas T J, et al. Protein design of a bacterially expressed HIV-1 gp41 fusion inhibitor. *Biochemistry*, 2007, 46:4360-4369.
 - [42] Pang W, Wang R R, Yang L M, et al. Recombinant protein of heptad-repeat HR212, a stable fusion inhibitor with potent anti-HIV action *in vitro*. *Virology*, 2008, 377:80-87.
 - [43] He Y, Liu S, Jing W, et al. Conserved residue Lys574 in the cavity of HIV-1 gp41 coiled-coil domain is critical for sixhelix bundle stability and virus entry. *J Biol Chem*, 2007, 282:25631-25639.
 - [44] Huang L, Lai W, Ho P, et al. Induction of a nonproductive conformational change in gp120 by a small molecule HIV type 1 entry inhibitor. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23(1):28-32.
 - [45] Ji C, Zhang J, Dioszegi M, et al. CCR5 small-molecule antagonists and monoclonal antibodies exert potent synergistic antiviral effects by cobinding to the receptor. *Mol Pharmacol*, 2007, 72: 18-28.
 - [46] Pan C, Cai L, Lu H, et al. Combinations of the first and next generation HIV fusion inhibitors exhibit highly potent synergistic effect against enfuvirtide-sensitive and resistant HIV-1 strains. *J*

Viol, 2009, 83:7862-7872.

[47] Ho D D. Therapy of HIV infections: problems and prospects. Bull N Y Acad Med, 1996, 73:37-45.

[48] Kopetzki E, Jekle A, Ji C, et al. Closing two doors of viral entry: intramolecular combination of a coreceptor- and fusion inhibitor of

HIV-1. J Virol, 2008, 5:56.

[49] Jekle A, Chow E, Kopetzki E, et al. CD4-BFFI: A novel, bifunctional HIV-1 entry inhibitor with high and broad antiviral potency. Antiviral Resaerch, 2009, 83:257-266.

Research on HIV Entry Inhibitors

ZHANG Hao-yuan WU Wen-yan

(College of Life Sciences, Sun Yat-sen University,Guangzhou 510275, China)

Abstract In recent years, various kinds of HIV entry inhibitors have been invented with the discovery of the HIV entry process. They are divided into three main classes: attachment inhibitors, co-receptor binding inhibitors, and fusion inhibitors. The mechanism of action and structure of several important inhibitors are discussed. Many inhibitors are in advanced clinical trials. Especially, the fusion inhibitor T20 has been approved for the treatment of the HIV infected patients with other antiretroviral therapys,by FDA ,in 2003 and the CCR5 inhibitor maraviroc has been approved by FDA , in 2007.

Key words HIV Inhibitor Viral entry

广 告 索 引

北京中原公司(封面),颇尔过滤器(北京)有限公司(封二),爱普拜斯应用生物系统贸易(上海)有限公司(彩1),上海日泰医药设备工程有限公司(彩2),广州市艾贝泰制药设备科技有限公司(彩3),上海森松制药设备工程有限公司(彩4),3M 中国有限公司(彩5),梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司(彩6),上海开放生物科技有限公司(彩7),镇江东方生物工程设备公司(彩8-9),伯乐生命医学产品(上海)有限公司(彩10),宝生物工程(大连)有限公司(彩11),安倍医疗器械(上海)有限公司(彩12),Waters(中彩1),上海国强生化装备工程有限公司(中彩2-3),上海伯豪生物技术有限公司(彩4),GE imagination at work (封三),纽英伦生物技术(北京)有限公司(封底)。