

HIV-1整合酶的功能及其抑制剂的研究进展

沈学彬^{1,2} 叶剑¹ 杨立莉^{1,2} 陈欢³ 楼宜嘉² Samson A. Chow^{1,4*}

(¹浙江大学浙江加州国际纳米技术研究院, 杭州 310029; ²浙江大学药学院药理毒理与生化研究所, 杭州 310058;

³浙江省微生物研究所, 杭州 310012; ⁴加州大学洛杉矶分校医学院分子药理学系, 分子生物学研究所和 UCLA 艾滋病研究所, 洛杉矶 90095, 美国)

摘要 I型人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)在宿主细胞内经逆转录得到的cDNA, 由整合酶(integrase, IN)催化插入到宿主基因组DNA中, 该过程称为整合过程。整合是HIV-1复制周期中不可缺少的步骤, 对于病毒的复制至关重要, 因此对整合酶的抑制能够有效地起到抗HIV的作用。该文综述了整合酶的结构与功能以及目前关于整合酶抑制剂的最新研究进展。

关键词 AIDS; HIV-1; 整合酶; 整合酶抑制剂

Research Progress of HIV-1 Integrase and Its Inhibitors

Shen Xuebin^{1,2}, Ye Jian¹, Yang Lili^{1,2}, Chen Huan³, Lou Yijia², Samson A. Chow^{1,4*}

(¹Zhejiang-California International NanoSystems Institute, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ²Institute of Pharmacology & Toxicology and Biochemical Pharmaceutics, Zhejiang University, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

³Zhejiang Institute of Microbiology, Hangzhou 310012, China; ⁴Department of Molecular and Medical Pharmacology, Molecular Biology Institute and UCLA AIDS Institute, UCLA School of Medicine, Los Angeles 90095, USA)

Abstract After reverse transcription, the integrase enzyme catalyzes incorporation of HIV-1 (human immunodeficiency virus type 1) cDNA into the host cell genome, which is called integration. Since integration is vital to viral replication, the inhibition of integrase will definitely show a promising access to anti-HIV chemotherapy. This paper reviews the structure and function of integrase, as well as the latest progress of researches focusing on the inhibitors of integrase.

Key words acquired immunodeficiency syndrome (AIDS); human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1); integrase; integrase inhibitors

有关获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS)最初的报道见于上世纪80年代初期, 之后Gallo等^[1]首次阐明了人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)与AIDS的病原关系。目前, FDA批准的治疗方案以HIV-1生命周期中的三个阶段——融合过程(fusion)、逆转录过程(reverse transcription)和蛋白水解过程(proteolytic

processing)为靶点。这三个靶点的抑制剂相结合的联合疗法, 通常称为高效抗病毒疗法(highly active antiretroviral therapy, HAART), 是目前治疗AIDS的标准方案。尽管HAART的引入显著地抑制了HIV-1的复制, 大大提高了AIDS病人的生活质量, 但目前仍然没有一个有效的治愈手段。而且, 耐药病毒突变株的出现, 使得这种治疗方案受到了明显的限制,

收稿日期: 2013-05-13 接受日期: 2013-06-08

浙江省科技厅国际科技合作专项计划项目(批准号: I20130011)资助的课题

*通讯作者: Tel: (310)825-9600, Fax: (310)825-6267, E-mail: schow@mednet.ucla.edu

Received: May 13, 2013 Accepted: June 8, 2013

This work was supported by International Cooperation in Science and Technology Special Projects of Science and Technology Department of Zhejiang Province (Grant No. I20130011)

*Corresponding author. Tel: (310)825-9600, Fax: (310)825-6267, E-mail: schow@mednet.ucla.edu

网络出版时间: 2013-09-11 14:33 URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130911.1433.007.html>

因此新的抗病毒靶点的发现对于AIDS的治疗有着重要意义。

众所周知, 经逆转录得到的HIV-1病毒cDNA在整合酶(integrase, IN)的催化下插入到宿主基因组DNA中, 这一过程称为整合过程, 该过程对于病毒的复制是必需的, 因为只有整合到宿主染色体组中的病毒才能进行病毒基因组的转录以及病毒蛋白的表达。同时, 整合酶在HIV病毒颗粒脱壳^[2]以及逆转录过程^[3]中也扮演了重要角色, 而这两个过程均是病毒复制过程中的关键步骤, 因此在抗HIV治疗中对整合过程的抑制亦能发挥重要作用。而抑制整合过程最直接有效的方法便是使用整合酶抑制剂。进一步的研究发现, 在人体细胞中没有结构类似于整合酶的蛋白^[4], 因此整合酶抑制剂在治疗中将会更加安全、有效。近年来, 随着对整合酶结构及其功能研究的逐步深入, 人们对整合酶的认识也不断加强, 对于整合酶抑制剂的研究也取得了长足的进展。

1 HIV-1整合酶的结构

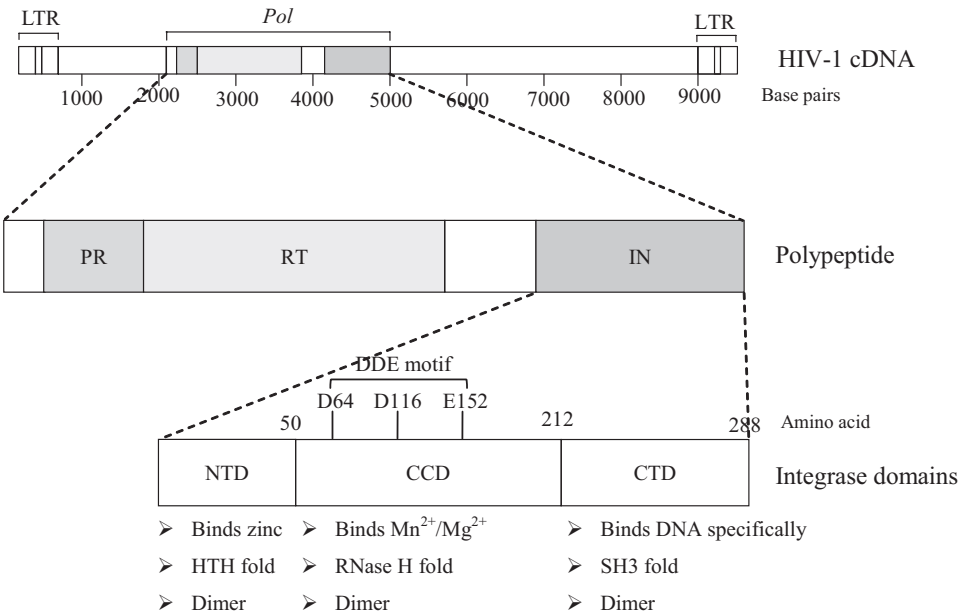
HIV-1的整合酶由病毒的pol基因编码, pol基因

经转录翻译后的产物为Pol多聚蛋白。病毒成熟后翻译蛋白酶并使Pol多聚蛋白分裂开来, 从而得到了整合酶(图1)。HIV-1整合酶是一个由288个氨基酸残基组成的蛋白, 其分子量为32 kDa。整合酶包含三个结构域, 分别为催化核心域(catalytic core domain, CCD)、N端结构域(N-terminal domain, NTD)和C端结构域(C-terminal domain, CTD)(图1)。

1.1 催化核心域(CCD)

整合酶的CCD由50~212位氨基酸残基组成并形成一个二聚体。CCD在结构上与Tn5和Mu转座酶、核糖核酸酶H(RNase H)以及其他逆转录病毒——如鼠白血病病毒(Murine leukemia virus, MLV)与鸟类肉瘤病毒(Avian sarcoma virus, ASV)的整合酶具有很高的相似性^[6]。CCD含有整合酶催化活性所必需的由D64、D116和E152这三个酸性氨基酸残基所组成的基序(DDE基序), 该基序是高度保守的, 组成该基序的三个氨基酸残基中的任意一个若发生突变都会破坏整合酶的活性, 从而影响病毒的复制过程。

D64和D116两个氨基酸残基通过二价金属离子(Mg²⁺或Mn²⁺)形成一个配位化合物。由于在ASV整合酶的晶体结构中发现了第二种金属^[7], 同时由于



Pol多聚蛋白水解时产生三种酶, 分别为蛋白酶(PR)、逆转录酶(RT)和整合酶(IN)。整合酶是在Pol多聚蛋白成熟过程中, 经HIV编码的蛋白酶水解而得到, 其包含三个结构域: 催化核心域(CCD)、N端结构域(NTD)和C端结构域(CTD)。

Product of the *pol* gene is a long polypeptide consisting of the three viral enzymes, protease (PR), reverse transcriptase (RT) and integrase (IN). Integrase is generated by cleavage of the Pol polypeptide by HIV protease during maturation. HIV-1 integrase consists of three structural and functional domains: the catalytic core domain (CCD), the amino-terminal domain (NTD), and the carboxy-terminal domain (CTD).

图1 HIV-1整合酶的结构域(根据参考文献[5]修改)
Fig.1 Domains of HIV-1 Integrase (modified from reference [5])

HIV-1整合酶与ASV整合酶在结构上的相似性, 因此有研究认为当HIV-1整合酶与DNA底物结合时, 亦存在第二种金属离子(Mg^{2+} 或 Mn^{2+})协调D116和E152残基的空间结构, 促进整合酶功能的正常发挥^[8-9], 也因此这个金属很有可能在病毒cDNA的3'端加工和链转移反应中能够将整合酶与DNA底物的磷酸二酯骨架连接起来。

尽管CCD包含酶催化位点, 但其需要与NTD和CTD形成二聚复合物才能催化3'端加工和链转移反应^[10]。体外实验显示, 在缺少NTD和CTD的情况下, CCD只能催化去整合反应, 但目前这个反应的生理学作用还未知^[11-12]。

1.2 N端结构域(NTD)

NTD包含了一个HHCC基序, 这是所有逆转录病毒整合酶的共同特性。HHCC基序结合一个锌离子能稳定NTD的折叠构象^[13-14], 这对于保证整合酶的活性是必要的。NTD对整合酶的催化作用有着很大的影响, 例如在镁离子与锌离子的参与下, NTD识别病毒cDNA, 并促使整合酶与其形成稳定的复合物^[15]。

1.3 C端结构域(CTD)

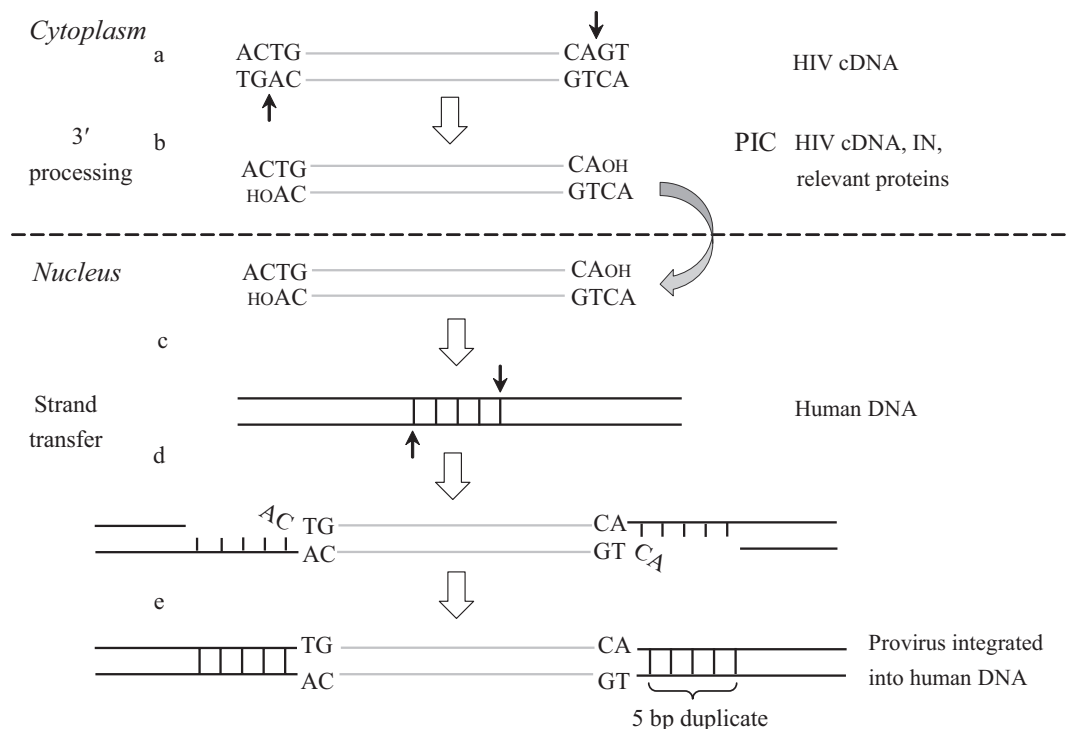
CTD由212~288位氨基酸残基组成, 是整合酶中保守性最低的区域, 其第220~270位氨基酸在溶液中可以形成二倍体, 并折叠成似SH3的结构^[16-17]。有研究发现, CTD可以作为整合酶抑制剂的一个识别位点^[18]。此外, CTD能够与逆转录酶产生相互作用, 并且该相互作用对于逆转录酶的催化活性相当重要^[19-20], 提示CTD可能对整合酶与其他蛋白之间的互作起到一定的促进作用^[21]。

2 HIV-1整合酶的功能

HIV-1整合酶的主要功能是催化经逆转录得到的病毒cDNA整合到人体基因组DNA中, 这个过程是通过3'端加工(3' processing)和链转移(strand transfer)反应两个步骤完成。同时, 整合酶在HIV病毒颗粒脱壳^[2]以及逆转录过程^[3]中也发挥着重要作用。

2.1 3'端加工

逆转录过程后, 在宿主细胞的胞浆中整合酶会对病毒cDNA 3'端的GT碱基进行切割(图2a), 露出保



a: 整合酶识别病毒cDNA末端的核苷酸序列GT; b: 并将其水解切除, 露出高度保守的CA末端, 3'端加工完成后整合酶与病毒cDNA及其他分子组成整合前复合物(PIC)并从细胞质进入细胞核; c,d: 由整合酶催化病毒cDNA插入宿主染色体中; e: 最后由细胞内DNA修复酶将缺口补齐。

a: recognition of 3' terminal cDNA by integrase; b: the GT dinucleotides are cleaved. Integrase multimers remain bind to the ends of the viral cDNA as the pre-integration complexes (PIC) and translocate to the nucleus; c,d: catalyzed by integrase, viral cDNA inserts into both ends of the host-cell chromosome; e: gap filling is carried out by cellular repair enzymes.

图2 HIV-1 整合酶催化的整合过程(根据参考文献[31]修改)

Fig.2 The integration catalyzed by integrase (modified from reference [31])

守的CA末端(图2b), 以使之能够顺利的整合到宿主基因组中, 该过程称为3'端加工。加工得到的3'-OH末端的病毒cDNA, 是链转移反应的中间体。该过程还需要二价金属离子 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 的参与。

继3'端的加工处理后, 整合酶仍然与病毒cDNA结合在一起并形成整合前复合物(pre-integration complex, PIC)。PIC不仅包括病毒-cDNA复合物, 还包括一些病毒蛋白以及细胞蛋白。病毒蛋白如逆转录酶、核蛋白体(Nc)以及Vpr蛋白等能促进PIC进入细胞核的转运过程^[22]。一些细胞蛋白也包含在PIC中, 并能协助整合酶发挥其催化作用, 这些蛋白包括: INI1^[23](第一个被发现的与整合酶结合的细胞蛋白)、LEDGF/p75^[24]、EEDP^[25]与HSP60^[26]等。另外两个细胞蛋白, HMGA1与BAF通过与DNA的结合调节整合过程的发生, 其中HMGA1调节IN的活性^[27-28], BAF刺激分子间的整合^[29]。HIV-1与其他慢病毒的差异在于HIV-1能直接进入细胞核, 而其他慢病毒如小鼠的莫洛尼氏病毒需要在宿主细胞有丝分裂期间才能穿过细胞核膜进入细胞核, 该属性使得HIV能够在一些像巨噬细胞这样的非增殖性细胞中进行繁殖^[30]。

2.2 链转移反应

当PIC进入细胞核后, 整合酶便立即催化病毒cDNA插入到宿主细胞的基因组中。首先整合酶切割宿主基因组DNA(图2c), 露出磷酸基团的切口, 之后病毒cDNA的3'-OH末端与宿主基因组的5'-磷酸基团进行共价连接(图2d), 最后缺口由细胞内的DNA修复酶补齐(图2e), 完成链转移反应。

2.3 在HIV病毒脱壳中的作用

Briones等^[2]通过分离含有野生型整合酶与整合酶突变体的不同HIV病毒株, 并对它们的病毒核心(core)进行分析研究, 发现从含整合酶突变体的病毒分离获得的核心相比从野生型分离出来的病毒核心少且更不稳定, 而病毒核心的稳定性对于病毒的复制至关重要^[32], 表明整合酶对于病毒的脱壳是必要的。但整合酶影响病毒脱壳的具体机制仍有待研究。一种可能的机制是整合酶通过调节病毒衣壳蛋白(capsid, CA)与亲环素A(cyclophilin A, CypA)结合的亲和力, 并改变对病毒核心稳定性必要的CypA-CA相互作用来影响病毒的脱壳过程。CypA是一种独特的肽脯氨酰异构酶^[33-35], 它能够特异性的结合CA上一个暴露的环^[36-37], 然后通过促进脱壳过程来加

强病毒的感染复制能力^[38]。

2.4 在HIV病毒逆转录过程中的作用

Dobard等^[3]通过无细胞环境下进行逆转录实验, 并用不同的引物以及dNTP来监测整合酶对于逆转录过程的起始与延伸阶段的作用。与未加入整合酶的对照组相比, 在逆转录起始阶段加入了整合酶之后, 逆转录的效率提高了四倍。而当野生型的整合酶被替换成经过结构修饰的整合酶之后, 这种对逆转录过程的促进作用便消失了。在延伸过程中, 整合酶的加入使得延伸过程的效率提高了三倍。虽然整合酶促进逆转录过程的具体机制尚不明确, 但已知HIV病毒的逆转录酶和整合酶能形成异源二聚体^[39-40], 整合酶可能通过与逆转录反应相关的一些重要因子相互作用, 来促进逆转录过程的顺利进行。

另外, 进一步的研究发现, HIV-1整合酶在病毒的组装、出芽以及病毒复制周期的早期过程中也可能发挥着某种作用^[41]。总之, 由于整合酶在病毒脱壳、逆转录, 特别是整合过程中的重要性, 显示了整合酶是一个非常具有吸引力的新的抗HIV靶点。

3 HIV-1整合酶抑制剂研究进展

由于在人体细胞内没有与HIV-1整合酶结构类似的蛋白^[4], 因此对整合酶的抑制作用不会影响到宿主细胞的正常功能, 这使得以整合酶为靶点而设计的药物在抗HIV治疗的过程中具有巨大潜力。Fesen等^[42]通过大量的实验, 于1993年发现了第一个对整合酶有抑制作用的物质——DHNQ。之后, 不同的研究团队发现了多种具有抑制整合酶活性的物质。目前, 已有综述概括了一些整合酶的抑制剂^[43-44]。

近年来, 以HIV-1整合酶为靶点的抗HIV研究取得了长足进步。迄今为止, 已有两个FDA批准上市的整合酶抑制剂, 即2007年批准的雷特格韦(Raltegravir, RAL)与2012年批准的埃替拉韦(Elvitegravir, EVG)(表1)。同时一些整合酶的抑制剂已经进入了临床试验阶段(表2), 如英国GSK与日本Shionogi公司合作研发的抗HIV新药Dolutegravir(DTG)^[45-49]。

要判断一种有活性的抗病毒抑制剂在细胞内是否以整合酶为靶点, 至少要满足以下四个标准:

(1)通过药效-时间实验证明, 药物起效的时间与整合反应发生的时间相一致, 即起效时间在逆转录过程发生后并且在病毒颗粒成熟之前, 通常为感染后的4~16小时^[31,51-53]。

表1 FDA批准上市的抗HIV药物^[5]
Table 1 Anti-HIV drugs approved by the FDA^[5]

上市时间 FDA approval	商品名 Brand name	通用名 Generic name	制造商 Manufacturer
Fusion inhibitors			
2003	Fuzeon	Enfuvirtide(T-20)	Roche Pharmaceuticals & Trimeris
Nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NRTIs			
1987	Retrovir	Zidovudine(AZT)	GlaxoSmithKline
1991	Videx	Didanosine(ddI)	Bristol-Myers Squibb
1992	Hivid	Zalcitabine(ddC)	Roche Pharmaceuticals
1994	Zerit	Stavudine(d4T)	Bristol-Myers Squibb
1995	Epivir	Lamivudine(3TC)	GlaxoSmithKline
1997	Combivir	Lamivudine+Zidovudine	GlaxoSmithKline
1998	Ziagen	Abacavir	GlaxoSmithKline
2000	Trizivir	Abacavir+lamivudine+Zidovudine	GlaxoSmithKline
2000	Videx EC	Didanosine(ddI)	Bristol-Myers Squibb
2001	Viread	Tenofovir disoproxil	Gilead Sciences
2003	Emtriva	Emtricitabine(FTC)	Gilead Sciences
2004	Epzicom	Abacavir+Lamivudine	GlaxoSmithKline
2004	Truvada	Emtricitabine+Tenofovir	Gilead Sciences
Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors, NNRTIs			
1996	Viramune	Nevirapine	Boehringer Ingelheim
1997	Rescriptor	Delavirdine(DLV)	Pfizer
1998	Sustiva	Efavirenz	Bristol-Myers Squibb
Protease inhibitors, PIs			
1995	Invirase	Saquinavir	Roche Pharmaceuticals
1996	Norvir	Ritonavir	Abbott Laboratories
1996	Crixivan	Indinavir(IDV)	Merck
1997	Viracept	Nelfinavir	Pfizer
1997	Fortovase	Saquinavir Mesylate	Roche Pharmaceuticals
1999	Agenerase	Amprenavir	GlaxoSmithKline
2000	Kaletra	Lopinavir+Ritonavir	Abbott Laboratories
2003	Reyataz	Atazanavir	Bristol-Myers Squibb
2003	Lexiva	Fosamprenavir	GlaxoSmithKline
Integrase inhibitors			
2007	Isentress	Raltegravir(RAL)	Merck
2012	Stribild	Elvitegravir(EVG)	Gilead Sciences

(2)加入抑制剂后,被感染细胞内有大量的LTR环产生^[52-54],同时细胞内整合反应减少^[51-54]。LTR环是由于病毒cDNA在细胞内聚集,并在酶的作用下产生的。

(3)在耐药性细胞中发现整合酶突变体^[31,51,54-56]。

(4)在之前检测到有整合酶突变体的细胞株中,

该抑制剂对整合酶不再有抑制作用^[31,54,56]。

根据整合酶抑制剂来源和化学性质可将其主要分为以下几类:二酮酸类抑制剂、核苷类抑制剂、天然来源抑制剂、多羟基化的芳香族化合物、磺化物类以及多肽类抑制剂。

3.1 二酮酸类抑制剂

在研究抗HIV药物而随机筛选的多种化合物中,发现了众多对整合酶有抑制作用的物质,其中只有二酮酸类化合物(diketo acid, DKAs)及其衍生物符合以上提到的所有标准^[53-54,56-57]。此外,该类化合物具有对整合酶的高选择性,故经结构修饰得到的DKAs衍生物最有希望成为高效低毒的整合酶抑制剂。目前已经上市的两个整合酶抑制剂RAL与EVG均为DKAs衍生物(图3)。

DKAs选择性的抑制整合反应中的链转移过程^[31,58],这也提示DKAs是在3'端加工完成后与整合

表2 目前正在进行临床试验的整合酶抑制剂
(根据参考文献[50]修改)

Table 2 Summary of clinical trials of IN inhibitors
(modified from reference [50])

药物名称/代码 Drug	作用位点 Site	临床试验阶段 Status
Delutegravir (S/GSK 1349572)	Catalytic site	Phase III trials
S/GSK 1265744	Catalytic site	Phase I/II trials
LEDGInS	Non-catalytic site	Pre-clinical trials
BI 224436	Non-catalytic site	Phase I trials

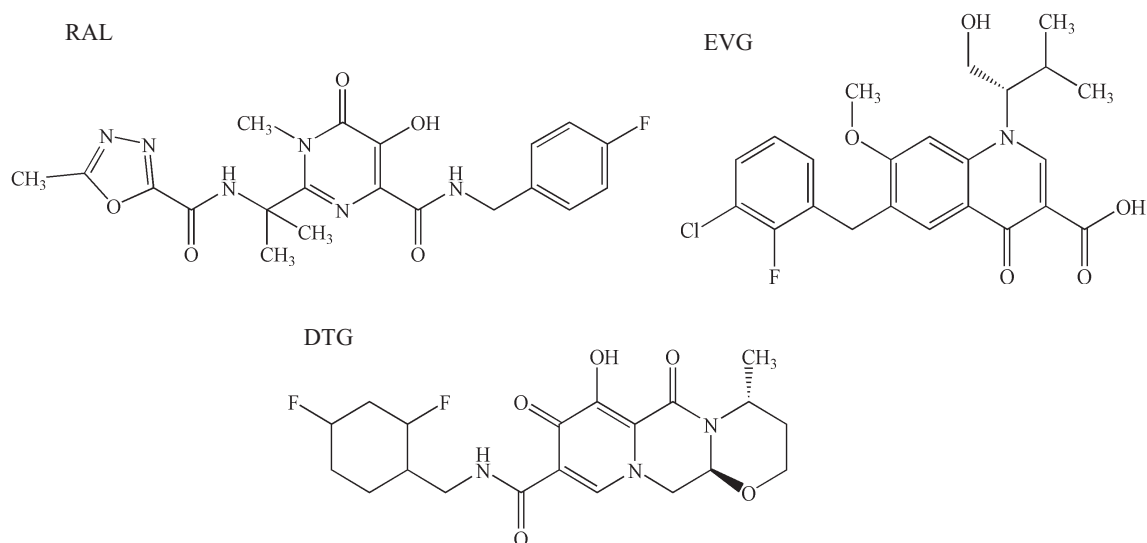


图3 RAL、EVG与DTG的化学结构
Fig.3 Structure of RAL, EVG and DTG

酶进行结合并产生作用的。抑制反应一般认为依赖于二价金属离子,这是由于金属离子通过与二酮基的螯合辅助DKAs与整合酶结合,从而干扰了整合酶与病毒cDNA底物的结合^[59-60],这个假说也通过DKAs在 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 缺失时其对整合酶未表现出抑制作用而得到确认^[61]。而且,目前普遍认为二酮基与两个二价金属离子进行了螯合,因为这是多种能与DNA结合的酶的显著特征。

另一个DKAs衍生物DTG在为期48周的III期临床试验中表现出的疗效以及不良反应均与RAL相似,但RAL一天需给药两次,而DTG一天只需给药一次,且剂量较小,更有利于联合用药^[45-49]。

3.2 核苷类抑制剂

最初对于整合酶抑制剂的设计理念是通过模拟整合酶的底物而得到能对整合酶的作用过程进行干扰的化合物,即核苷类整合酶抑制剂。这其中包括在3'端加工过程中被酶切水解得到的由两个核苷酸组成的小分子5'-pGT-3',以及在它上游的5'-pCA-3'^[62]。进一步的实验也将另外三个小分子,5'-pCT-3'、5'-pAC-3'与5'-pAT-3'确认为潜在的整合酶抑制剂^[62]。然而这些小分子在进入细胞后,很快就被细胞内的核酸酶水解。

之后,一些团队开始着手研究非天然构象的双核苷酸对整合酶的抑制作用。虽然起初的一些研究没有重大突破^[63],但进一步的研究发现了一些潜在的整合酶抑制剂^[64-65]。然而它们并不仅仅作用于整合酶,

它们对病毒蛋白gp120也具有抑制作用。尽管如此,其中的一个寡核苷酸Zintevir已经完成了I/II期临床试验,遗憾的是后续临床试验已经终止(原因未知)^[66]。

3.3 天然来源的抑制剂

过去数年中,有大量从自然界的一些动植物以及细菌、真菌中分离提取得到的化合物被确认具有抑制整合酶的作用,该类抑制剂主要包括金精三羧酸^[67]、从异孢镰刀菌分离得到的伊快霉素^[68]以及一些多酚家族的地衣酸(如斑点酸)^[69]等。同时,还包括黄酮类的抗氧化剂和一些四环素类(如阿霉素)^[42]。另外一些研究发现,从芳基真菌类分离得到的化合物也有可能是潜在的整合酶抑制剂^[70-75]。

显然,有许多经过筛选得到的天然来源的化合物具有抗HIV-1整合酶的效果,然而要阐明抑制整合酶活性所需的基本结构和化学特性是一个非常艰巨的任务,故一些研究团队采用分子模拟的方法来确定与整合酶相互作用所需要的重要的三维结构和必要的官能团^[76-81]。他们发现,相当多数量的具有整合酶抑制作用的天然物质都含有多羟基化的芳香基团。因此,已经有大量的研究都集中在鉴别多酚类对整合酶的作用,并对其进行结构修饰以找寻理想的整合酶抑制剂。

3.4 多羟基化的芳香族化合物

多羟基化的芳香族化合物(polyhydroxylated aromatics, PHAs)包含了数量众多且结构多样的HIV-1整合酶抑制剂,且大部分来源于天然产物,如咖啡酸苯

乙酯、香豆素等。PHAs的主要特征是含有两个通过连接基团连接起来的芳基基团,并且其中一个或两个为邻苯二酚基团。但是要得到具有高活性的先导化合物,仍需对其结构进行广泛的修饰。

尽管在体外实验中发现许多PHAs对整合酶具有显著的抑制作用^[82-84],但细胞实验却发现一些PHAs的抗病毒活性并非通过对整合酶的抑制,例如菊苣酸的抗病毒靶点是病毒的糖蛋白gp120^[85]。同时,相当数量的PHAs均有细胞毒性,这可能是由于它们选择性低,或者是在细胞内被氧化后形成半醌或邻醌类物质,并与细胞蛋白或者宿主染色体DNA结合从而干扰了宿主基因的正常复制或表达^[86-87]。

虽然目前已经鉴别出了大量具有抗整合酶活性的PHAs,但这些化合物或由于细胞对其摄取较差,或由于其低特异性而均未达到进行临床试验的标准。然而,对于有潜在抗HIV效果的PHAs的研究提示,AIDS患者日常饮食中若加入像生菜这一类的富含天然PHAs的食物,可能会对抗HIV治疗有所帮助^[88]。

3.5 磺化物类抑制剂

一些含硫化合物,如磺酸盐、砒已被确定为HIV-1整合酶抑制剂,这其中最重要的一类是磺胺类。磺胺类药物是众所周知的抗菌药,具有良好的安全性,被广泛用于治疗卡氏肺囊虫肺炎,而卡氏肺囊虫肺炎也是导致AIDS患者死亡的原因之一^[89]。因此,大量的研究都集中在鉴定以磺胺结构为基础的整合酶抑制剂,并且已经发现了一些结构各异的衍生物。

在这些衍生物中,巯基苯磺酰胺类的衍生物(Mercaptobenzenesulfonamides, MBSAs)具有较高抗整合酶活性,但它们在代谢过程中较不稳定。为了提高稳定性,一些研究小组合成了一些环状衍生物加以分析,然而多数该类化合物不具备抗整合酶的活性。

除磺胺类外,砒类化合物经过结构改造得到的一些衍生物中,也已有一些被确定为整合酶抑制剂,如部分二磺酸盐类^[52]。

3.6 多肽类抑制剂

1995年,Puras等^[90]通过对多肽库进行筛选得到了第一个多肽类整合酶抑制剂HCKFWW,该多肽对3'端加工与链转移反应均有抑制作用。之后,来自不同国家的多个研究团队通过对噬菌体肽库^[91]以及一些天然产物中提取到的肽类^[92-94]进行筛选,发现了数量可观的整合酶抑制剂。进一步的研究也获

得了一些更具潜力的整合酶抑制剂,如RIN-25^[95]。

另外,由于整合酶在其催化整合反应的过程中,会与LEDGF/p75^[24],病毒逆转录酶^[96]和HIV-1 Vpn蛋白^[97]等多种蛋白产生相互作用,因此与这些蛋白活性基团结构类似的多肽类物质很可能具有抑制整合酶的活性。通过这种方法,一些研究小组亦发现了大量潜在的能够抑制整合酶的肽类化合物^[98-103]。

尽管目前尚无进入临床实验阶段的多肽类整合酶抑制剂,但通过对它们的序列及所包含结构的细致分析,我们得到了许多有价值的信息,这对于研究多肽类化合物的整合酶抑制功能是一个非常好的开端,将来这些小分子物质很有可能成为抗HIV药物中的一员。

4 讨论与总结

自1993年第一个对HIV-1整合酶有抑制作用的物质被发现以来,多国的研究团队相继发现了多种潜在的整合酶抑制剂。迄今为止,已经有两个药物经FDA批准上市,同时DTG这个药物的III期临床试验已经顺利完成,并且最有可能成为下一个上市的整合酶抑制剂。

多年以来,对于HIV-1整合酶抑制剂的研究在各国研究团队的努力下进展迅速,然而病毒耐药性的出现^[104-110]会大大影响到整合酶抑制剂的临床疗效,限制其在临床的应用。通过对这些耐药突变体的研究,我们能够得到它们抗药性的一些潜在机制。例如,G118R与E138K的位置接近DDE基序,118位与138位氨基酸的突变可能会改变这一基序的结构,从而干扰药物对整合酶的抑制作用^[106]。目前,本实验室正在致力于构建一个整合酶的随机突变库,我们希望通过对这个库的筛查,能帮助我们对于一种给定的药物耐受性状况作一个整体的评估,并获得一些临床数据,推进个体化医疗的开展;另外,我们也可以将这些信息用于研究产生耐药性的分子机制。同时,这些信息的获得对于目前整合酶抑制剂的结构修饰以及未来合理有效的新整合酶抑制剂的开发有着重要意义。

随着对整合酶结构研究的不断深入,对其功能以及催化整合反应机制的认识也不断加强。目前已有不同的团队通过研究临床出现的具有药物耐受性的病毒突变体,获得了大量宝贵的信息,这对于在将来进行合理的药物设计、发现高效低毒的整合酶抑制剂是大有帮助的。

参考文献 (References)

- 1 Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, *et al.* Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 1984; 224(4648): 500-3.
- 2 Briones MS, Dobard CW, Chow SA. Role of human immunodeficiency virus type 1 integrase in uncoating of the viral core. *J Virol* 2010; 84(10): 5181-90.
- 3 Dobard CW, Briones MS, Chow SA. Molecular mechanisms by which human immunodeficiency virus type 1 integrase stimulates the early steps of reverse transcription. *J Virol* 2007; 81(18): 10037-46.
- 4 Ahn HC, Lee SY, Kim JW, Son WS, Shin CG, Lee BJ. Binding aspects of baicalin to HIV-1 integrase. *Mol Cells* 2001; 12(1): 127-30.
- 5 Pommier Y, Johnson AA, Marchand C. Integrase inhibitors to treat HIV/AIDS. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(3): 236-48.
- 6 Rice PA, Baker TA. Comparative architecture of transposase and integrase complexes. *Nat Struct Biol* 2001; 8(5): 302-7.
- 7 Bujacz G, Alexandratos J, Wlodawer A, Merkel G, Andrade M, Katz RA, *et al.* Binding of different divalent cations to the active site of avian sarcoma virus integrase and their effects on enzymatic activity. *J Biol Chem* 1997; 272(29): 18161-8.
- 8 Grobler JA, Stillmock K, Hu B, Witmer M, Felock P, Espeseth AS, *et al.* Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(10): 6661-6.
- 9 Marchand C, Johnson AA, Karki RG, Pais GC, Zhang X, Cowansage K, *et al.* Metal-dependent inhibition of HIV-1 integrase by beta-diketo acids and resistance of the soluble double-mutant (F185K/C280S). *Mol Pharmacol* 2003; 64(3): 600-9.
- 10 Engelman A, Bushman FD, Craigie R. Identification of discrete functional domains of HIV-1 integrase and their organization within an active multimeric complex. *EMBO J* 1993; 12(8): 3269-75.
- 11 Chow SA, Brown PO. Juxtaposition of two viral DNA ends in a bimolecular disintegration reaction mediated by multimers of human immunodeficiency virus type 1 or murine leukemia virus integrase. *J Virol* 1994; 68(12): 7869-78.
- 12 Chow SA, Vincent KA, Ellison V, Brown PO. Reversal of integration and DNA splicing mediated by integrase of human immunodeficiency virus. *Science* 1992; 255(5045): 723-6.
- 13 Craigie R. HIV integrase, a brief overview from chemistry to therapeutics. *J Biol Chem* 2001; 276(26): 23213-6.
- 14 Cai M, Zheng R, Caffrey M, Craigie R, Clore GM, Gronenborn AM. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nat Struct Biol* 1997; 4(7): 567-77.
- 15 Carayon K, Leh H, Henry E, Simon F, Mouscadet J-F, Deprez E. A cooperative and specific DNA-binding mode of HIV-1 integrase depends on the nature of the metallic cofactor and involves the zinc-containing N-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(11): 3692-708.
- 16 Eijkelenboom AP, Lutzke RA, Boelens R, Plasterk RH, Kaptein R, Hard K. The DNA-binding domain of HIV-1 integrase has an SH3-like fold. *Nat Struct Biol* 1995; 2(9): 807-10.
- 17 Lodi PJ, Ernst JA, Kuszewski J, Hickman AB, Engelman A, Craigie R, *et al.* Solution structure of the DNA binding domain of HIV-1 integrase. *Biochemistry* 1995; 34(31): 9826-33.
- 18 da Silva FA, Li M, Rato S, Maia S, Malhó R, Warren K, *et al.* Recombinant rabbit single-chain antibodies bind to the catalytic and C-terminal domains of HIV-1 integrase protein and strongly inhibit HIV-1 replication. *Biotechnol Appl Biochem* 2012; 59(5): 353-66.
- 19 Nymark-McMahon MH, Beliakova-Bethell NS, Darlix J-L, Le Grice SF, Sandmeyer SB. Ty3 integrase is required for initiation of reverse transcription. *J Virol* 2002; 76(6): 2804-16.
- 20 Woerner AM, Klutch M, Levin JG, Marcus-Sekura CJ. Localization of DNA binding activity of HIV-1 integrase to the C-terminal half of the protein. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1992; 8(2): 297-304.
- 21 Ramcharan J, Colleluori DM, Merkel G, Andrade MD, Skalka AM. Mode of inhibition of HIV-1 Integrase by a C-terminal domain-specific monoclonal antibody. *Retrovirology* 2006; 3: 34.
- 22 Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature* 2001; 410(6831): 995-1001.
- 23 Becerra SP, Kumar A, Lewis MS, Widen SG, Abbotts J, Karawya EM, *et al.* Protein-protein interactions of HIV-1 reverse transcriptase: Implication of central and C-terminal regions in subunit binding. *Biochemistry* 1991; 30(50): 11707-19.
- 24 Cherepanov P, Maertens G, Proost P, Devreese B, Van Beeumen J, Engelborghs Y, *et al.* HIV-1 integrase forms stable tetramers and associates with LEDGF/p75 protein in human cells. *J Biol Chem* 2003; 278(1): 372-81.
- 25 Violot S, Hong SS, Rakotobe D, Petit C, Gay B, Moreau K, *et al.* The human polycomb group EED protein interacts with the integrase of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 2003; 77(23): 12507-22.
- 26 Parissi V, Calmels C, De Soultrait VR, Caumont A, Fournier M, Chaignepain S, *et al.* Functional interactions of human immunodeficiency virus type 1 integrase with human and yeast HSP60. *J Virol* 2001; 75(23): 11344-53.
- 27 Farnet CM, Bushman FD. HIV-1 cDNA integration: Requirement of HMG I(Y) protein for function of preintegration complexes *in vitro*. *Cell* 1997; 88(4): 483-92.
- 28 Hindmarsh P, Ridky T, Reeves R, Andrade M, Skalka AM, Leis J. HMG protein family members stimulate human immunodeficiency virus type 1 and avian sarcoma virus concerted DNA integration *in vitro*. *J Virol* 1999; 73(4): 2994-3003.
- 29 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, *et al.* Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 1983; 220(4599): 868-71.
- 30 Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, *et al.* Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(14): 6580-4.
- 31 Hazuda DJ, Felock P, Witmer M, Wolfe A, Stillmock K, Grobler JA, *et al.* Inhibitors of strand transfer that prevent integration and inhibit HIV-1 replication in cells. *Science* 2000; 287(5453): 646-50.
- 32 Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C. Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication. *J Virol* 2002; 76(11): 5667-77.
- 33 Luban J. Cyclophilin A, TRIM5, and resistance to human immu-

- nodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 2007; 81(3): 1054-61.
- 34 Sokolskaja E, Luban J. Cyclophilin, TRIM5, and innate immunity to HIV-1. *Curr Opin Microbiol* 2006; 9(4): 404-8.
- 35 Towers GJ. The control of viral infection by tripartite motif proteins and cyclophilin A. *Retrovirology* 2007; 4: 40.
- 36 Bosco DA, Eisenmesser EZ, Pochapsky S, Sundquist WI, Kern D. Catalysis of cis/trans isomerization in native HIV-1 capsid by human cyclophilin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(8): 5247-52.
- 37 Gamble TR, Vajdos FF, Yoo S, Worthylake DK, Houseweart M, Sundquist WI, *et al.* Crystal structure of human cyclophilin A bound to the amino-terminal domain of HIV-1 capsid. *Cell* 1996; 87(7): 1285-94.
- 38 Thali M, Bukovsky A, Kondo E, Rosenwirth B, Walsh CT, Sodroski J, *et al.* Functional association of cyclophilin A with HIV-1 virions. *Nature* 1994; 372(6504): 363-5.
- 39 Trentin B, Rebeyrotte N, Mamoun RZ. Human T-cell leukemia virus type 1 reverse transcriptase (RT) originates from the pro and pol open reading frames and requires the presence of RT-RNase H (RH) and RT-RH-integrase proteins for its activity. *J Virol* 1998; 72(8): 6504-10.
- 40 Katz RA, Skalka AM. The retroviral enzymes. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 133-73.
- 41 Gupta K, Diamond T, Hwang Y, Bushman F, van Duyn GD. Structural properties of HIV integrase. *Less epithelium-derived growth factor oligomers. J Biol Chem* 2010; 285(26): 20303-15.
- 42 Fesen MR, Kohn KW, Leteurtre F, Pommier Y. Inhibitors of human immunodeficiency virus integrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90(6): 2399-403.
- 43 Sharma AK, George V, Valiathan R, Pilakka-Kanthikeel S, Pallikkuth S. Inhibitors of HIV-1 entry and integration: Recent developments and impact on treatment. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov* 2013; 7(2): 151-61.
- 44 Witvrouw M, Maele B, Vercammen J, Hantson A, Engelborghs Y, Clercq E, *et al.* Novel inhibitors of HIV-1 integration. *Curr Drug Metab* 2004; 5(4): 291-304.
- 45 Raffi F, Rachlis A, Stellbrink H-Jr, Hardy WD, Torti C, Orkin C, *et al.* Once-daily dolutegravir versus raltegravir in antiretroviral-naïve adults with HIV-1 infection: 48 week results from the randomised, double-blind, non-inferiority SPRING-2 study. *Lancet* 2013; 1-9.
- 46 Hightower KE, Wang R, DeAnda F, Johns BA, Weaver K, Shen Y, *et al.* Dolutegravir (S/GSK1349572) exhibits significantly slower dissociation than raltegravir and elvitegravir from wild-type and integrase inhibitor-resistant HIV-1 integrase-DNA complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(10): 4552-9.
- 47 van Lunzen J, Maggiolo F, Arribas JR, Rakhmanova A, Yeni P, Young B, *et al.* Once daily dolutegravir (S/GSK1349572) in combination therapy in antiretroviral-naïve adults with HIV: planned interim 48 week results from SPRING-1, a dose-ranging, randomised, phase 2b trial. *Lancet Infect Dis* 2011; 12(2): 111-8.
- 48 Vavro C, Hasan S, Madsen H, Horton J, DeAnda F, Martin-Carpenter L, *et al.* Prevalent polymorphisms in wild-type HIV-1 integrase are unlikely to engender drug resistance to dolutegravir (S/GSK1349572). *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(3): 1379-84.
- 49 Waters LJ, Barber TJ. Dolutegravir for treatment of HIV: SPRING forwards? *Lancet* 2013; 381(9868): 705-6.
- 50 Karmon SL, Markowitz M. Next-generation integrase inhibitors: Where to after raltegravir? *Drugs* 2013; 73(3): 213-28.
- 51 Bonnenfant S, Thomas CM, Vita C, Subra F, Deprez E, Zouhiri F, *et al.* Styrylquinolines, integrase inhibitors acting prior to integration: a new mechanism of action for anti-integrase agents. *J Virol* 2004; 78(11): 5728-36.
- 52 Pannecouque C, Pluymers W, van Maele B, Tetz V, Cherepanov P, de Clercq E, *et al.* New class of HIV integrase inhibitors that block viral replication in cell culture. *Curr Biol* 2002; 12(14): 1169-77.
- 53 Svarovskaia ES, Barr R, Zhang X, Pais GC, Marchand C, Pommier Y, *et al.* Azido-containing diketo acid derivatives inhibit human immunodeficiency virus type 1 integrase in vivo and influence the frequency of deletions at two-long-terminal-repeat-circle junctions. *J Virol* 2004; 78(7): 3210-22.
- 54 Hazuda DJ, Anthony NJ, Gomez RP, Jolly SM, Wai JS, Zhuang L, *et al.* A naphthyridine carboxamide provides evidence for discordant resistance between mechanistically identical inhibitors of HIV-1 integrase. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(31): 11233-8.
- 55 King PJ, Robinson WE Jr. Resistance to the anti-human immunodeficiency virus type 1 compound L-chicoric acid results from a single mutation at amino acid 140 of integrase. *J Virol* 1998; 72(10): 8420-4.
- 56 Fikkert V, Van Maele B, Vercammen J, Hantson A, Van Remoortel B, Michiels M, *et al.* Development of resistance against diketo derivatives of human immunodeficiency virus type 1 by progressive accumulation of integrase mutations. *J Virol* 2003; 77(21): 11459-70.
- 57 Young SD. Inhibition of HIV-1 integrase by small molecules: the potential for a new class of AIDS chemotherapeutics. *Curr Opin Drug Discov Devel* 2001; 4(4): 402-10.
- 58 Marchand C, Zhang X, Pais GC, Cowansage K, Neamati N, Burke TR Jr, *et al.* Structural determinants for HIV-1 integrase inhibition by beta-diketo acids. *J Biol Chem* 2002; 277(15): 12596-603.
- 59 Long YQ, Jiang XH, Dayam R, Sanchez T, Shoemaker R, Sei S, *et al.* Rational design and synthesis of novel dimeric diketoacid-containing inhibitors of HIV-1 integrase: Implication for binding to two metal ions on the active site of integrase. *J Med Chem* 2004; 47(10): 2561-73.
- 60 Dayam R, Neamati N. Active site binding modes of the beta-diketoacids: A multi-active site approach in HIV-1 integrase inhibitor design. *Bioorg Med Chem* 2004; 12(24): 6371-81.
- 61 Di Santo R, Costi R, Roux A, Artico M, Lavecchia A, Marinelli L, *et al.* Novel bifunctional quinolonyl diketo acid derivatives as HIV-1 integrase inhibitors: Design, synthesis, biological activities, and mechanism of action. *J Med Chem* 2006; 49(6): 1939-45.
- 62 Mazumder A, Uchida H, Neamati N, Sunder S, Jaworska-Maslanka M, Wickstrom E, *et al.* Probing interactions between viral DNA and human immunodeficiency virus type 1 integrase using dinucleotides. *Mol Pharmacol* 1997; 51(4): 567-75.
- 63 Chi G, Seo BI, Nair V. Design and synthesis of specific inhibitors of the 3'-processing step of HIV-1 integrase. *Nucleosides Nucleic Acids* 2005; 24(5/6/7): 481-4.
- 64 Taktakishvili M, Neamati N, Pommier Y, Nair V. Discovery of a nuclease-resistant, non-natural dinucleotide that inhibits HIV-1 integrase. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11(11): 1433-5.
- 65 Brodin P, Pinskaya M, Buckle M, Parsch U, Romanova E, Engels

- J, *et al.* Disruption of HIV-1 integrase-DNA complexes by short 6-oxocytosine-containing oligonucleotides. *Biochemistry* 2002; 41(5): 1529-38.
- 66 Weber J, Piontkivska H, Quinones-Mateu ME. HIV type 1 tropism and inhibitors of viral entry: Clinical implications. *AIDS Rev* 2006; 8(2): 60-77.
- 67 Cushman M, Sherman P. Inhibition of HIV-1 integration protein by aurointricarboxylic acid monomers, monomer analogs, and polymer fractions. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 185(1): 85-90.
- 68 Singh SB, Zink DL, Goetz MA, Dombrowski AW, Polishook JD, Hazuda DJ. Equisetin and a novel opposite stereochemical homolog phomasetin, two fungal metabolites as inhibitors of HIV-1 integrase. *Tetrahedron Letters* 1998; 39(16): 2243-6.
- 69 Neamati N, Hong H, Mazumder A, Wang S, Sunder S, Nicklaus MC, *et al.* Depsides and depsidones as inhibitors of HIV-1 integrase: Discovery of novel inhibitors through 3D database searching. *J Med Chem* 1997; 40(6): 942-51.
- 70 Singh SB, Jayasuriya H, Dewey R, Polishook JD, Dombrowski AW, Zink DL, *et al.* Isolation, structure, and HIV-1-integrase inhibitory activity of structurally diverse fungal metabolites. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2003; 30(12): 721-31.
- 71 Singh SB, Zink DL, Guan Z, Collado J, Pelaez F, Felock PJ, *et al.* Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of xanthoviridicatin E and F, two novel fungal metabolites produced by *penicillium chrysogenum*. *Helvetica Chimica Acta* 2003; 86(10): 3380-5.
- 72 Jayasuriya H, Guan Z, Polishook JD, Dombrowski AW, Felock PJ, Hazuda DJ, *et al.* Isolation, structure, and HIV-1 integrase inhibitory activity of Cytosporic acid, a fungal metabolite produced by a *Cytospora* sp. *J Nat Prod* 2003; 66(4): 551-3.
- 73 Singh SB, Zink DL, Bills GF, Teran A, Silverman KC, Lingham RB, *et al.* Four novel bis-(naphtho- γ -pyrones) isolated from *Fusarium* species as inhibitors of HIV-1 integrase. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13(4): 713-7.
- 74 Tomoda H, Tabata N, Ohyama Y, Omura S. Core structure in rosellipins essential for eliciting inhibitory activity against diacylglycerol acyltransferase. *J Antibiot (Tokyo)* 2003; 56(1): 24-9.
- 75 Singh SB, Ondeyka JG, Schleif WA, Felock P, Hazuda DJ. Chemistry and structure-activity relationship of HIV-1 integrase inhibitor integracide B and related natural products. *J Nat Prod* 2003; 66(10): 1338-44.
- 76 Neamati N, Hong H, Sunder S, Milne GW, Pommier Y. Potent inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 integrase: Identification of a novel four-point pharmacophore and tetracyclines as novel inhibitors. *Mol Pharmacol* 1997; 52(6): 1041-55.
- 77 Nicklaus MC, Neamati N, Hong H, Mazumder A, Sunder S, Chen J, *et al.* HIV-1 integrase pharmacophore: discovery of inhibitors through three-dimensional database searching. *J Med Chem* 1997; 40(6): 920-9.
- 78 Deng J, Lee KW, Sanchez T, Cui M, Neamati N, Briggs JM. Dynamic receptor-based pharmacophore model development and its application in designing novel HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* 2005; 48(5): 1496-505.
- 79 Deng J, Sanchez T, Neamati N, Briggs JM. Dynamic pharmacophore model optimization: Identification of novel HIV-1 integrase inhibitors. *J Med Chem* 2006; 49(5): 1684-92.
- 80 Hong H, Neamati N, Wang S, Nicklaus MC, Mazumder A, Zhao H, *et al.* Discovery of HIV-1 integrase inhibitors by pharmacophore searching. *J Med Chem* 1997; 40(6): 930-6.
- 81 Carlson HA, Masukawa KM, Rubins K, Bushman FD, Jorgensen WL, Lins RD, *et al.* Developing a dynamic pharmacophore model for HIV-1 integrase. *J Med Chem* 2000; 43(11): 2100-14.
- 82 Burke TR, Jr., Fesen MR, Mazumder A, Wang J, Carothers AM, Grunberger D, *et al.* Hydroxylated aromatic inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* 1995; 38(21): 4171-8.
- 83 Zhang X, Neamati N, Lee YK, Orr A, Brown RD, Whitaker N, *et al.* Arylisothiocyanate-containing esters of caffeic acid designed as affinity ligands for HIV-1 integrase. *Bioorg Med Chem* 2001; 9(7): 1649-57.
- 84 Zhao H, Neamati N, Mazumder A, Sunder S, Pommier Y, Burke TR Jr. Arylamide inhibitors of HIV-1 integrase. *J Med Chem* 1997; 40(8): 1186-94.
- 85 Pluyms W, Neamati N, Pannecouque C, Fikkert V, Marchand C, Burke TR Jr, *et al.* Viral entry as the primary target for the anti-HIV activity of chicoric acid and its tetra-acetyl esters. *Mol Pharmacol* 2000; 58(3): 641-8.
- 86 Liehr JG, Roy D. Free radical generation by redox cycling of estrogens. *Free Radic Biol Med* 1990; 8(4): 415-23.
- 87 Stanwell C, Ye B, Yuspa SH, Burke TR, Jr. Cell protein cross-linking by erbstatin and related compounds. *Biochem Pharmacol* 1996; 52(3): 475-80.
- 88 Bailly F, Cotellet P. Anti-HIV activities of natural antioxidant caffeic acid derivatives: toward an antiviral supplementation diet. *Curr Med Chem* 2005; 12(15): 1811-8.
- 89 Hay JW, Osmond DH, Jacobson MA. Projecting the medical costs of AIDS and ARC in the United States. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988; 1(5): 466-85.
- 90 Puras LR, Eppens NA, Weber PA, Houghten RA, Plasterk RH. Identification of a hexapeptide inhibitor of the human immunodeficiency virus integrase protein by using a combinatorial chemical library. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(25): 11456-60.
- 91 Desjober C, de Soultrait VR, Faure A, Parisi V, Litvak S, Tarrago-Litvak L, *et al.* Identification by phage display selection of a short peptide able to inhibit only the strand transfer reaction catalyzed by human immunodeficiency virus type 1 integrase. *Biochemistry* 2004; 43(41): 13097-105.
- 92 Wang G, Watson KM, Peterkofsky A, Buckheit RW. Identification of novel human immunodeficiency virus type 1-inhibitory peptides based on the antimicrobial peptide database. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1343-6.
- 93 Eliakova LA, Vas'Kovskii BV, Khoroshilova NI, Vantseva SI, Agapkina I. Isolation and structure of novel peptide inhibitor of HIV-1 integrase from marine polychaetes. *Bioorg Khim* 2011; 37(2): 233-43.
- 94 de Zotti M, De Borggraeve W, Kaptein B, Broxterman QB, Singh SB, Felock PJ, *et al.* Triple Hyp-->Pro replacement in integrinamide A, a peptaib inhibitor of HIV-1 integrase: Effect on conformation and bioactivity. *Biopolymers* 2011; 96(1): 49-59.
- 95 Krajewski K, Marchand C, Long YQ, Pommier Y, Roller PP. Synthesis and HIV-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs of indolicidin. *Bioorg Med Chem Lett* 2004; 14(22): 5595-8.
- 96 Wilkinson TA, Januszyk K, Phillips ML, Tekeste SS, Zhang M, Miller JT, *et al.* Identifying and characterizing a functional HIV-1 reverse transcriptase-binding site on integrase. *J Biol Chem*

- 2009; 284(12): 7931-9.
- 97 Kogan M, Rappaport J. HIV-1 accessory protein Vpr: Relevance in the pathogenesis of HIV and potential for therapeutic intervention. *Retrovirology* 2011; 8: 25.
- 98 Zawahir Z, Neamati N. Inhibition of HIV-1 integrase activity by synthetic peptides derived from the HIV-1 HXB2 Pol region of the viral genome. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16(19): 5199-202.
- 99 Gleenberg IO, Herschhorn A, Hizi A. Inhibition of the activities of reverse transcriptase and integrase of human immunodeficiency virus type-1 by peptides derived from the homologous viral protein R (Vpr). *J Mol Biol* 2007; 369(5): 1230-43.
- 100 Rosenbluh J, Hayouka Z, Loya S, Levin A, Armon-Omer A, Britan E, *et al.* Interaction between HIV-1 Rev and integrase proteins: a basis for the development of anti-HIV peptides. *J Biol Chem* 2007; 282(21): 15743-53.
- 101 Hayouka Z, Levin A, Maes M, Hadas E, Shalev DE, Volsky DJ, *et al.* Mechanism of action of the HIV-1 integrase inhibitory peptide LEDGF 361-370. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394(2): 260-5.
- 102 Oz GI, Avidan O, Goldgur Y, Herschhorn A, Hizi A. Peptides derived from the reverse transcriptase of human immunodeficiency virus type 1 as novel inhibitors of the viral integrase. *J Biol Chem* 2005; 280(23): 21987-96.
- 103 Sourgen F, Maroun RG, Frere V, Bouziane M, Auclair C, Troalen F, *et al.* A synthetic peptide from the human immunodeficiency virus type-1 integrase exhibits coiled-coil properties and interferes with the *in vitro* integration activity of the enzyme. Correlated biochemical and spectroscopic results. *Eur J Biochem* 1996; 240(3): 765-73.
- 104 Brigo A, Lee KW, Fogolari F, Mustata GI, Briggs JM. Comparative molecular dynamics simulations of HIV-1 integrase and the T66I/M154I mutant: Binding modes and drug resistance to a diketo acid inhibitor. *Proteins* 2005; 59(4): 723-41.
- 105 Sichtig N, Sierra S, Kaiser R, Daumer M, Reuter S, Schuler E, *et al.* Evolution of raltegravir resistance during therapy. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64(1): 25-32.
- 106 Bar-Magen T, Sloan RD, Donahue DA, Kuhl BD, Zabeida A, Xu H, *et al.* Identification of novel mutations responsible for resistance to MK-2048, a second-generation HIV-1 integrase inhibitor. *J Virol* 2010; 84(18): 9210-6.
- 107 Loizidou EZ, Kousiappa I, Zeinalipour-Yazdi CD, van de Vijver DA, Kostrikis LG. Implications of HIV-1 M group polymorphisms on integrase inhibitor efficacy and resistance: Genetic and structural *in silico* analyses. *Biochemistry* 2008; 48(1): 4-6.
- 108 Low A, Prada N, Topper M, Vaida F, Castor D, Mohri H, *et al.* Natural polymorphisms of human immunodeficiency virus type 1 integrase and inherent susceptibilities to a panel of integrase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(10): 4275-82.
- 109 Metifiot M, Marchand C, Maddali K, Pommier Y. Resistance to integrase inhibitors. *Viruses* 2010; 2(7): 1347-66.
- 110 Quercia R, Dam E, Perez-Bercoff D, Clavel F. Selective-advantage profile of human immunodeficiency virus type 1 integrase mutants explains *in vivo* evolution of raltegravir resistance genotypes. *J Virol* 2009; 83(19): 10245-9.