

## Artigo

## Integrase: Um Alvo Terapêutico Importante no Combate à Infecção HIV/AIDS

Santos, M. L. A.; Albuquerque, M. G.; Brito, M. A.\*

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (4), 937-954. Data de publicação na Web: 4 de março de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

### Integrase: An Important Therapeutic Target in the Fight Against HIV/AIDS Infection

**Abstract:** The acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) is caused by the human immunodeficiency virus (HIV) that infects cells of the immune system, destroying them or causing damage to its operation. Among all the HIV enzymes, integrase is responsible for the insertion of viral DNA in the host DNA. The aim of this article is to describe the integrase inhibitors drugs and report cases of resistance, in addition to discussing new promising compounds that are being evaluated as integrase inhibitors. Currently, there are only three drugs in clinical use that belong to the class of integrase inhibitors: raltegravir (a pyrimidinone carboxamide derivative, elvitegravir (a quinoline derivative) and dolutegravir (a diazatricyclo carboxamide derivative). However, several cases of resistance to drugs of this class are described in the literature, and the mutations of the enzyme responsible for such profile are known. Many compounds with integrase inhibitory action are under development. The use of the integrase enzyme as a target against HIV/AIDS infection is promising. In addition, the integration is a complex stage of the viral replication cycle, and new details of this process are being discovered every minute, which encourages the accomplishment of more studies for the development of new drugs of this class.

**Keywords:** Drugs; integrase; HIV/AIDS.

### Resumo

A síndrome da imunodeficiência humana adquirida (AIDS, *acquired immunodeficiency syndrome*) é causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV, *human immunodeficiency virus*) que infecta as células do sistema imune, destruindo-as ou causando prejuízos ao seu funcionamento. Dentre as enzimas do HIV, a integrase é responsável pela inserção do DNA viral no DNA do hospedeiro. O objetivo desse artigo é descrever os fármacos inibidores de integrase e relatar os casos de resistência, além de discutir novos compostos promissores que estão sendo avaliados como inibidores de integrase. Atualmente, existem apenas três fármacos em uso clínico pertencentes à classe dos inibidores de integrase: raltegravir (um derivado pirimidinona carboxamida), elvitegravir (um derivado quinolina) e dolutegravir (um derivado diazatriciclo carboxamida). Entretanto, diversos casos de resistência a estes fármacos são descritos na literatura e as mutações da enzima responsáveis por este perfil são conhecidas. Muitos compostos com ação inibidora de integrase estão em desenvolvimento. A utilização da enzima integrase como alvo no combate ao vírus HIV mostra-se promissora. Além disso, a integração é uma etapa complexa do ciclo de replicação viral e novos detalhes desse processo têm sido descobertos a todo instante, o que estimula a realização de mais estudos para o desenvolvimento de novos fármacos desta classe.

**Palavras-chave:** Fármaco; integrase; HIV/AIDS.

\* Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Química Medicinal Computacional, Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Niterói-RJ, Brasil.

✉ [moniquebrito@id.uff.br](mailto:moniquebrito@id.uff.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20140058](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140058)

## Integrase: Um Alvo Terapêutico Importante no Combate à Infecção HIV/AIDS

Monique Luiza A. dos Santos,<sup>a</sup> Magaly G. Albuquerque,<sup>b</sup> Monique A. de Brito<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal Fluminense, Laboratório de Química Medicinal Computacional, Departamento de Farmácia, Faculdade de Farmácia, Niterói-RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Laboratório de Modelagem Molecular (LabMMol), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

\* [moniquebrito@id.uff.br](mailto:moniquebrito@id.uff.br)

*Recebido em 11 de novembro de 2013. Aceito para publicação em 4 de março de 2014*

1. Introdução: HIV e AIDS
2. Ciclo de replicação do HIV
3. A enzima integrase
4. Inibidores de Integrase
  - 4.1. Inibidores de integrase em uso clínico
  - 4.2. Inibidores da integrase em desenvolvimento
5. Resistência aos inibidores da integrase
6. Conclusões

### 1. Introdução: HIV e AIDS

O vírus da imunodeficiência humana (em inglês, *human immunodeficiency virus*, HIV) é capaz de infectar células do sistema imunológico (ou imune), como macrófagos e linfócitos T CD4,<sup>1</sup> destruindo-as ou incapacitando-as, prejudicando o funcionamento normal deste sistema. Com o progresso da infecção, o sistema imune torna-se praticamente inoperante e o indivíduo, mais suscetível às infecções oportunistas.<sup>2</sup>

O estágio mais avançado da infecção por

HIV é a síndrome da imunodeficiência adquirida (em inglês, *acquired immunodeficiency syndrome*, AIDS). Para desenvolver a AIDS, um indivíduo infectado pelo HIV pode levar de 10 a 15 anos; os fármacos antivirais podem retardar a evolução desse processo.<sup>2</sup>

Até o momento, foram identificados dois tipos de HIV chamados HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é a causa mais frequente da AIDS enquanto que o HIV-2 difere em sua estrutura genômica e antigenicidade e causa uma síndrome clinicamente semelhante.<sup>3</sup> O HIV-1 é um retrovírus integrante da família Retroviridae. Retrovírus são vírus que contém

RNA<sup>4</sup> e pertencem ao gênero *Lentivirus*, que apresentam a capacidade de causar uma infecção latente de longo prazo nas células e efeitos citopáticos em curto prazo. Todos os lentivírus são capazes de produzir doenças fatais de progressão lenta, incluindo síndromes que provocam o definhamento e degeneração do sistema nervoso central.<sup>3</sup>

Os alvos do vírus HIV são as células T auxiliares CD4<sup>+</sup>, os macrófagos e as células dendríticas.<sup>3</sup> Estas células funcionam como um reservatório que mantém a infecção viral por um longo período.<sup>5</sup>

O HIV apresenta forma esférica, com cerca de 10<sup>-4</sup> mm de diâmetro, e dois envelopes glicoproteicos (gp), sendo o maior extracelular (gp120), e o menor inserido na membrana celular (gp41). Apresenta, também, dois nucleocapsídeos que protegem as duas fitas de RNA viral e as enzimas virais: transcriptase reversa, integrase e protease.<sup>1</sup>

A transmissão do HIV pode ocorrer via relações sexuais sem o uso de preservativos, da mãe infectada para o filho durante a gestação, durante o parto ou a amamentação (transmissão vertical), uso da mesma seringa ou agulha contaminada por mais de uma pessoa, transfusão de sangue contaminado com o HIV e instrumentos perfurantes ou cortantes não esterilizados.<sup>2</sup>

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2011 havia no mundo 34 milhões de indivíduos portadores do HIV. Deste total, 3,3 milhões eram crianças (menores de 15 anos). Ainda nesse mesmo ano, 2,5 milhões de indivíduos foram infectados e 1,7 milhões morreram em decorrência da AIDS.<sup>2</sup>

No Brasil, desde o início da epidemia em 1980 até junho de 2011, 608.230 casos de AIDS foram registrados. Em 2010, foram notificados 34.218 casos da doença, sendo a taxa de incidência de AIDS de 17,9 casos por 100 mil habitantes.<sup>6</sup>

## 2. Ciclo de replicação do HIV

O ciclo de replicação do HIV é composto por diversas etapas, sendo que, quatro dessas são dependentes de macromoléculas que são os alvos de fármacos em uso clínico. A etapa de fusão corresponde à entrada do vírus na célula através da interação da glicoproteína viral gp120 com o receptor CD4, localizado na superfície da célula do hospedeiro. Essa etapa ocorre com a participação da glicoproteína viral transmembrana gp41 e dos coreceptores quimiocínicos CXCR4 e CCR5.<sup>7</sup>

Após a fusão, há a liberação do conteúdo do capsídeo no meio intracelular, onde ocorre a etapa de transcrição reversa. Nessa etapa, a enzima viral transcriptase reversa converte o RNA viral em DNA,<sup>8</sup> ocorrendo a formação do complexo de pré-integração, que é transportado para o núcleo.

A etapa de integração corresponde à ação da enzima viral integrase, associada ao complexo de pré-integração, que promove a intercalação do DNA viral no DNA do hospedeiro.<sup>1</sup>

O DNA híbrido resultante da integração é transcrito em RNA mensageiro e este é encaminhado ao citoplasma, onde é traduzido na forma de poliproteínas que são os precursores das proteínas virais. As poliproteínas são unidades longas de polipeptídeos que após hidrólise dão origem às proteínas estruturais e enzimas.<sup>8</sup>

O RNA viral e as poliproteínas movem-se para a superfície celular, onde são incorporados aos novos vírus que se lançam da membrana da célula. Nesse primeiro momento, os vírus recém-formados não são infectantes. Para que tenham o poder de infectar novas células dependem da ação da enzima viral protease que promove a hidrólise dos polipeptídeos.<sup>8</sup>

Assim, a formação de partículas virais infecciosas ocorre através da proteólise dos polipeptídeos precursores *gag* e *gag-pol*, dando origem aos componentes estruturais capsídeo; matriz e nucleocapsídeo; e às

enzimas transcriptase reversa, integrase e protease.<sup>1</sup>

### 3. A enzima integrase

A enzima integrase é a responsável pela incorporação do DNA viral no DNA da célula do hospedeiro. Ela atua em reações altamente específicas, necessárias para o processo de integração.<sup>9</sup>

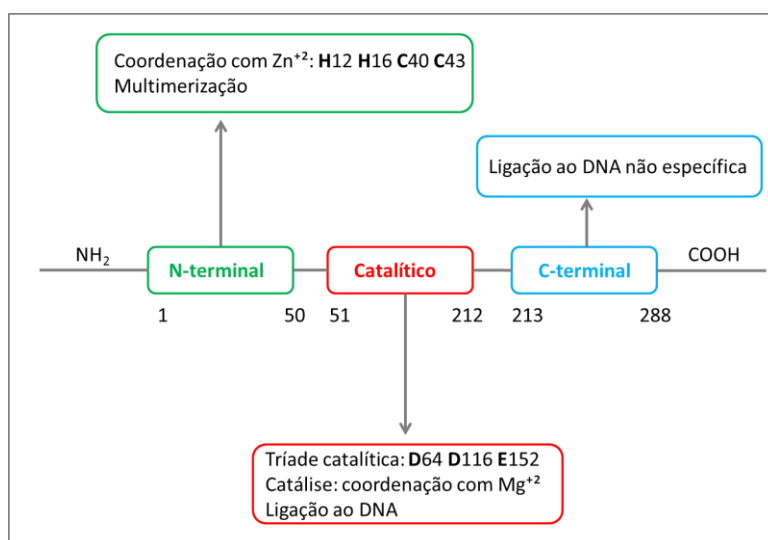
Do ponto de vista mecânico e estrutural, a integrase pertence a uma família diversificada de polinucleotidil-transferases, que inclui enzimas como a RNaseH (que constitui um dos domínios da transcriptase reversa) e as transposases originadas de Tn5.<sup>10,11</sup> As transposases são enzimas que mediam o processo de transposição do DNA, onde estes fragmentos movimentam-se livremente pelo genoma.<sup>12</sup>

A enzima integrase possui 288 aminoácidos codificados pelo gene *pol* do HIV-1, sendo composta por três domínios funcionais: *N*-terminal, catalítico e *C*-terminal.<sup>13</sup>

O domínio *N*-terminal é formado pelos aminoácidos 1 até 50 e a sua estrutura monomérica consiste em quatro hélices- $\alpha$  estabilizadas pelo cátion  $Zn^{2+}$ , coordenado pelos resíduos H12, H16, C40 e C43.<sup>13,14</sup> Esta região é conhecida como “*HHCC zinc-binding motif*” e seu papel primário é facilitar a multimerização da integrase e de seus contatos extensivos com monômeros de núcleos catalíticos adjacentes.<sup>15</sup>

O domínio catalítico é constituído pelos aminoácidos 51 até 212, no qual está presente a tríade catalítica (D64, D116 e E152), além do sítio de ligação do DNA viral.<sup>15</sup> Estruturalmente, este domínio consiste em uma mistura de seis hélices- $\alpha$  e cinco folhas- $\beta$ .<sup>14</sup> Os resíduos que formam o sítio ativo apresentam grupos carboxilato carregados negativamente coordenados com dois íons metálicos  $Mg^{2+}$ .<sup>11,14</sup>

Finalmente, os aminoácidos 213 até 288 formam o domínio *C*-terminal, que se liga ao DNA do hospedeiro de forma inespecífica.<sup>15</sup> Um monômero deste domínio é formado por cinco folhas- $\beta$  arranjadas de maneira antiparalela, formando uma espécie de barril (em inglês, “ *$\beta$ -barrel*”).<sup>13</sup> A Figura 1 é uma representação esquemática dos três domínios da enzima HIV integrase.



**Figura 1.** Representação esquemática dos domínios estruturais da enzima HIV integrase

A integrase catalisa reações de substituição nucleofílica do tipo  $S_N2$ , com auxílio de cofatores, que são cátions metálicos divalentes ( $Mg^{2+}$ ).<sup>10</sup> Inicialmente, ocorre a hidrólise do grupo fosfato de um ácido nucleico, resultando na formação do produto 3'-OH. Dois íons metálicos auxiliam a reação em diferentes regiões, sendo que um dos íons auxilia no posicionamento e ativação do nucleófilo, enquanto o outro estabiliza o estado de transição e o grupo de saída.<sup>11</sup>

A atuação da integrase pode ser dividida em três etapas: processamento do DNA viral por clivagem do nucleotídeo do terminal-3', formação do complexo de pré-integração e transferência de cadeia, quando o DNA viral é inserido no DNA da célula do hospedeiro.<sup>16</sup>

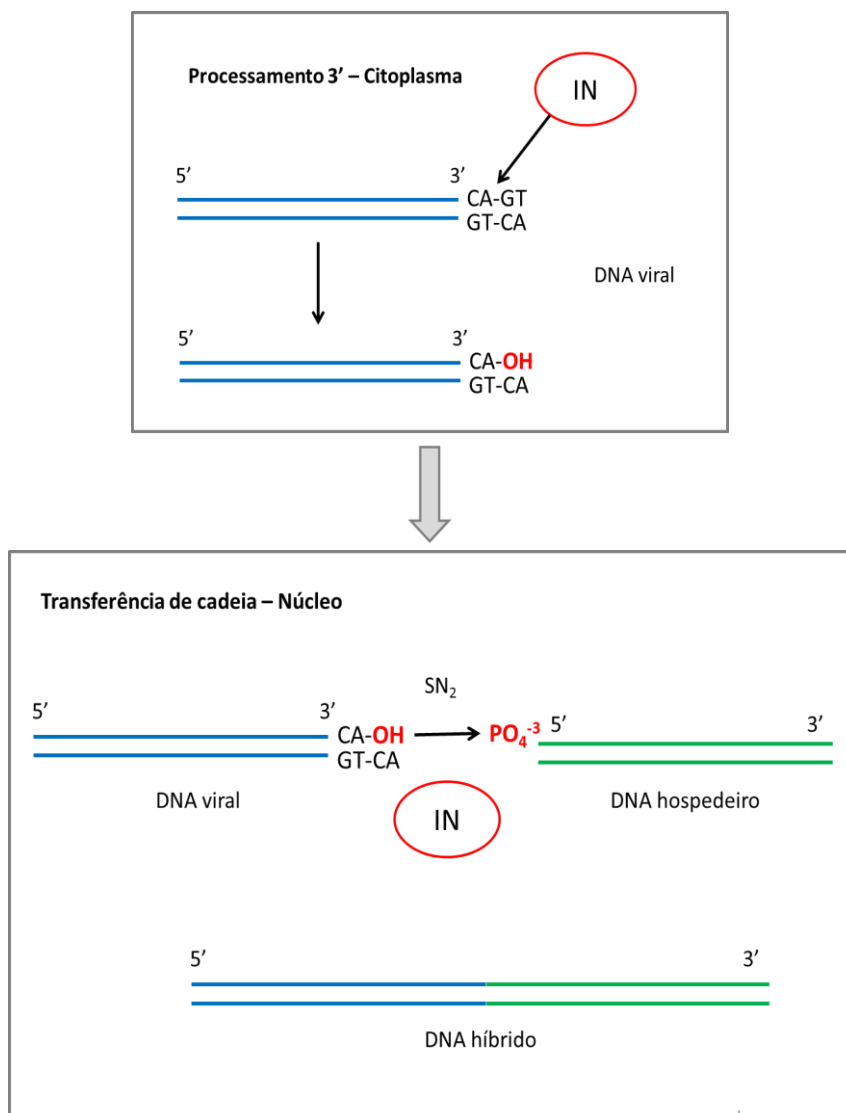
A integração ocorre, inicialmente, no citoplasma. Após a conversão do RNA viral em DNA, este passará pelo processamento 3', sendo esta a primeira reação deste processo. A integrase reúne sequências específicas dentro de regiões de repetições terminais longas (*long terminal repeat*, LTR) em cada região final da fita de DNA viral.<sup>9</sup> Ocorre uma clivagem sítio-específica de dois nucleotídeos de cada extremidade 3', dando origem a um DNA processado com o final CAOH-3'. O grupo hidroxila do terminal 3'-OH será o nucleófilo que a integrase necessita para a reação de transferência de cadeia, que ocorre após a entrada do complexo de pré-integração no núcleo.<sup>9</sup> Essa reação consiste na junção das terminações 3'-OH do DNA viral com 5'-fosfato do DNA do hospedeiro, seguida de etapas de reparação e ligação.<sup>17</sup> O processamento inicial faz com que as fitas se

liguem covalentemente.<sup>18</sup> Tanto o processamento 3', quanto a transferência de cadeia, dependem de íons metálicos divalentes que funcionam como cofatores.<sup>17</sup>

O processo de integração ocorre no intassomo, que é um complexo núcleo-proteico composto pela integrase associada ao DNA viral.<sup>19</sup> Nele estão presentes dímeros da enzima integrase, nos quais apenas uma subunidade de cada dímero se liga a uma região final de DNA viral.<sup>10</sup> O DNA do hospedeiro ou DNA alvo acomoda-se entre os sítios ativos no interior do intassomo. Este fato provoca uma torção no DNA do hospedeiro, que permite que os sítios ativos tenham acesso às ligações fosfodiéster do DNA alvo.<sup>19</sup>

Os íons metálicos, que estão coordenados aos resíduos de D e E, ativam o nucleófilo 3'-OH e desestabilizam as ligações fosfodiéster, durante a transferência de cadeia, facilitando a reação.<sup>1</sup> O nucleófilo ataca as ligações fosfodiéster, que estão em fitas opostas do DNA alvo, resultando numa transesterificação e subsequente fusão das regiões finais 3' dos DNAs do vírus e do hospedeiro.<sup>20</sup> O esquema da Figura 2 é um resumo das duas etapas do processo de integração.

A análise da atuação da enzima integrase mostra que ela representa um importante alvo para a pesquisa e desenvolvimento de novos antirretrovirais, visto que sua principal vantagem é não apresentar nenhum homólogo celular em humanos, que possibilita o desenvolvimento de fármacos potencialmente mais específicos.<sup>4</sup>



**Figura 2.** Esquema das etapas de processamento do terminal-3' e de transferência de cadeia do processo de integração catalisado pela enzima integrase (IN) do HIV-1

#### 4. Inibidores de Integrase

Os inibidores da integrase são uma nova classe de fármacos anti-HIV, apresentando baixa toxicidade em relação a outros fármacos, como o efavirenz (inibidor não-nucleosídeo da transcriptase reversa), que promove efeitos tóxicos no sistema nervoso central, e aos inibidores da protease, que causam reações gastrointestinais indesejadas.<sup>21</sup>

Algumas das razões que fazem dos inibidores da integrase uma classe

promissora no tratamento da infecção por HIV, são: (i) atuação num alvo novo, a integrase, que inibe a etapa de transferência de cadeia do DNA viral para o DNA do hospedeiro, deslocando o DNA viral do sítio ativo; (ii) atividade contra cepas de HIV-1 resistentes aos inibidores da transcriptase reversa e da protease; (iii) as células de mamíferos não apresentam enzimas integrase, o que torna essa classe altamente específica contra o vírus e, portanto, de baixa toxicidade.<sup>16</sup>

Os primeiros compostos inibidores de integrase descobertos apresentam três

componentes estruturais importantes: (i) um grupo  $\beta$ -dicetoácido, (ii) um anel aromático ou heteroaromático e (iii) um grupo carboxila, que pode ser substituído por um bioisótero (Figura 3).<sup>22</sup> Esses grupos farmacofóricos estão envolvidos na complexação de um ou de ambos os íons magnésio, bloqueando o estado de transição

da formação do complexo entre o DNA viral e a integrase pela competição com o DNA do hospedeiro.<sup>22</sup> Conseqüentemente, diversas pesquisas foram realizadas com o objetivo de desenvolver novos compostos capazes de complexar ambos os íons magnésio, resultando em derivados novos e mais potentes.<sup>22</sup>

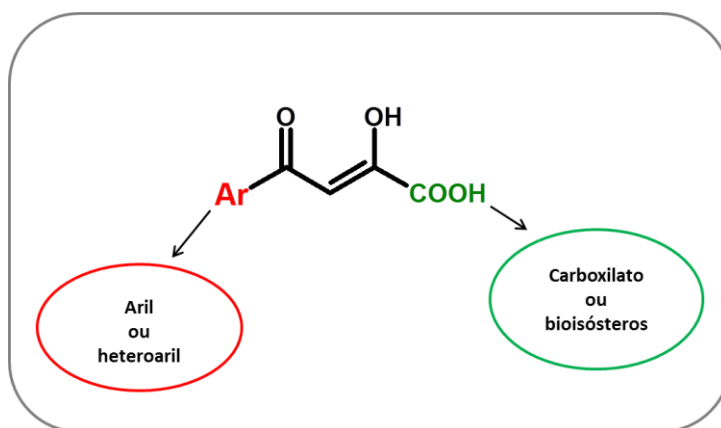


Figura 3. Grupos farmacofóricos dos  $\beta$ -diceto-ácidos

#### 4.1. Inibidores de integrase em uso clínico

Desde que esta enzima se tornou um possível alvo terapêutico, vários compostos apresentaram atividade inibitória *in vitro* sobre a mesma, porém, poucos passaram para a fase de testes clínicos. Entre eles destaca-se o raltegravir (**1**, Figura 4) que foi o primeiro inibidor de integrase aprovado pela agência que regulamenta medicamentos nos Estados Unidos (em inglês, *U. S. Food and Drug Administration*, FDA) para o tratamento de HIV/AIDS, em outubro de 2007.<sup>23</sup>

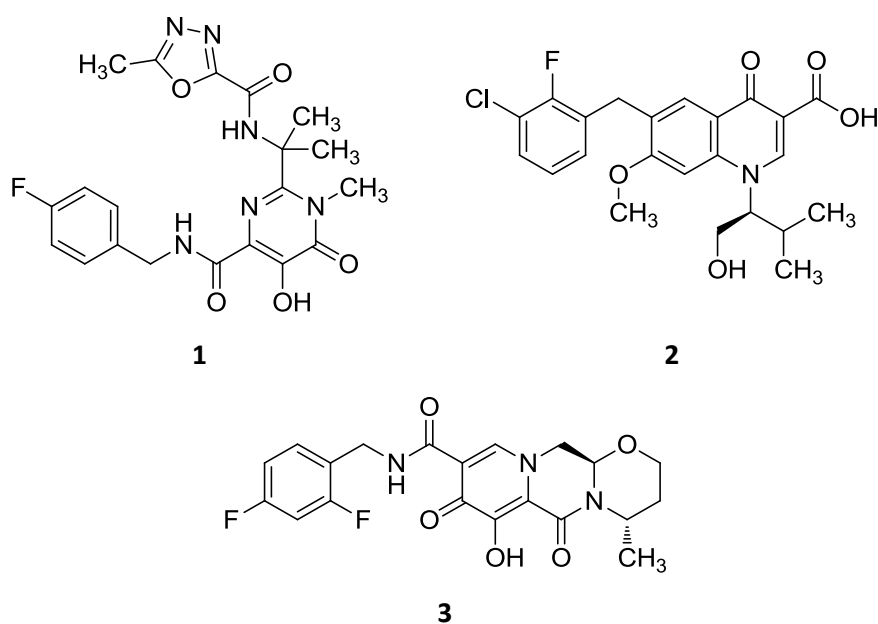
Os outros fármacos dessa classe são o elvitegravir (**2**, Figura 4) e o dolutegravir (**3**, Figura 4). O elvitegravir foi aprovado pelo FDA, em 2012, como um dos componentes do Stribild®, composto também pelos antirretrovirais elvitegravir, emtricitabina, tenofovir e cobicistat.<sup>24</sup> Em agosto de 2013, o dolutegravir foi aprovado pelo FDA.<sup>24</sup>

##### 4.1.1. Raltegravir

O raltegravir apresenta em sua estrutura um anel central pirimidinona e nas extremidades dois anéis aromáticos (um oxadiazol e uma fenila). Essas três unidades aromáticas são unidas por grupos espaçadores amida. É comercializado como um sal de potássio e sua nomenclatura IUPAC é *N*-[(4-flúor-fenil)-metil]-1,6-di-hidro-5-hidróxi-1-metil-2-[1-metil-1-[[5-metil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-carbonil]-amino]-etil]-6-oxo-4-pirimidino-carboxamida. Sua fórmula química é  $C_{20}H_{20}FKN_6O_5$  e seu peso molecular (PM) é 482,51 g/mol.<sup>25</sup>

No Brasil, apenas o raltegravir está disponível para uso clínico. Em setembro de 2008, ele foi indicado pelo Comitê Assessor para Terapia Antirretroviral em Adultos Infectados pelo HIV para uso no Programa Nacional de DST/AIDS. Desta forma, no início do ano de 2009 o raltegravir começou a ser distribuído pelo Sistema Único de Saúde (SUS).<sup>26</sup>





**Figura 4.** Estruturas químicas dos fármacos inibidores da integrase raltegravir (1), elvitegravir (2) e dolutegravir (3)

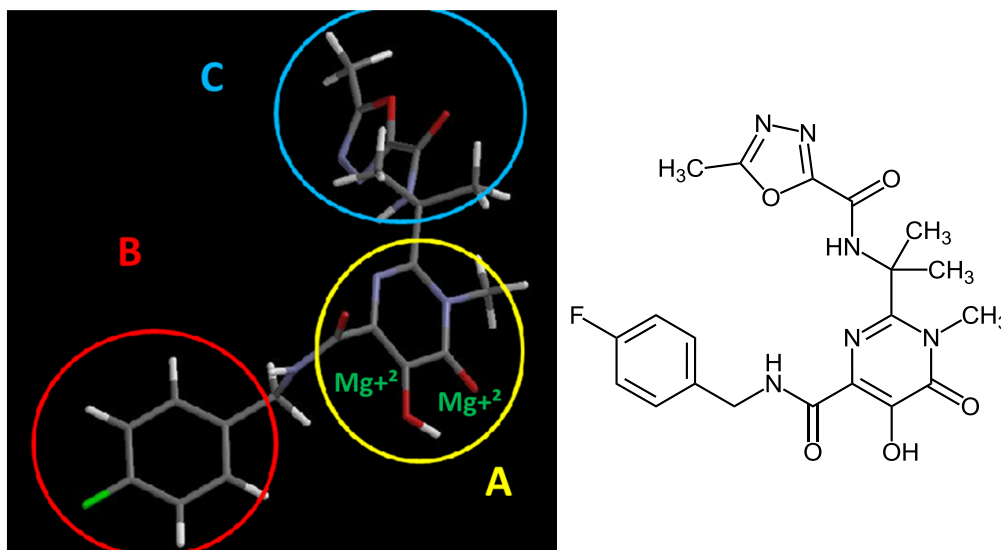
De acordo com a Nota Técnica nº 307 de 2008, emitida pelo Ministério da Saúde (MS), o raltegravir deve ser utilizado apenas em pacientes que apresentaram quadro de falha virológica. Além disso, pode ser incluído em esquemas compostos por medicamentos das três classes de antirretrovirais que fazem parte do coquetel disponível no SUS, que são os inibidores da transcriptase reversa e protease.<sup>26</sup>

O raltegravir e os demais fármacos dessa classe inibem, preferencialmente, a transferência de cadeia de DNA na etapa de integração<sup>1</sup> pela competição com o DNA do hospedeiro.<sup>27</sup> Os inibidores da integrase ligam-se no complexo integrase-DNA viral (intassomo) e não possuem a capacidade de se ligar à enzima na ausência do DNA viral.<sup>10</sup> Eles complexam os dois íons metálicos presentes no sítio ativo, reduzindo a atividade enzimática e também deslocam a região final 3'-OH do DNA viral, que é o

nucleófilo na reação de transferência de cadeia.<sup>9</sup> Além disso, ainda impedem que o DNA do hospedeiro ligue-se ao intassomo.<sup>27</sup>

Na Figura 5, utilizando como exemplo o raltegravir, são destacados os grupos farmacofóricos dos inibidores da integrase que complexam os íons metálicos do sítio ativo. A região A é a responsável pela coordenação aos dois íons metálicos.<sup>28</sup> A região B é composta por um fragmento hidrofóbico, derivado de um extensivo estudo de relação estrutura-atividade (em inglês, *Structure-Activity Relationship, SAR*) realizado por diversos grupos de pesquisa, que concluíram que este deve ser um grupo benzila.<sup>28</sup> Este grupo é responsável por melhorar a afinidade e especificidade do inibidor pelo intassomo.<sup>29</sup> A região C é, comumente, muito flexível e tolerável a modificações estruturais para otimização da farmacocinética.<sup>28</sup>





**Figura 5.** Estrutura química do raltegravir, destacando os grupos farmacofóricos dos inibidores da integrase. Os íons  $Mg^{2+}$  estão presentes no sítio ativo da enzima e são complexados pelo fármaco

#### 4.1.2. Elvitegravir

A nomenclatura IUPAC do fármaco elvitegravir é 6-[(3-cloro-2-flúor-fenil)metil]-1-[(2S)-1-hidróxi-3-metil-butan-2-il]-7-metóxi-4-oxo-1,4-di-hidroquinolina-3-ácido carboxílico. Sua fórmula química é  $C_{23}H_{23}ClFNO_5$  e seu PM é 447,88 g/mol.<sup>30</sup>

Elvitegravir é um monocetoácido que apresenta alta especificidade e eficácia contra a reação de transferência de cadeia, com um  $IC_{50} = 7$  nM.<sup>31</sup>

No ano de 2012, foi aprovado pelo FDA o Stribild®, um medicamento que combina dois fármacos já utilizados na terapêutica, emtricitabina (4, Figura 6) e tenofovir (5, Figura 6) (ambos inibidores da transcriptase reversa, aprovados em 2004, e comercializados como Truvada®) e mais dois fármacos novos, elvitegravir (2, Figura 4) (um inibidor da integrase) e cobicistat (6, Figura 6) (um inibidor da CYP3A, enzima que metaboliza fármacos anti-HIV, que é utilizado para prolongar o efeito do elvitegravir).<sup>24</sup> Este medicamento foi desenvolvido para ser administrado uma vez ao dia, simplificando o tratamento, sendo um benefício para os

pacientes.<sup>24</sup> Na Figura 6 estão as estruturas químicas dos fármacos que compõem o Stribild®.

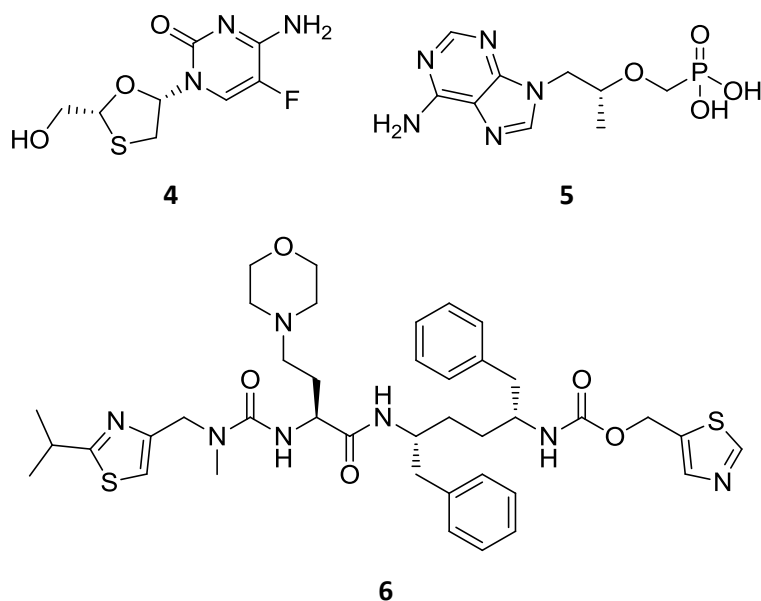
A estrutura do elvitegravir (2) é mostrada na Figura 4.

#### 4.1.3. Dolutegravir

O dolutegravir, (3S,7R)-N-[(2,4-difluór-fenil)-metil]-11-hidróxi-7-metil-12-oxo-4-oxa-1,8-diazatriciclo[8.4.0.0{3,8}]tetradeca-10,13-dieno-13-carboxamida, possui fórmula química de  $C_{20}H_{21}F_2N_3O_4$  e PM de 405,395 g/mol.<sup>30</sup>

Foi observado em ensaios enzimáticos que dolutegravir inibe preferencialmente a reação de transferência de cadeia, apresentando valor de  $IC_{50} = 2,7$  nM.<sup>32</sup> Demonstrou eficácia contra clones virais resistentes a raltegravir e elvitegravir, assim como contra cepas isoladas de HIV-1 e HIV-2.<sup>32</sup>

Seu tempo de meia-vida plasmática de aproximadamente 14h, permite que a administração de apenas uma dose diária seja suficiente para sua ação farmacológica.<sup>33</sup>



**Figura 6.** Estruturas químicas dos componentes do Stribild®: emtricitabina (4), tenofovir (5) e cobicistat (6)

#### 4.2. Inibidores da integrase em desenvolvimento

Como relatado anteriormente, apesar de ser um alvo recente, já existem mecanismos de resistência que diminuem a suscetibilidade da integrase aos seus inibidores. Além disso, até o momento, há apenas dois fármacos aprovados pelo FDA. Nesse contexto, surge a necessidade de se estudar novos compostos químicos com ação inibidora sobre a integrase.

Nos últimos anos, muitos grupos de pesquisa têm se dedicado a esse tema, com um grande número de artigos sendo publicados a cada mês. Uma pesquisa realizada na base de dados *Web of Science* utilizando os descritores “integrase HIV” e “inibitor” como tópicos, delimitando o intervalo de tempo entre 2003 e 2013, resultou em 1344 artigos publicados em diversas revistas científicas. Devido ao volume de dados envolvendo a integrase, nosso trabalho se restringiu aos últimos cinco anos de pesquisa, selecionando apenas três classes promissoras: 8-hidroxiquinolinas,

carbamoil-piridonas e derivados azaindóis do ácido hidroxâmico.

##### 4.2.1. Classe das 8-hidroxiquinolinas

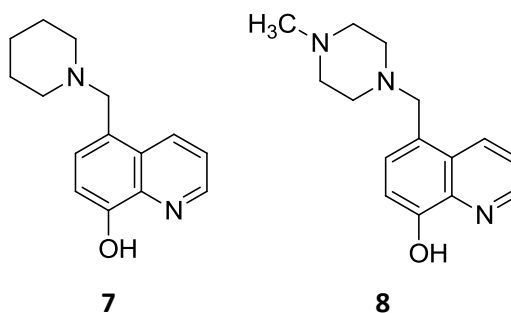
Publicada no trabalho de Serrao e colaboradores em 2013,<sup>34</sup> a classe das 8-hidroxiquinolinas propõe a inovação de inibir a interação da integrase com a proteína LEDGF/p75 (“*lens epithelium-derived growth factor/p75*”) de forma alostérica.<sup>34</sup> Essa proteína é encontrada na célula do hospedeiro e funciona como um importante cofator da replicação viral, exercendo papel fundamental na interação da integrase com o cromossomo do hospedeiro, estimulando a integração concertada do DNA viral.<sup>35,36</sup> Após o processamento do terminal-3’ do DNA viral, a integrase permanece ligada a cada uma dessas regiões finais, formando o complexo de pré-integração. A integrase liga-se, então, à proteína LEDGF/p75, que irá transportar o complexo até o núcleo onde ocorre a transferência de cadeia.<sup>15</sup>

Essa classe foi planejada empregando a

técnica de desenvolvimento de fármacos baseada em fragmentos (em inglês, *Fragment-Based Drug Design*, FBDD), que se tornou um complemento popular da tradicional triagem de alta produtividade (em inglês, *High-Throughput Screening*, HTS).<sup>34</sup>

A quinolina foi identificada como grupo farmacofórico dessa classe, devido à sua

presença em vários fármacos aprovados pelo FDA, como os antiprotozoários mefloquina e cloroquina, aliado ao fato da exploração de quinolonas no desenvolvimento de inibidores da integrase nos últimos dez anos.<sup>34</sup> Os compostos **7** ( $IC_{50} = 0,4 \mu M$ ) e **8** ( $IC_{50} = 0,8 \mu M$ ) são os dois mais ativos da classe das 8-hidroxiquinolinas (Figura 7).

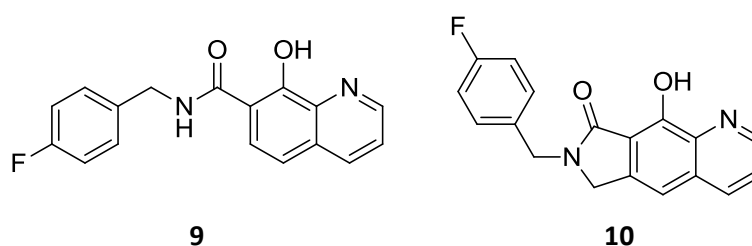


**Figura 7.** Estruturas químicas dos compostos mais ativos da classe das 8-hidroxiquinolinas

Nos últimos dez anos, também foi observado um crescimento da exploração de quinolonas como inibidores da integrase,<sup>34</sup> devido a este núcleo estar presente na estrutura do elvitegravir.

Jin e colaboradores publicaram, em 2006, uma classe de análogos tricíclicos de pirroloquinolinas.<sup>37</sup> O núcleo tricíclico é formado pela junção de um anel pirrol a uma

8-hidroxiquinolina. O anel pirrol é proveniente da ciclização do grupo funcional amida, ligado à 8-hidroxiquinolina, mantendo a conformação ativa, que é distinta da mais estável. Esta modificação levou a uma diminuição do  $IC_{50}$  de 2.000 nM (**9**, Figura 8) para 70 nM (**10**, Figura 8).<sup>37</sup> Atuam na inibição da reação de transferência de cadeia, complexando com os íons magnésio.<sup>37</sup>



**Figura 8.** Estruturas químicas de uma 8-hidroxiquinolina contendo uma amida na cadeia lateral e um análogo tricíclico de pirroloquinolina

#### 4.2.2. Classe das carbamoil-piridonas

O planejamento racional das carbamoil-piridonas como inibidores de integrase mostrou que esta classe de compostos pode atuar como agentes complexantes dos dois

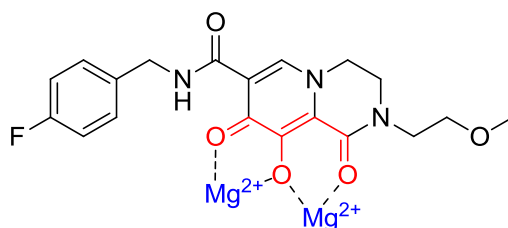
íons  $Mg^{2+}$ , e ampliar o grupo aromático da região hidrofóbica comum aos inibidores da integrase. Dessa forma, o composto bioativo impediria a catálise e a estabilização do intermediário da reação de transesterificação, resultando na inserção do DNA viral no DNA do hospedeiro.<sup>28</sup>

Para o desenvolvimento destes compostos, buscou-se realizar modificações na região hidrofóbica (Região B, Figura 5), que constitui um dos importantes grupos farmacofóricos dos inibidores da integrase. Eles estudaram o efeito estérico provocado por diferentes anéis arila, associando ao impacto causado à potência.<sup>28</sup>

Posteriormente, foi analisada a propriedade complexante que um bom inibidor deveria possuir. Sabe-se que o domínio catalítico da integrase possui dois íons  $Mg^{2+}$  que é um ácido duro. Em decorrência disso, foi selecionado entre três fragmentos com propriedades complexantes contendo oxigênio e nitrogênio, um com oxigênio, pois é uma base mais dura do que o nitrogênio e, portanto, irá complexar com o

íon magnésio no sítio ativo de forma mais eficaz. Além disso, a escolha do oxigênio proporciona uma série de benefícios adicionais, como a redução de potenciais efeitos adversos, causados por ligações inespecíficas com metais moles, que podem ser utilizados em outras funções biológicas do corpo humano.<sup>28</sup>

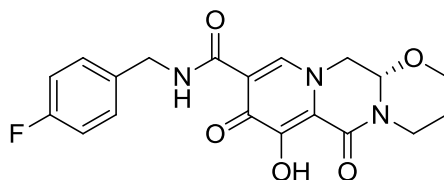
Recentemente, Kawasuji e colaboradores sintetizaram e avaliaram a atividade biológica do composto **11** ( $IC_{50} = 1,6$  nM), pertencente à classe das carbamoil-piridonas, como um promissor inibidor de integrase.<sup>38</sup> A Figura 9 é uma representação gráfica do provável modo de interação dos compostos dessa classe com os íons metálicos presentes no sítio ativo da integrase.



**Figura 9.** Representação esquemática do provável modo de interação das carbamoil-piridonas com os íons metálicos no sítio ativo da integrase

Um trabalho mais recente do mesmo grupo revelou que o derivado citado acima não era totalmente eficiente contra cepas mutadas. A introdução de um grupo hidroxila no anel piperazinona saturado levou a um

significante aumento da potência, mas houve problemas para o controle da estereoquímica durante a síntese. A solução para estabilizar este grupo foi a introdução de um sistema tricíclico (**12**, Figura 10).<sup>39</sup>



**Figura 10.** Carbamoil piridona com sistema tricíclico

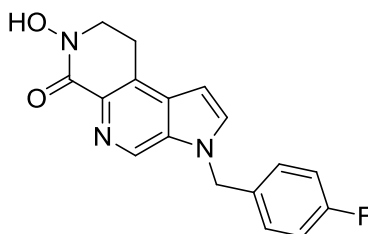
#### 4.2.3. Classe dos derivados azaindóis do ácido hidroxâmico

Os compostos derivados do ácido hidroxâmico foram descritos, inicialmente, por Plewe e colaboradores (2009) e, posteriormente, pelo mesmo grupo de

pesquisa em outros dois trabalhos.<sup>23,40,41</sup>

A gênese da série teve início com a triagem de oito ácidos carboxílicos azaindóis, empregando um ensaio enzimático chamado *Integrase Strand-Transfer Scintillation Proximity Assay* (SPA), que utiliza uma pequena esfera como superfície sólida (*SPA bead*). Esta esfera tem a capacidade de emitir luz quando moléculas radioativadas estão ligadas na sua superfície.<sup>42</sup> O método consiste, primeiramente, na incubação da integrase com o DNA viral, chamado de DNA doador, ocorrendo a formação do complexo integrase-DNA viral que é aderido à

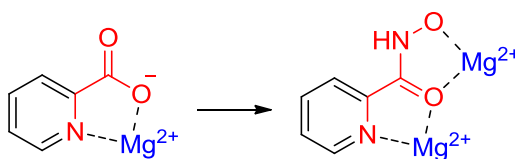
superfície da esfera. Em seguida, adiciona-se o DNA do hospedeiro, chamado de DNA alvo, que recebe um pré-tratamento com um isótopo, podendo ser o trítio (<sup>3</sup>H). O DNA alvo tritiado é adicionado à mistura de reação e incubado novamente. A atividade enzimática é quantificada por um programa que detecta a emissão de luz. Se houver reação de transferência de cadeia, haverá emissão de luz e vice-versa. A avaliação por este método revelou que o derivado mais potente é o composto **13** (IC<sub>50</sub> = 2,9 nM), cuja estrutura química está representada na Figura 11.<sup>23,40</sup>



**Figura 11.** Estrutura do derivado mais potente da classe dos derivados azaindóis do ácido hidroxâmico

Conhecendo a capacidade dos ácidos hidroxâmicos de complexar com íons metálicos, foi realizada a substituição da função ácido carboxílico dos ácidos azaindóis pela função ácido hidroxâmico. Dessa forma, os compostos originais, capazes de complexar com apenas um íon metálico,

tornaram-se derivados capazes de complexar com dois íons metálicos simultaneamente, como representado na Figura 8.<sup>40</sup> Este fato foi de extrema importância para o desenvolvimento desses compostos, visto que o sítio ativo da integrase possui dois íons metálicos.



**Figura 12.** Substituição do ácido carboxílico por ácido hidroxâmico

Um estudo de Sangeetha e colaboradores concluiu que o grupo fluorobenzeno e a ciclização do grupo ácido hidroxâmico que complexa com os íons metálicos, são os responsáveis pela inibição enzimática efetiva apresentada por esta classe.<sup>43</sup>

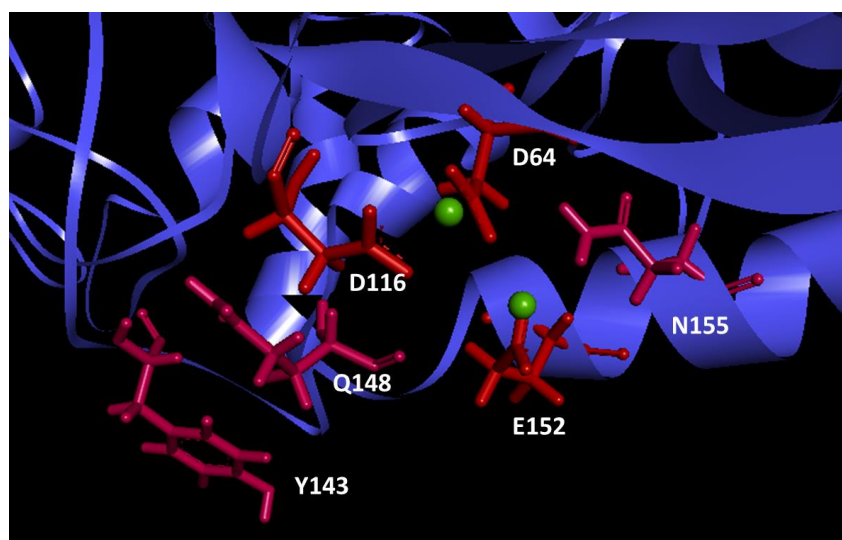
## 5. Resistência aos inibidores da integrase

A maioria dos fármacos inibidores de integrase tem sido desenvolvida com o objetivo de impedir a interação da integrase

com o DNA do hospedeiro, contudo, nos últimos anos, vários casos de resistência têm sido descritos.<sup>44</sup> O desenvolvimento de resistência ao raltegravir está relacionado à mutações na integrase localizadas no domínio catalítico, que ocasionam redução da ação da enzima.<sup>45</sup> Uma alternativa para minimizar este problema seria o desenvolvimento de inibidores que impedissem a entrada da integrase no núcleo da célula do hospedeiro.<sup>44</sup>

Além disso, dados oriundos das avaliações clínicas indicam que as mutações Y143C(R), Q148H(R)(K) ou N155H na integrase (Figura 10), associadas à mutações secundárias, podem resultar em resistência ao raltegravir.<sup>45</sup> Os resíduos Q148 e N155 estão

localizados, estrategicamente, no centro do sítio catalítico, próximos aos três resíduos ácidos presentes neste sítio, e Q148 interage com a região terminal-5' do DNA viral.<sup>46</sup> Desta forma, estas mutações (Q148H e N155H) são responsáveis por provocar mudanças conformacionais no sítio catalítico que levam ao aumento da energia de ligação dos fármacos inibidores de integrase.<sup>46</sup> Outro ponto de mutação, Y143, afeta diretamente a ligação do raltegravir, pois este resíduo interage com o fármaco via interação do tipo empilhamento  $\pi$ - $\pi$  (*pi-stacking*). Esta interação ocorre entre os anéis aromáticos da tirosina (fenol) e do raltegravir (anel 1,3,4-oxadiazol).<sup>46</sup>



**Figura 13.** Estrutura 3D do domínio catalítico da integrase onde estão destacados os aminoácidos relacionados à resistência aos fármacos inibidores (em rosa) e os aminoácidos que fazem parte da tríade catalítica (em vermelho). As esferas verdes representam os íons  $Mg^{2+}$

Acredita-se que a mutação do resíduo Q148, a mais frequente, interage com a adenosina terminal e a citosina pré-terminal da fita de DNA viral, diminuindo a suscetibilidade aos fármacos inibidores de integrase e também a atividade da própria enzima.<sup>15</sup> A segunda mutação mais comum, N155H, interfere diretamente na ligação da integrase com os íons metálicos, visto que N155 está localizado na base do sítio ativo e

realiza uma interação do tipo ligação hidrogênio com o aminoácido E152.<sup>15</sup>

A ocorrência de mutações que levam a resistência ao raltegravir pode estar associada aos altos níveis basais de RNA viral no plasma. Este fato pode ser evidenciado pelo grande número dessas mutações em populações de vírus encontradas em pacientes que possuem alta carga viral.<sup>45</sup>

Um estudo clínico realizado por Hatano e colaboradores em 79 pacientes tratados com inibidores de integrase, 73 usando raltegravir e 6 com elvitegravir, ratifica que as mutações associadas a resistência aos inibidores de integrase de maior ocorrência são Q148H/K/R, N155H e Y143R/H/C. Também foi observado que, entre os 29 indivíduos que apresentaram resistência, esta apareceu de forma gradual. Outro ponto importante é que mesmo com a redução da suscetibilidade aos fármacos, todos apresentaram diminuição da capacidade replicativa do vírus. Isto mostra que a terapia com estes inibidores pode conferir algum benefício num regime de tratamento que promove a supressão parcial da replicação viral.<sup>47</sup>

Outro dado interessante é que as mutações associadas ao uso do raltegravir, N155H e Q148H, podem conferir resistência cruzada para o elvitegravir;<sup>45</sup> mas as mutações E92Q e T66I, observadas com o uso do elvitegravir, não conferem resistência cruzada para o raltegravir.<sup>15</sup>

As mutações conhecidas para o raltegravir também foram observadas para o elvitegravir, tanto em cultura quanto nos pacientes. Isto impede sua utilização para a maioria dos vírus resistentes ao raltegravir. Alguns estudos demonstraram que apenas Y143C é suscetível ao elvitegravir.<sup>31</sup>

O dolutegravir tem apresentado potente atividade *in vitro* contra cepas de vírus resistentes ao raltegravir.<sup>45</sup> Embora nenhum dado sobre o aparecimento de resistência *in vivo* tenha sido relatado, alguns experimentos *in vitro* demonstraram que as mutações L1011, T124A e S153FY conferem resistência limitada ao dolutegravir.<sup>48</sup>

## 6. Conclusões

A inibição da enzima integrase como alvo no combate ao vírus HIV mostra-se promissora, uma vez que pode ser útil no tratamento de pacientes que apresentam resistência aos inibidores da transcriptase reversa e da protease, classes muito

exploradas nos últimos anos. A existência de apenas três fármacos aprovados pelo FDA e a resistência às terapias atualmente utilizadas, são fatores que estimulam a pesquisa e o desenvolvimento de novos fármacos dessa classe.

Além disso, a integração é uma etapa complexa do ciclo de replicação viral e novos detalhes desse processo têm sido elucidados regularmente. Logo, este novo alvo merece atenção especial, uma vez que pode ser a chave para uma inibição eficaz da replicação do vírus HIV.

## Referências Bibliográficas

- Engelman, A.; Cherepanov, P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights *Nature Reviews Microbiology* **2012**, *10*, 279. [CrossRef] [PubMed]
- Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <[http://www.who.int/topics/hiv\\_aids/en/](http://www.who.int/topics/hiv_aids/en/)>. Acesso em: 20/06/2013.
- Abbas, A. K.; Lichtman, A. H.; Pillai, S.; *Imunologia Celular e Molecular*, 6a. ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- Peçanha, E. P.; Antunes, O. A. C.; Tanuri, A. Estratégias farmacológicas para a terapia anti-AIDS. *Química Nova* **2002**, *25*, 1108. [CrossRef]
- Lahouassa, H.; Daddacha, W.; Hofmann, H.; Ayinde, D.; Logue, E. C.; Dragin, L.; Bloch, N.; Maudet, C.; Bertrand, M.; Gramberg, T.; Pancino, G.; Priet, S.; Canard, B.; Laguet, N.; Benkirane, M.; Transy, C.; Landau, N. R.; Kim, B.; Margottin-Goguet, F. SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates. *Nature Immunology* **2012**, *13*, 223. [CrossRef] [PubMed]
- Brasil, Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.aids.gov.br/pagina/aids-no-brasil>>. Acesso em: 20/06/2013.



- <sup>7</sup> Pinto, M. E.; Struchiner, C. J. A diversidade do HIV-1: uma ferramenta para o estudo da pandemia. *Cadernos de Saúde Pública* **2006**, *22*, 473. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>8</sup> Souza, M. V. N.; Almeida, M. V. Drogas anti-VIH: passado, presente e perspectivas futuras. *Química Nova* **2003**, *26*, 366. [CrossRef]
- <sup>9</sup> Hazuda, D. J. HIV integrase as a target for antiretroviral therapy. *Current Opinion in HIV & AIDS* **2012**, *7*, 383. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>10</sup> Hare, S.; Gupta, S. S.; Valkov, E.; Engelman, A.; Cherepanov, P. Retroviral integrase assembly and inhibition of DNA strand transfer. *Nature* **2010**, *464*, 232. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>11</sup> Nowotny, M. Retroviral integrase superfamily: the structural perspective. *EMBO Reports* **2009**, *10*, 144. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>12</sup> Davies, D. R.; Goryshin, I. Y.; Reznikoff, W. S.; Rayment, I. Three-Dimensional Structure of the Tn5 Synaptic Complex Transposition Intermediate. *Science* **2000**, *289*, 77. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>13</sup> Neamati, N.; *HIV-1 integrase: mechanism and inhibitor design*, 1a. ed., John Wiley & Sons, Inc.: New Jersey, 2011.
- <sup>14</sup> Arora, R.; Tchertanov, L. Em *An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxicology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications*; Baptista, G. R., eds.; InTech: Rijeka, 2013, cap. 15.
- <sup>15</sup> Blanco, J. L.; Varghese, V.; Rhee, S. Y.; Gatell, J. M.; Shafer, R. W. J. HIV-1 Integrase Inhibitor Resistance and Its Clinical Implications. *Journal of Infectious Diseases* **2011**, *203*, 1204. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>16</sup> Blanco, J. L.; Martinez-Picado, J. HIV integrase inhibitors in ART-experienced patients. *Current Opinion in HIV & AIDS* **2012**, *7*, 415. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>17</sup> Seo, B. I.; Uchil, B. R.; Okello, M.; Mishra, S.; Ma, X.; Nishonov, M.; Shu, Q.; Chi, G.; Nair, V. Discovery of a Potent HIV Integrase Inhibitor That Leads to a Prodrug with Significant anti-HIV Activity. *ACS Medicinal Chemistry Letters* **2011**, *2*, 877. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>18</sup> Deeks, S. G.; Kar, S.; Gubernick, S. I.; Kirkpatrick, P. Raltegravir. *Nature Reviews Drug Discovery* **2008**, *7*, 117. [CrossRef]
- <sup>19</sup> Maertens, G. N.; Hare, S.; Cherepanov, P. The mechanism of retroviral integration from X-ray structures of its key intermediates. *Nature* **2010**, *468*, 326. [PubMed]
- <sup>20</sup> Hare, S.; Vos, A. M.; Clayton, R. F.; Thuring, J. W.; Cummings, M. D.; Cherepanov, P. Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107*, 20057. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>21</sup> Crunkhorn, S. Trial watch: HIV integrase inhibitor-based regimen beats market leader. *Nature Reviews Drug Discovery* **2012**, *11*, 664. [PubMed]
- <sup>22</sup> Rogolino, D.; Carcelli, M.; Sechib, M.; Neamatic, N. Viral enzymes containing magnesium: Metal binding as a successful strategy in drug design. *Coordination Chemistry Reviews* **2012**, *256*, 3063. [CrossRef]
- <sup>23</sup> Johnson, T. W.; Tanis, S. P.; Butler, S. L.; Dalvie, D.; DeLisle, D. M.; Dress, K. R.; Flahive, E. J.; Hu, Q.; Kuehler, J. E.; Kuki, A.; Liu, W.; McClellan, G. A.; Peng, Q.; Plewe, M. B.; Richardson, P. F.; Smith, G. L.; Solowiej, J.; Tran, K. T.; Wang, H.; Yu, X.; Zhang, J.; Zhu, H. Design and Synthesis of Novel N-Hydroxy-Dihydronaphthyridinones as Potent and Orally Bioavailable HIV-1 Integrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 3393. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>24</sup> United States Food and Drug Administration. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/aboutfda/re>

- [portsmanualsforms/reports/ucm330859.pdf](#). Acesso em: 20/06/2013.
- <sup>25</sup> Brito, M. A. A Resistência aos Fármacos Anti-Retrovirais: O Caso da Transcriptase Reversa do HIV-1. *Revista Eletrônica de Farmácia* **2011**, 8, 88. [Link]
- <sup>26</sup> Brasil, Ministério da Saúde. Disponível em: <[http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/legislacao/2012/51074/nota\\_tecnica\\_3007\\_08\\_pdf\\_98314.pdf](http://www.aids.gov.br/sites/default/files/anexos/legislacao/2012/51074/nota_tecnica_3007_08_pdf_98314.pdf)>. Acesso em 20/06/2013.
- <sup>27</sup> Espeseth, A. S.; Felock, P.; Wolfe, A.; Witmer, M.; Grobler, J.; Anthony, N.; Egbertson, M.; Melamed, J. Y.; Young, S.; Hamill, T.; Cole, J. L.; Hazuda, D. J. HIV-1 integrase inhibitors that compete with the target DNA substrate define a unique strand transfer conformation for integrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2000**, 97, 11244. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>28</sup> Kawasuji, T.; Johns, B. A.; Yoshida, H.; Taishi, T.; Taoda, Y.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Fujiwara, T. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, 55, 8735. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>29</sup> Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2002**, 99, 6661. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>30</sup> Chemicalize.org. Disponível em: <<http://www.chemicalize.org/structure/#!mol=Elvitegravir>>. Acesso em 20/06/2013.
- <sup>31</sup> Quashie, P. K.; Sloan, R. D.; Wainberg, M. A. Novel therapeutic strategies targeting HIV integrase. *BMC Medicine* **2012**, 10, 34. [CrossRef]
- <sup>32</sup> Di Santo, R. Inhibiting the HIV Integration Process: Past, Present, and the Future. *Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, 57, 539 [CrossRef] [PubMed]
- <sup>33</sup> Walmsley, S. L.; Antela, A.; Clumeck, N.; Duiculescu, D.; Eberhard, A.; Gutiérrez, F.; Hocqueloux, L.; Maggiolo, F.; Sandkovsky, U.; Granier, C.; Pappa, K.; Wynne, B. Min, S.; Nichols, G. Dolutegravir plus abacavir-lamivudine for the treatment of HIV-1 infection. *The New England Journal of Medicine*, **2013**, 369, 1807. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>34</sup> Serrao, E.; Debnath, B.; Otake, H.; Kuang, Y.; Christ, F.; Debyser, Z.; Neamati, N. Fragment-Based Discovery of 8-Hydroxyquinoline Inhibitors of the HIV-1 Integrase–Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75 (IN–LEDGF/p75) Interaction. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 2311. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>35</sup> Hombrouck, A.; Rijck, J. D.; Hendrix, J.; Vandekerckhove, L.; Voet, A.; Maeyer, M. D.; Witvrouw, M.; Engelborghs, Y.; Christ, F.; Gijssbers, R.; Debyser, Z. Virus Evolution Reveals an Exclusive Role for LEDGF/p75 in Chromosomal Tethering of HIV. *PLoS Pathogens* **2007**, 3, e47. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>36</sup> Pandey, K. K.; Sinha, S.; Grandgenett, D. P. Transcriptional Coactivator LEDGF/p75 Modulates Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase-Mediated Concerted Integration. *Journal of Virology* **2007**, 81, 3969. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>37</sup> Jin, H.; Cai, R. Z.; Schacherer, L.; Jabri, S.; Tsiang, M.; Fardis, M.; Chen, X.; Chena, J. M.; Kima, C. U. Design, synthesis, and SAR studies of novel and highly active tri-cyclic HIV integrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, 16, 3989. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>38</sup> Kawasuji, T.; Johns, B. A.; Yoshida, H.; Yoshida, H.; Weatherhead, J. G.; Akiyama, T.; Taishi, T.; Taoda, Y.; Mikamiyama-Iwata, M.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Tanimoto, N.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Garvey, E. P.; Fujiwara, T. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors. 2. Bi- and Tricyclic Derivatives Result in Superior Antiviral and Pharmacokinetic Profiles. *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, 56, 1124. [CrossRef] [PubMed]

- <sup>39</sup> Johns, B. A.; Kawasuji, T.; Weatherhead, J. G.; Taishi, T.; Temelkoff, D. P.; Yoshida, H.; Akiyama, T.; Taoda, Y.; Murai, H.; Kiyama, R.; Fuji, M.; Tanimoto, N.; Jeffrey, J.; Foster, S. A.; Yoshinaga, T.; Seki, T.; Kobayashi, M.; Sato, A.; Johnson, M. N.; Garvey, E. P.; Fujiwara T. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors 3. A Diastereomeric Approach to Chiral Nonracemic Tricyclic Ring Systems and the Discovery of Dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) *Journal of Medicinal Chemistry* **2013**, *56*, 5901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>40</sup> Plewe, M. B.; Butler, S. L.; Dress, K. R.; Hu, Q.; Johnson, T. W.; Kuehler, J. E.; Kuki, A.; Lam, H.; Liu, W.; Nowlin, D.; Peng, Q.; Rahavendran, S. V.; Tanis, S. V.; Tran, K. T.; Wang, H.; Yang, A.; Zhang, J. Carbamoyl Pyridone HIV-1 Integrase Inhibitors 3. A Diastereomeric Approach to Chiral Nonracemic Tricyclic Ring Systems and the Discovery of Dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, *52*, 7211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>41</sup> Tanis, S. V.; Plewe, M. B.; Johnson, T. W.; Butler, S. L.; Dalvie, D.; DeLisle, D.; Dress, K. R.; Hu, Q.; Huang, B.; Kuehler, J. E.; Kuki, A.; Liu, W.; Peng, Q.; Smith, G. L.; Solowiej, J.; Tran, K. T.; Wang, H.; Yang, A.; Yin, C.; Yu, X.; Zhang, J.; Zhu, H. Azaindole N-methyl hydroxamic acids as HIV-1 integrase inhibitors-II. The impact of physicochemical properties on ADME and PK. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2010**, *20*, 7429. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>42</sup> Grobler, J. A.; Stillmock, K. A.; Hazuda, D. J. Scintillation proximity assays for mechanistic and pharmacological analyses of HIV-1 integration. *Methods* **2009**, *47*, 249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>43</sup> Sangeetha, B.; Muthukumaran, R.; Amutha, R. Pharmacophore modelling and electronic feature analysis of hydroxamic acid derivatives, the HIV integrase inhibitors. *SAR and QSAR in Environmental Research* **2013**, *24*, 753. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>44</sup> Caly, L.; Wagstaff, K. M.; Jans, D. A. Nuclear trafficking of proteins from RNA viruses: Potential target for antivirals? *Antiviral Research* **2012**, *95*, 202. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>45</sup> Kuritzkes, D. R. Drug resistance in HIV-1. *Current Opinion in Virology* **2011**, *1*, 582. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>46</sup> Mesplède, T.; Quashie, P. K.; Wainberg, M. A. Resistance to HIV integrase inhibitors. *Current Opinion in HIV & AIDS* **2012**, *7*, 401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>47</sup> Hatano, H.; Lampiris, H.; Fransen, S.; Gupta, S.; Huang, W.; Hoh, R.; Martin, J. N.; Lalezari, J.; Bangsberg, D.; Petropoulos, C.; Deeks, S. G. Evolution of integrase resistance during failure of integrase inhibitor-based antiretroviral therapy. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* **2010**, *54*, 389. [[PubMed](#)]
- <sup>48</sup> Saladini, F.; Meini, G.; Bianco, C.; Monno, L.; Punzi, G.; Pecorari, M.; Borghi, V.; Di Pietro, M.; Filice, G.; Gismondo, M. R.; Micheli, V.; Penco, G.; Carli, T.; De Luca, A.; Zazzi, M. Prevalence of HIV-1 integrase mutations related to resistance to dolutegravir in raltegravir naïve and pretreated patients. *Clinical Microbiology and Infection* **2012**, *18*, E428. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]