

非核苷类逆转录酶抑制剂耐药型 HIV-1 药理评价体系的建立

曹颖莉¹, 李少雄^{1,2}, 陈虹², 郭颖^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 武警医学院, 天津 300162)

摘要: 建立 9 种临床常见的非核苷类逆转录酶抑制剂 (non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, NNRTIs) 耐药型 HIV-1 重组病毒药理评价模型。应用重叠 PCR 定点突变技术将耐药突变位点引入 HIV-1 核心基因 (pNL4-3.Luc.R⁺E⁻), 以水泡性口膜炎病毒的外壳糖蛋白 (vesicular stomatitis virus glycoprotein, VSV-G) 包装含耐药突变位点的 HIV-1 核心, 形成耐药型 HIV-1 重组假病毒颗粒, 简称 VSVG/HIV-mut (包括 VSVG/HIV-wt、VSVG/HIV-K103N、VSVG/HIV-Y181C、VSVG/HIV-L100I,K103N、VSVG/HIV-Y188L、VSVG/HIV-K103N,Y181C、VSVG/HIV-K103N,P225H、VSVG/HIV-K103N,Y188L、VSVG/HIV-K103N,G109A 和 VSVG/HIV-K103N,V108I)。经验证 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组病毒颗粒均具有高感染能力, 对核苷类阳性药物不耐药, 而对非核苷类阳性药物呈现不同程度的耐药性 (17~10 000 倍), 且耐药倍数与报道的数据基本一致。所建立的耐药型模型是针对 NNRTIs 耐药的 HIV-1 复制环节的细胞水平药效学评价体系, 野生型和 9 种耐药型 HIV-1 模型的联合应用, 可为新型非核苷类逆转录酶抑制剂的研发提供更全面药效学评价的安全平台。

关键词: HIV-1; NNRTIs; 耐药性; 药物筛选

中图分类号: R965.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 04-0355-07

Establishment of pharmacological evaluation system for non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors resistant HIV-1

CAO Ying-li¹, LI Shao-xiong^{1,2}, CHEN Hong², GUO Ying^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;

2. Medical College of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China)

Abstract: Consistent non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (NNRTIs) resistant HIV-1 strains occurred due to the clinical use for more than ten years of efavirenz (EFV), nevirapine (NVP), and delavirdine (DLV). In this study, we established nine cell-based pharmacological models according to most NNRTIs-resistant clinical tested strains. Resistant mutations were introduced into vector, pNL4-3.Luc.R⁺E⁻, by overlapping PCR. Then, pseudovirions were produced by co-transfection of VSV-G plasmid and pNL4-3.Luc.R⁺E⁻-mut. All nine recombinant VSVG/HIV-mut pseudovirions (VSVG/HIV-wt, VSVG/HIV-K103N, VSVG/HIV-Y181C, VSVG/HIV-L100I,K103N, VSVG/HIV-Y188L, VSVG/HIV-K103N,Y181C, VSVG/HIV-K103N,P225H, VSVG/HIV-K103N,Y188L, VSVG/HIV-K103N,G109A and VSVG/HIV-K103N,V108I) had high efficient infectivity. Furthermore, they all showed resistant characteristics to EFV and NVP with IC₅₀ changes consisting with clinical reports, not to nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (AZT and d4T). This series safe cell-based model, which could be carried out in BSL-2 laboratory, can be used for evaluating NNRTIs candidates.

Key words: HIV-1; NNRTIs; resistance; drug screening

艾滋病(AIDS)是由人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV-1) 引起的致死性传染病。

截至 2007 年 12 月, 全球约有 3 320 万人感染 HIV-1 病毒^[1]。由于目前尚无有效的 HIV-1 疫苗, 感染后的药物治疗仍然是针对该疾病的主要治疗方法。临床上用于艾滋病治疗的抗 HIV-1 药物共有 5 类: 融合抑制剂、核苷类逆转录酶抑制剂、非核苷类逆转录酶抑制

收稿日期: 2008-11-24.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2006YJ01)。

*通讯作者 Tel / Fax: 86-10-63165176, E-mail: yingguo6@imm.ac.cn

剂、整合酶抑制剂和蛋白水解酶抑制剂。但HIV-1是RNA病毒，具有高变异性，因此在一定时间的药物治疗后，会生成稳定的耐药病毒。据统计，在接受药物治疗的艾滋病患者中大约 50%对至少一种药物产生抗性^[2,3]。因此，研发新结构类型的对耐药HIV-1有抑制作用的化合物是药物发展的方向，而针对现有靶点，建立耐药型HIV-1药物筛选方法则是新型药物研发的关键环节。

HIV-1 逆转录酶 (reverse transcriptase, RT) 是 HIV-1 药物研发的一个重要靶点。已上市的逆转录酶抑制剂分为两大类：核苷类逆转录酶抑制剂 (nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, NRTIs) 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors, NNRTIs)^[4]。其中 NNRTIs 有奈韦拉平 (nevirapine, NVP)、依法韦伦 (efavirenz, EFV)、地拉韦定 (delavirdine, DLV) 和依曲韦林 (etravirine, TMC-125)。该类药物作用靶点明确、具有结构多样、高效低毒的特点，这些特点使其成为抗 HIV-1 治疗的首选药物之一。但由于奈韦拉平、依法韦伦和地拉韦定均已上市 10 年，并且其与逆转录酶的作用位点相近，临床上均已产生了稳定的耐药病毒并且具有多药耐药的特点，使这 3 个药物的临床应用受到一定的限制^[5]。针对耐药型病毒的非核苷类逆转录酶抑制剂一直是抗艾滋病药物研究的热点，2008 年 FDA 批准该类新药依曲韦林上市，但也有报道显示在依曲韦林治疗组中已经发现耐药的病毒株^[6,7]。

由于在抗 HIV-1 治疗中非核苷类逆转录酶抑制剂应用非常广泛，使 HIV-1 耐药突变频繁出现而导致原有药物失效。针对耐药型 HIV-1 模型的建立和药效学的评价，国外已有相关报道^[8,9]：研究方法首先是从服用 NNRTIs 后产生耐药性的患者体内分离 HIV-1 活病毒，通过 RT-PCR 扩增逆转录酶基因序列后利用分子克隆技术引入假病毒颗粒的 HIV-1 核心基因中，建立含耐药突变位点的假病毒模型。由于该研究方法需要获取耐药性患者的血液并在 P3 实验室操作，因此使 HIV-1 的研究受到了限制。相关研究在国内未见报道。

在本研究中，参考临床统计的最常出现的 9 种 NNRTIs 耐药病毒株 (图 1, 表 1)，作者通过分子生物学方法在 HIV-1 核心基因中引入相应的耐药突变位点，建立了 9 种细胞水平的耐药型 HIV-1 重组假病毒药理筛选模型，并用非核苷类抑制剂 (奈韦拉平和依法韦伦) 和核苷类抑制剂 (齐多夫定和司他夫定) 对该模型进行了验证。本研究的整个实验操作均是在普通实验室进行的。该模型具有安全、高效、稳定等特点，可用于筛选对耐药 HIV-1 有抑制作用的化合物，为新型非核苷类逆转录酶抑制剂的研发提供安全便捷的药效学评价平台。

材料与方法

细胞、质粒和阳性对照药物 293T 细胞为本实验室保存；胎牛血清和培养基购自 Gibco 公司。HIV-1 核心基因 (pNL4-3.Luc.R⁺E⁻)^[12,13] 和水泡性口膜炎病

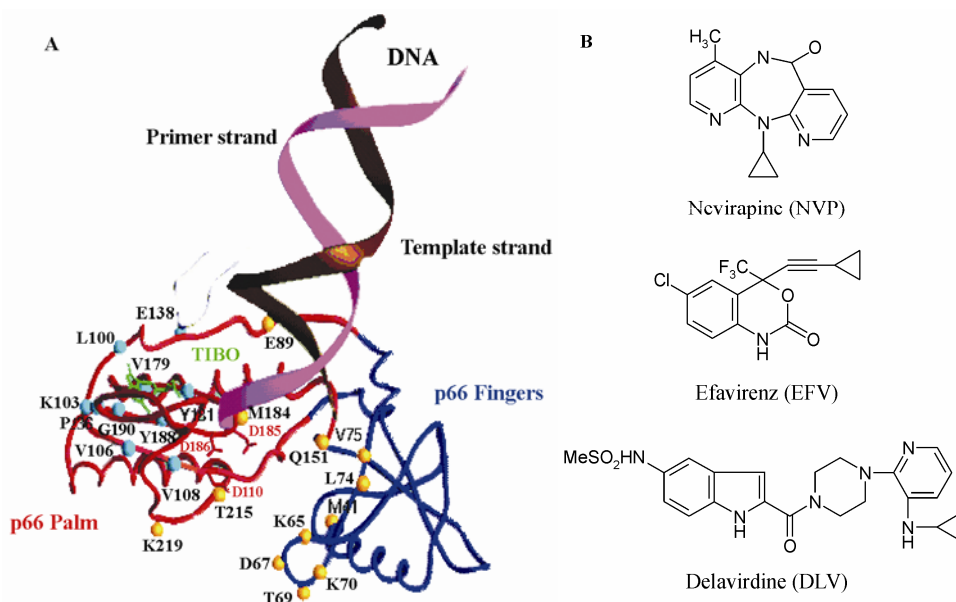


Figure 1 A: A view of the DNA polymerization active site of HIV-1 RT with commonly observed drug-resistance mutation sites for nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (in gold) and for non-nucleoside reverse-transcriptase inhibitors (in cyan), adapted from Kalyan Das^[10]. B: Structures of three NNRTIs currently used in clinical therapy

Table 1 Drug susceptibilities of virus containing mutations associated with drug resistance

NNRTI-mutation pattern	Incidence in clinic ^[14] /%	Fold change in susceptibility		
		Nevirapine (NVP) ^[11]	Efavirenz (EFV) ^[8]	Delavirdine (DLV) ^[11]
Wild type	—	1	1	1
K103N	9.9	41	16	30
K103N,Y181C	2.8	400	25	250
L100I,K103N	2.5	58	1 520	180
Y181C	2.4	107	2	35
Y188L	1.2	400	144	5.4
K103N,V108I	1.1	119	51	65
K103N,P225H	0.9	141	205	20
K103N,G190A	0.7	500	148	37
K103N,Y188L	0.4	680	>10 ⁴	190

毒 (vesicular stomatitis virus, VSV) 外壳蛋白表达质粒 (VSV-G 质粒) 由伊利诺伊大学 Dr. Lijun Rong 惠赠。齐多夫定 (zidovudine, AZT) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 司他夫定 (stavudine, d4T) 和依法韦伦 (efavirenz, EFV) 购自厦门迈克制药有限公司; 奈韦拉平 (nevirapine, NVP) 购自上海迪赛诺公司。

引物设计 根据临床 NNRTIs 常见突变位点 (图 1, 表 1), 在 HIV-1 核心基因 (pNL4-3.Luc.R⁺E⁻) 的逆转录基因位置 (图 2), 设计分别包含不同耐药突变位点的引物, 引物序列见表 2, 序列中划线部分为引入的突变核苷酸。所有引物均由 Invitrogen 公司合成。

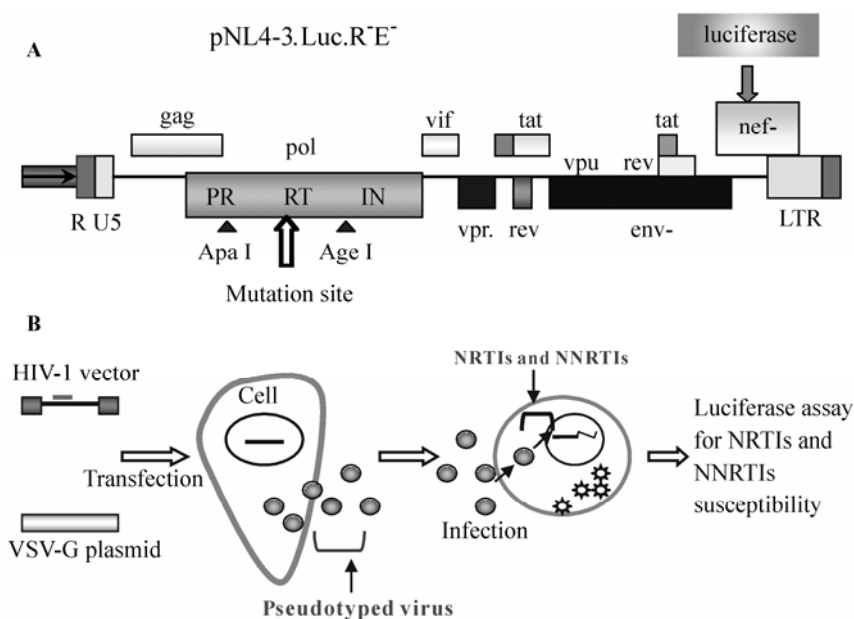


Figure 2 The schematic picture of HIV-1 genome and overview of drug susceptibility assay. A: Amplified segments containing mutation sites by overlapping PCR were inserted into HIV-1 genome by using ApaI and AgeI restriction sites. The luciferase reporter gene, inserted into nef gene region, can monitor virus replication. Two frame shifts in env and vpr genes abrogate the expression of Env and Vpr proteins. B: Pseudovirions were produced from cells by co-transfecting HIV-1 core gene and a plasmid expressing VSV-G. Forty eight hours post-transfection, pseudovirions were harvested and used to infect target cells. The antiviral activities of compounds can be quantitated by detecting luciferase activities of infected cells. (Modified from Petropoulos et al^[9])

Table 2 Sequence of primers containing mutation site on NNRTIs

Site	No.	Primer
K103N	1#	Sence 5'-CCT GCA GGG TTA AAA CAG AAC <u>CA</u> AAA TCA GTA ACA GTA CTG GAT-3'
	2#	Antisence 5'-ATC CAG TAC TGT TAC TGA TTT <u>G</u> TT CTG TTT TAA CCC TGC AGG-3'
Y181C	3#	Sence 5'-AAT CCA GAC ATA GTC ATC <u>TG</u> T CAA TAC ATG GAT GAT TTG-3'
	4#	Antisence 5'-CAA ATC ATC CAT GTA TTG <u>ACA</u> GAT GAC TAT GTCTGG ATT-3'
K103N,L100I	5#	Sence 5'-GGA ATA CCA CAT CCT GCA GGG <u>ATA</u> AAA CAG AAC AAA TCA GTA-3'
	6#	Antisence 5'-TAC TGA TTT GTT CTG TTT <u>TAT</u> CCC TGC AGG ATG TGG TAT TCC-3'
P225H	7#	Sence 5'-CAA AAA ACA TCA GAA AGA <u>ACA</u> TCC ATT CCT TTG G-3'
	8#	Antisence 5'-CCA AAG GAA TGG <u>ATG</u> TTC TTT CTG ATG TTT TTT G-3'
Y188L	9#	Sence 5'-CAA TAC ATG GAT GAT TTG <u>CTT</u> GTA GGA TCT GAC TTA GAA ATA-3'
	10#	Antisence 5'-TAT TTC TAA GTC AGA TCC TAC <u>AAG</u> CAA ATC ATC CAT GTA TTG-3'
K103N,V108I	11#	Sence 5'-CAG <u>AAC</u> AAA TCA GTA ACA <u>ATA</u> CTG GAT GTG GG -3'
	12#	Antisence 5'-CCC ACA TCC AGT <u>ATT</u> GTT ACT GAT <u>TTG</u> TTC TG-3'
G190A	13#	Sence 5'-GGA TGA TTT GTA TGT <u>AGC</u> ATC TGA CTT AGA AAT AG-3'
	14#	Antisence 5'-CTA TTT CTA AGT CAG <u>ATG</u> CTA CAT ACA AAT CAT CC -3'

在 HIV-1 含耐药突变位点的逆转录酶基因两侧, 分别包含 *Apal* 和 *AgeI* 单酶切位点的序列位置, 设计两条引物: 正向 5'-ATTGACGGCCCCCTAGGAAAAAGGG-3' (含 *Apal* 酶切位点); 反向 5'-CATGTACCGGTCTTTTAGAATCTCCCTG-3' (含 *AgeI* 酶切位点), 所扩增的 DNA 片段长度约为 1.5 kb。

含耐药突变位点的 HIV-1 核心基因的构建 应用重叠 PCR 方法, 以野生型 HIV-1 核心基因 (pNL4-3.Luc.R⁺E⁻) 为模板 (含 K103N、Y181L、L100I、K103N、Y188L、K103N、V108I 突变位点的构建) 和以已引入 K103N 突变位点的 HIV-1 核心基因为模板 (含 K103N、Y181C、K103N、P225H、K103N、G190A、K103N、Y188L 突变位点的构建), 分别用含突变位点的正向引物和含 *AgeI* 酶切位点的反向引物、含突变位点的反向引物和含 *Apal* 酶切位点的正向引物进行 PCR 扩增, 得到的产物命名为产物 1 和产物 2。再以产物 1 和产物 2 为模板, 用分别含 *Apal* 和 *AgeI* 酶切位点的两条引物进行第 3 次 PCR 扩增, 得到的产物命名为产物 3。产物 3 中已含有耐药突变位点以及 *Apal* 和 *AgeI* 酶切位点, 应用分子克隆技术, 利用 *Apal* 和 *AgeI* 内切酶和 T4 DNA 连接酶 (NEB 公司), 将含有耐药突变位点的序列引入 pNL4-3.Luc.R⁺E⁻ 中。测序鉴定结果显示, 含不同耐药突变位点的 HIV-1 核心基因构建成功。依据突变位点分别命名为 HIV-K103N、HIV-Y181L、HIV-L100I,K103N、HIV-Y188L、HIV-K103N,Y188L、HIV-K103N,V108I、HIV-K103N,Y181C、HIV-K103N,P225H 和 HIV-K103N,G190A。

野生型和 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组假病毒的制备 转染前一天, 按细胞数 2.2×10^6 接种 293T 细胞到 100 mm 培养皿中, 用改良的磷酸钙沉淀法共转染 3 μ g VSV-G 质粒和 8 μ g 野生型或分别含不同耐药突变位点的 HIV-1 核心基因, 转染后 16 h, 用 PBS 冲洗细胞并换新鲜的培养基继续培养 32 h, 收集上清液并经 0.45 μ m 的滤膜过滤, 分别生成野生型和 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组假病毒颗粒 VSVG/HIV-wt、VSVG/HIV-K103N、VSVG/HIV-Y181C、VSVG/HIV-L100I,K103N、VSVG/HIV-Y188L、VSVG/HIV-K103N,Y181C、VSVG/HIV-K103N,P225H、VSVG/HIV-K103N,Y188L、VSVG/HIV-K103N,G190A、VSVG/HIV-K103N,V108I。

HIV-1 重组假病毒的 p24 抗原测定 分别倍比稀释 10 种假病毒原液 (野生型和 9 种耐药型 HIV-1) 后各取 450 μ L, 用裂解液 50 μ L 进行裂解, 按照 p24 抗原 ELISA 试剂盒说明书 (ZeptoMetrix, Cat: 0801111) 测定并计算野生型和 9 种耐药型重组假病毒原液的

p24 抗原浓度。

阳性药物对 NNRTIs 耐药型 HIV-1 抑制性检测 感染前一天, 将 293T 细胞按细胞数 6×10^4 /孔接种到 24 孔板上, 用 DMSO 溶解 AZT、d4T、NVP 和 EFV, 于感染前 15 min 加入细胞培养液中, DMSO 溶剂作空白对照, 再加入病毒液 (根据 p24 浓度将病毒原液稀释至 $0.1 \sim 0.5$ ng·mL⁻¹) 0.5 mL。感染后 48 h, 去除上清液, 每孔中加入细胞裂解液 (Promega) 50 μ L 裂解细胞, 再将细胞裂解产物 20 μ L 加入至荧光素酶底物 30 μ L 中 (Promega), 用 FB15 荧光检测器 (Sirius) 测定细胞荧光素酶的相对活性, 以 DMSO 作对照, 计算不同阳性药物对野生型和耐药型 HIV-1 复制的半数抑制浓度。

结果

1 耐药型 HIV-1 复制抑制剂药理筛选模型的构建和 p24 检测

1.1 模型构建 NNRTIs 是艾滋病治疗的首选药物, 共有 4 个: 奈韦拉平、依法韦伦、地拉韦定和依曲韦林。依曲韦林是 2008 年 FDA 批准上市的, 奈韦拉平、依法韦伦和地拉韦定 (图 1) 均已上市 10 年, 目前都产生了稳定的临床耐药病毒。图 1 和表 1 分别为逆转录酶常见的核苷类和非核苷类抑制剂耐药突变位点^[10]以及统计的临床常见的 NNRTIs 耐药病毒的突变位点和耐药倍数^[11]。由于 3 个 NNRTIs 与逆转录酶的作用位点相近, 从表 1 可以看到产生的耐药病毒还具有多药耐药的特点。

本研究针对临床出现的 9 种 NNRTIs 常见耐药突变位点, 以野生型 HIV-1 核心基因 (pNL4-3.Luc.R⁺E⁻) 为模板, 在逆转录酶基因位置引入了相应的耐药突变位点 (图 2A), 然后返回到假病毒系统中^[14], 用表达 VSV 糖蛋白的质粒和含耐药突变位点的 HIV-1 核心基因共同转染病毒生成细胞, 生成含有耐药突变位点的 HIV-1 重组假病毒颗粒, 感染宿主细胞后通过 HIV-1 核心基因上携带的荧光素酶基因在宿主细胞中的表达水平检测 HIV-1 的复制水平, 从而构建了 9 种与临床 NNRTIs 耐药突变病毒株相一致的 NNRTIs 耐药型 VSVG/HIV 重组假病毒复制模型 (图 2B)。

1.2 野生型和耐药型重组假病毒颗粒的 p24 浓度检测 通过检测 HIV-1 的 p24 抗原在假病毒颗粒中的浓度可以判断耐药型重组假病毒颗粒是否成功包装。本研究应用 p24 抗原 ELISA 试剂盒, 分别测定了野生型和 9 种耐药型假病毒颗粒 p24 抗原浓度。结果显示, 相同条件下制备的野生型和不同耐药型假病毒颗粒

的 p24 浓度在 50~200 ng·mL⁻¹ (数据未列出), 说明耐药型重组假病毒颗粒成功构建, 且均具有高的感染能力。

2 阳性药物对 NNRTIs 非核苷类耐药型假病毒颗粒感染抑制性的检测

2.1 耐药型 HIV-1 对 NNRTIs 表现出明显的耐药 奈韦拉平 (NVP) 和依法韦伦 (EFV) (图 1) 是临床常用的非核苷类逆转录酶抑制剂。本研究分别以 9 种耐药型 HIV-1 (VSVG/HIV-mut) 作为实验组, 以野生型 VSVG/HIV-wt 作对照, 感染 293ET 细胞。感染前 15 min, 加入 NVP 或 EFV, 以等体积的溶剂 DMSO 为对照。感染 48 h 后通过检测被感染细胞中 HIV-1 核心基因上携带的报告基因荧光素酶的活性确定 HIV-1 的复制水平, 计算阳性药物 NVP 和 EFV 对 HIV-1 复制的半数抑制浓度 (IC₅₀), 见表 3。结果显示, 阳性药物 NVP 和 EFV 对 NNRTIs 耐药型 HIV-1 的抑制作用明显低于其对野生型 HIV-1 的抑制作用。通过计算 9 种耐药型 HIV-1 对阳性药物 NVP 和 EFV 的耐药倍数 (耐药倍数 = NVP 或 EFV 对耐药型 HIV-1 的 IC₅₀ 与 NVP 或 EFV 对野生型 HIV-1 的 IC₅₀ 的比值) 显示: 实验中所得的耐药型 HIV-1 对非核苷类阳性药物 NVP 和 EFV 的耐药倍数与报道^[8, 9, 11]的数据基本一致 (表 3), 说明本研究构建的 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型可以有效地反映临床出现的不同耐药型 HIV-1 的复制特性, 可以为筛选对耐药型 HIV-1 有抑制作用的化合物提供有效的药效学评价平台。

2.2 耐药型 HIV-1 对 NRTIs 不产生耐药 齐多夫定 (AZT) 和司他夫定 (d4T) 是临床治疗 HIV-1 的核苷类逆转录酶抑制剂, 与逆转录酶结合的位点不同于非核苷类抑制剂 (图 1)。本研究考察了 AZT 和 d4T 对

所构建的 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组病毒复制的影响。同样以野生型 VSVG/HIV-wt 和溶剂 DMSO 作对照, 实验设计、IC₅₀ 和耐药倍数的计算方法同 2.1, 实验结果以及计算得到的耐药倍数均显示, 核苷类抑制剂 AZT 和 d4T 对 NNRTIs 耐药型 HIV-1 的抑制作用与其对野生型 HIV-1 的抑制作用基本一致 (表 4), 说明本研究所构建的 NNRTIs 耐药型重组假病毒对 NRTIs 不产生耐药, 因此进一步证实 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型成功构建。

Table 4 Using zidovudine (AZT) and stavudine (d4T) to confirm NNRTIs-resistance VSVG/HIV systems which introduced point mutations into pNL4-3.Luc.R'E⁻ vector

NNRTI mutation	IC ₅₀ /μmol·L ^{-1a}		Mean change (fold) in IC ₅₀ ^b	
	AZT	d4T	AZT	d4T
Wild type	0.010 3 ± 0.002 4	0.71 ± 0.13	1.00	1.00
K103N	0.006 8 ± 0.000 8	0.54 ± 0.20	0.66	0.77
K103N,Y181C	0.006 2 ± 0.001 6	0.55 ± 0.01	0.60	0.78
L100I,K103N	0.003 9 ± 0.000 2	0.50 ± 0.04	0.37	0.70
Y181C	0.006 0 ± 0.003 7	0.61 ± 0.10	0.58	0.87
Y188L	0.010 2 ± 0.001 2	0.48 ± 0.19	0.99	0.67
K103N,V108I	0.007 0 ± 0.000 8	0.60 ± 0.00	0.67	0.85
K103N,P225H	0.008 1 ± 0.002 7	0.62 ± 0.13	0.79	0.87
K103N,G190A	0.010 9 ± 0.004 5	0.56 ± 0.05	1.05	0.79
K103N,Y188L	0.008 3 ± 0.000 8	0.63 ± 0.06	0.81	0.89

^aFrom two tests. ^bChanges (n-fold) in IC₅₀ relative to that against wild-type virus

讨论

非核苷类逆转录酶抑制剂奈韦拉平、依法韦伦和地拉韦定是以 HIV-1 逆转录酶为靶标的一类小分子化合物, 治疗指数高, 但在一段时间的临床用

Table 3 Using efavirenz (EFV) and nevirapine (NVP) to confirm NNRTIs-resistance VSVG/HIV systems which introduced point mutations into pNL4-3.Luc.R'E⁻ vector

NNRTIs mutation	Nevirapine (NVP)			Efavirenz (EFV)		
	IC ₅₀ /μmol·L ^{-1a}	Mean change (fold) in IC ₅₀		IC ₅₀ /μmol·L ^{-1a}	Mean change (fold) in IC ₅₀	
		Lab test ^b	Ref. ^[11]		Lab test ^b	Ref. ^[8]
Wild type	0.023 5 ± 0.007 8	1	1	0.000 93 ± 0.000 25	1	1
K103N	2.33 ± 0.81	99.1	41	0.016 5 ± 0.007 8	17.7	16
K103N,Y181C	100+	5 000+	400	0.031 8 ± 0.007 4	34.2	25
L100I,K103N	3.12 ± 2.66	132.8	58	2.60 ± 1.99	2 795.7	1 520
Y181C	8.13 ± 5.47	346	107	0.003 2 ± 0.002 5	3.4	2
Y188L	100+	5 000+	400	0.36 ± 0.20	387.1	144
K103N,V108I	7.46 ± 6.63	317.4	119	0.066 ± 0.063	71	51
K103N,P225H	5.27 ± 0.30	224.3	141	0.129 ± 0.027	138.7	205
K103N,G190A	32.11 ± 1.07	1 366.4	500	0.336 ± 0.048	361.3	148
K103N,Y188L	100+	5 000+	680	10+	10 000+	10 000+

^aFrom two tests; ^bChanges (n-fold) in IC₅₀ relative to that against wild-type virus

药后, 很容易发生耐药。因此, 以改善和克服现有药物耐药性为重点的新型非核苷类化合物的开发成为研究热点。在本研究中, 针对 HIV-1 对 NNRTIs 耐药现状, 采用分子生物学技术在野生型 HIV-1 的基础上, 引入相应的 NNRTIs 耐药突变位点, 构建了 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组假病毒筛选模型。由于 NRTIs 和 NNRTIs 与逆转录酶的结合位点不同, 临床耐药病毒对 NRTIs 和 NNRTIs 的突变位点也不相同^[10](图 1), 因此本研究在验证 9 种耐药型 HIV-1 模型的过程中, 分别选用了 2 个核苷类逆转录酶抑制剂 (AZT 和 d4T) 和 2 个非核苷类逆转录酶抑制剂 (NVP 和 EFV) 进行考察。

从实验数据可以看到, 核苷类阳性药物 AZT 和 d4T 以及非核苷类阳性药物 NVP 和 EFV 对野生型 HIV-1 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 和文献^[15, 16]报道的基本一致, 可以说明重组 HIV-1 假病毒系统可以作为药物药效学评价模型。两个核苷类阳性药物 AZT 和 d4T 对 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 的 IC_{50} 与其对野生型 HIV-1 的 IC_{50} 基本相同 (表 4), 说明 NNRTIs 耐药型 HIV-1 对 NRTIs 不耐药; 而非核苷类阳性药物 NVP 和 EFV 对耐药型 HIV-1 的 IC_{50} 明显高于其对野生型 HIV-1 的 IC_{50} (表 3), 说明 NNRTIs 耐药型 HIV-1 对 NNRTIs 耐药, 通过核苷类和非核苷类阳性药物对 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型的验证, 证实本研究中所建立的 NNRTIs 耐药型 HIV-1 重组假病毒模型是针对 HIV-1 复制环节的筛选模型, 而且针对 HIV-1 对 NNRTIs 产生耐药的特点, 所构建的 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型可特异性筛选对耐药型 HIV-1 有抑制作用的非核苷类逆转录酶抑制剂。分别计算非核苷类药物 NVP 和 EFV 的耐药倍数后得到的数据显示: 相对野生型 HIV-1, 相应的 NNRTIs 耐药型 HIV-1 对 NVP 和 EFV 的耐药倍数同临床和文献^[8, 9, 11]报道的数据基本相近, 有部分数据略有差异 (表 3), 可能原因在于临床多为联合用药, 很少有单一用药, 而且临床报道的数据多为统计结果, 不同药物间的相互作用和统计样本数的差别会对临床报道数据有不同程度的影响。

文献报道和本研究均证实不同突变位点对同一药物以及同一突变位点对不同药物所产生的耐药性都有较大的差异, 这可能与不同突变位点对逆转录酶催化活性的改变程度不同以及不同非核苷类逆转录酶药物与逆转录酶结合位点的细微差异有关, 因此在新型非核苷类逆转录酶抑制剂的研发过程中应综合一系列耐药突变病毒活性进行综合评价, 以确定最优

的化合物作为候选化合物进行开发。

综上所述, 本研究所构建的 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型可真实体现临床治疗中产生的耐药型 HIV-1 的复制特性, 且安全性好, 9 种 NNRTIs 耐药型 HIV-1 模型与野生型 HIV-1 模型联合应用, 可对逆转录酶抑制剂进行综合评价, 为该类药物的研发提供更全面的药效学评价平台。本研究在国内尚属首次报道。

致谢: 感谢中国医学科学院药物研究所程桂芳教授提供部分实验条件。感谢伊利诺伊大学 Dr. Lijun Rong 提供的质粒。

References

- [1] The Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO): 2007 Report on the global AIDS epidemic [R]. Geneva: UNAIDS and WHO, 2007.
- [2] Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1023–1035.
- [3] Zhang ZJ, Xu W, Koh YH, et al. A novel non-nucleoside analogue that inhibits HIV-1 isolates resistant to current non-nucleoside RT inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 429–437.
- [4] Yao WX, Wu YL, Guo Y. The process of HIV-1 reverse transcription and its detection by using PCR [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 118–122.
- [5] Boone LR. Next-generation HIV-1 non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. *Curr Opin Investig Drugs*, 2006, 7: 128–135.
- [6] Lazzarin A, Campbell T, Clotet B, et al. Efficacy and safety of TMC125 (etravirine) in treatment-experienced HIV-1-infected patients in DUET-2: 24-week results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Lancet*, 2007, 370: 39–48.
- [7] Madruqa JV, Berquer D, McMurchie M, et al. Efficacy and safety of darunavir-ritonavir compared with that of lopinavir-ritonavir at 48 weeks in treatment-experienced, HIV-infected patients in TITAN: a randomised controlled phase III trial [J]. *Lancet*, 2007, 370: 49–58.
- [8] Zhang ZJ, Xu W, Koh YK, et al. A novel nonnucleoside analogue that inhibits human immunodeficiency virus type 1 isolates resistant to current nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 429–437.
- [9] Petropoulos CJ, Parkin NT, Limoli KL, et al. A novel phenotypic drug susceptibility assay for human immunodeficiency virus type 1 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44: 920–928.
- [10] http://www.cabm.rutgers.edu/~kalyan/RT_imgs/inh_all_3.html
- [11] HIV Drug Resistance Database [DB]. Stanford University: NNRTI mutation pattern & susceptibility. <http://hivdb.stanford>

- edu/pages/phenoSummary/Pheno.NNRTI.Simple.html
- [12] He J, Choe S, Walker R, et al. Human immunodeficiency virus type 1 viral protein R (Vpr) arrests cells in the G2 phase of the cell cycle by inhibiting p34cdc2 activity [J]. *J Virol*, 1995, 69: 6705–6711.
- [13] Connor RI, Chen BK, Choe S, et al. Vpr is required for efficient replication of human immunodeficiency virus type-1 in mononuclear phagocytes [J]. *Virology*, 1995, 206: 935–944.
- [14] Cao YL, Guo Y. Screening of HIV-1 replication inhibitors by using pseudotyped virus system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2008, 43: 253–258.
- [15] Blair WS, Isaacson J, Li XQ, et al. A novel HIV-1 antiviral high throughput screening approach for the discovery of HIV-1 inhibitors [J]. *Antiviral Res*, 2005, 65: 107–116.
- [16] Cao J, Isaacson J, Patick AK, et al. High-throughput human immunodeficiency virus type1(HIV-1) full replication assay that includes HIV-1 Vif as an antiviral target [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 3833–3841.

关于召开“庆祝《中草药》杂志创刊 40 周年和《中草药》英文版创刊暨第七届中药新药研究与开发信息交流会”的征文通知

科技创新不仅是中药现代化的重要手段,也是中药国际化的重要支撑。在国家科技重大专项“重大新药创制”实施之际,为活跃学术思维,促进我国中草药研究领域跨学科的学术交流,激发科研人员沉潜创新、追求真知的学术精神,《中草药》杂志编辑部拟于 2009 年下半年在天津滨海新区召开“庆祝《中草药》杂志创刊 40 周年和《中草药》英文版创刊暨第七届中药新药研究与开发信息交流会”,同时还将召开《中草药》杂志第十一届编委会。现将有关事项通知如下。

1 会议内容

1.1 学术交流: 本次会议主要邀请院士和国内知名专家作学术报告并征集以下几方面的研究报告和综述性文章: ① 中药创新药物开发的思路和方法; ② 活性天然产物的发现及其作用机制研究; ③ 中药代谢组学研究; ④ 生药学研究; ⑤ 中药的安全性评价和不良反应监控; ⑥ 中药新药审评法规的最新进展; ⑦ 中药知识产权保护和专利的申请; ⑧ 民族药研究。

1.2 组织科研、医疗、教学机构进行中药新药研究成果发布,并与生产企业进行科技合作洽谈。

1.3 召开《中草药》杂志第十一届编委会,进行编委会的换届改选,颁发编委证书,共商如何进一步提高《中草药》杂志质量,扩大对外交流,高起点创办《中草药》英文版,使其尽快进入国际著名检索系统(SCI等)把本刊办成国内一流、国际知名的科技期刊。

1.4 参观中国最有潜力、最具活力、最富魅力的天津滨海新区。

2 论文征集

凡未公开发表和未在国内外会议上报告过的研究论文和综述文章均属征集范围。征稿具体要求详见《中草药》杂志 2009 年第 1 期“投稿须知”。截稿日期为 2009 年 6 月底。论文寄至: 天津市鞍山山西道 308 号《中草药》杂志编辑部(300193),并在信封上注明“征文”字样。论文经专家审评录用后将发给第一作者论文录用通知,并将编入会议专刊——《中草药》杂志 2009 年增刊。

3 信息发布

会议期间将为药厂、保健品厂、分析仪器厂及制药机械、设备厂提供产品展示、技术咨询有偿服务活动,欢迎有关厂家到会参展、咨询。

欢迎踊跃参会,即日起可填写回执报名,大会组委会收到回执后,7 月底将寄上第二轮详细通知。详细会议进展请查询 www.tjjpr.com→《中草药》。

地 址: 天津市南开区鞍山山西道 308 号《中草药》杂志编辑部(邮编: 300193)

联系人: 陈常青

电 话: 022-27474913, 23006821

E-mail: zcyzjb@sina.com

传 真: 022-23006821

网址: www.tjjpr.com

《中草药》杂志编辑部