

La actividad RNasa H de la retrotranscriptasa del VIH como diana terapéutica.

Javier Martínez del Río^{1, 2, a}, Luis Menéndez Arias^{2, b}

1. Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España. 2. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (CSIC-UAM) Madrid, España.

a. javier.martinezr@edu.uah.es b. lmenendez@cbm.csic.es

Palabras clave: VIH; ribonucleasa H; retrotranscriptasa; inhibidores múltiples; fármacos antivirales

Resumen

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un gran problema de salud a nivel mundial. Actualmente se dispone de fármacos antirretrovirales que controlan la infección, pero su efectividad a largo plazo está comprometida por su toxicidad y la aparición de resistencias. Por ello es importante identificar y explotar nuevas dianas terapéuticas. En este trabajo se han examinado varios compuestos conocidos por afectar a la actividad ribonucleasa H (RNasa H) de la retrotranscriptasa (RT) viral, pues es una diana no explotada y que ofrece la posibilidad de desarrollar inhibidores que actúen sobre múltiples dianas, dada la similitud de su sitio activo con el de la integrasa viral y por su localización próxima al dominio DNA polimerasa de la RT. Se han realizado diferentes ensayos enzimáticos con oligonucleótidos marcados que han permitido confirmar la inhibición de la actividad RNasa H por distintos compuestos y evaluar sus efectos sobre la DNA polimerasa e integrasa virales. Todos ellos mostraron eficacia a nivel micro- y submicromolar en la inhibición de la actividad RNasa H, mientras que para las otras dos actividades sus efectos fueron más modestos. Solo uno de los compuestos (WX-II-25) ha mostrado ser un buen inhibidor dual, con potencias similares para las actividades RNasa H e integrasa (IC₅₀ de 0,72 y 1 μ M respectivamente), mientras que el compuesto SL-6h ha mostrado capacidad de inhibir las tres actividades enzimáticas, aunque con potencias peores (IC₅₀ de 1,85 μ M para la actividad RNasa H y superior a 10 μ M para las otras dos). Aun así, estos compuestos representan buenos candidatos para continuar con su investigación. En el futuro sería conveniente confirmar su capacidad inhibitoria en ensayos celulares y evaluar en detalle su unión a los enzimas, lo cual permitirá utilizarlos como referencia para el desarrollo de inhibidores múltiples potentes que puedan llegar a la clínica.

Cita: Martínez del Río, Javier; Menéndez Arias, Luis (2020) La actividad RNasa H de la retrotranscriptasa del VIH como diana terapéutica. *dianas* 9 (2): e202009fa11. ISSN 1886-8746 (electronic) [journal.dianas.e202009fa11](http://www3.uah.es/dianas?e202009fa11) <http://www3.uah.es/dianas?e202009fa11>. URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Copyright: © Martínez-del-Río J, Menéndez-Arias L. Algunos derechos reservados. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

Introducción

Desde que fue descrito por primera vez a comienzos de los años 80, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ha infectado a más de 75 millones de personas, de las cuales casi la mitad (unos 32 millones) han fallecido a causa de la patogenicidad provocada por el virus. Actualmente se estima que hay 38 millones de individuos infectados, lo cual representa al 0,8% de los adultos entre 15 y 49 años de la población mundial [1]. Estas cifras tan altas de infectados junto con su amplia distribución geográfica alrededor del mundo hacen que la infección por el VIH pueda ser calificada como una de las mayores pandemias de la historia.

Estructura del VIH

En función de su diversidad genética, el VIH puede clasificarse en dos tipos: el VIH-1 es el más extendido, mientras que el VIH-2 es frecuente en algunas regiones de África. Ambos se caracterizan por su relativa simplicidad, pues su genoma cuenta únicamente con 9 genes que codifican para 16 proteínas [2, 3]. Los estudios descritos en este trabajo se refieren a una variante prototípica del VIH-1. A grandes rasgos, los viriones del VIH tienen forma esférica de 80-150 nm de diámetro [4]. En su interior se hallan tres enzimas esenciales para su multiplicación: la proteasa, la retrotranscriptasa (RT) y la integrasa. Junto a ellas se encuentra el genoma viral, compuesto por dos cadenas idénticas de RNA (ssRNA) de cadena positiva, que están rodeadas de proteína de la nucleocápsida. El complejo anterior está incluido en una cápsida formada por proteína p24. Una proteína estructural, p17, tapiza la cara interna de la envoltura viral, constituida por una bicapa lipídica en la que se insertan la proteína de superficie gp120 y la transmembranal (gp41) [5].

Ciclo del VIH

El VIH infecta principalmente a los linfocitos T CD4+, los cuales juegan un papel importante en la respuesta inmune adaptativa, coordinando la activación de otras células del sistema inmunitario. El ciclo replicativo del virus se suele dividir en dos grandes fases: la **fase temprana**, que comprende desde que el virión se une a la célula hospedadora hasta que se retrotranscribe su ssRNA para conseguir DNA de doble cadena (dsDNA) que se integra en el genoma celular [6, 7]; y la **fase tardía**, la cual engloba todos los procesos desde la expresión génica del DNA viral hasta la producción y liberación de nuevos viriones [2, 6, 8].

Factores de restricción del huésped

Las células humanas han desarrollado mecanismos de defensa frente al VIH. Son capaces de detectar al virus a través de receptores tipo “Toll” (TLRs) y sensores citosólicos de dsDNA [9–11], los cuales reconocen principalmente los ácidos nucleicos virales (ssRNA, heterodúplex RNA/DNA y dsDNA fuera del núcleo celular). Este reconocimiento induce una cascada de señalización que, en última instancia, activa la transcripción de interferones, los cuales inducen la sobre-expresión de distintos genes, entre los que encontramos factores de restricción antivirales (RFs). Estos RFs son proteínas que atacan a distintos pasos del ciclo viral, constituyendo una defensa innata que trata de evitar la infección, pero a su vez han influido en el VIH, forzando que este desarrolle proteínas específicas para contrarrestar las defensas celulares, permitiendo que la infección no se detenga [11]. Entre los RFs más estudiados y conocidos se encuentran TRIM5 α , SAMHD1 y APOBEC3, siendo los dos últimos los que inciden más directamente en la retrotranscripción [11, 12]. **SAMHD1** lo consigue reduciendo los niveles citoplasmáticos de nucleótidos, ya que es un enzima que convierte dNTPs en sus correspondientes desoxinucleósidos y trifosfato inorgánico [13, 14]; mientras que **APOBEC3** bloquea el ciclo del virus a través de su actividad deaminasa, que convierte las dCs de la hebra negativa de DNA en dUs [15].

Terapia antirretroviral

En ausencia de tratamiento, la infección por VIH provoca una destrucción sistémica de linfocitos T y otras células inmunes. Esta situación es responsable de un progresivo deterioro de la respuesta inmune mediada por células que conduce a la aparición de infecciones oportunistas y distintos tipos de tumores, estado que se conoce como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) [16, 17].

Actualmente no existe ninguna cura ni vacuna, pero el desarrollo de fármacos antirretrovirales ha conseguido reducir la morbilidad y la mortalidad de los pacientes. Así pues, si el paciente es diagnosticado en las etapas tempranas de la enfermedad y tiene acceso al tratamiento adecuado, se reduce la carga viral y es poco probable el desarrollo de SIDA [5]. Hay alrededor de 30 fármacos antirretrovirales aprobados, los cuales se agrupan en 6 clases según su mecanismo de acción: 1) nucleósidos/nucleótidos inhibidores de la retrotranscriptasa (NRTIs): son análogos de nucleósidos o nucleótidos sin hidroxilo en el grupo 3' de la ribosa que al incorporarse en el DNA bloquean su síntesis; 2) inhibidores no nucleosídicos de la retrotranscriptasa (NNRTIs): se unen a la RT y la inhiben mediante cambios alostéricos que afectan a la unión de la proteína al molde-iniciador; 3) inhibidores de la proteasa: impiden el procesamiento proteolítico de las poliproteínas precursoras del virus; 4) inhibidores de transferencia de banda de la integrasa: evitan que se incorpore el DNA proviral (dsDNA) en el genoma celular; 5) inhibidores de fusión: se unen a gp41 para bloquear la fusión de la envoltura viral con la membrana plasmática de las células CD4+; y 6) inhibidores de entrada: se unen al receptor CD4 o al receptor CCR5 de las células, evitando que puedan interactuar con gp120 y bloqueando así la entrada del virus [18].

Hoy en día, el régimen de tratamiento más empleado se conoce como terapia de combinación, la cual consiste en la administración de varios de los antivirales mencionados anteriormente: normalmente dos NRTIs y un NNRTI (o en su lugar un inhibidor de la proteasa o de la integrasa). Se desarrolló hace algo más de 20 años y, desde entonces, ha demostrado ser un tratamiento muy eficaz, especialmente comparándolo con el uso de un único antiviral, como se hacía a finales de los 80 y principios de los 90 [19, 20]. Sin embargo, la terapia de combinación presenta varios inconvenientes [19]. El primero de ellos es que no es un tratamiento curativo. Hay casos en los que el tratamiento consigue reducir la carga viral a niveles indetectables, pero el virus sigue estando dentro del organismo, pues se encuentra integrado en células inactivas transcripcionalmente, las cuales constituyen el denominado “reservorio latente” [21], causando que el virus aparezca de nuevo si el paciente deja de recibir tratamiento. Otro problema importante es la toxicidad asociada. Aparte de los efectos secundarios presentes en todos los medicamentos, la terapia de combinación tiene la desventaja de que supone combinar varios fármacos y es de por vida, por lo que la toxicidad a largo plazo también debe considerarse [22]. Por otra parte, a pesar de que la terapia de combinación ataca a varias dianas a la vez y se limita la aparición de resistencias, estas siguen siendo un problema importante. Por esta razón, los pacientes deben someterse a revisiones periódicas para evaluar la eficacia del tratamiento y cambiar el cóctel de fármacos si se detectan resistencias [23].

Nuevas terapias

Más allá del tratamiento con antirretrovirales, se han realizado grandes esfuerzos para encontrar nuevas aproximaciones que permitan un mejor tratamiento e, incluso, curar la enfermedad. Hasta el momento, las únicas curaciones descritas han sido las del conocido paciente berlinés [24] y la del reciente paciente de Londres [25]. En estos casos se consiguió la cura porque ambos sujetos padecían linfomas y necesitaron un trasplante de médula ósea, con la particularidad de que en ambos casos el donante era homocigoto para la mutación CCR5Δ32, una deleción de 32 pares de bases en el gen CCR5 que otorga resistencia a la entrada del VIH a las células. Estas curaciones han abierto la esperanza de encontrar una terapia curativa. Precisamente, se han llegado a proponer estrategias similares a las anteriores, basándose en el trasplante de células madre con la mutación CCR5Δ32 [26]. Pero también se han explorado otras muchas posibilidades como pueden ser la terapia génica para alterar factores de restricción del huésped o inactivar el provirus, terapia con anticuerpos o vacunas [26–28]. De cara al futuro, por tanto, resultaría de gran interés un abordaje multidisciplinar de la infección por VIH: desde la prevención a través de vacunas hasta el hallazgo de una cura, pasando por una mejora de las terapias actuales y la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas.

Dominio ribonucleasa H

El dominio ribonucleasa H (RNasa H) de la RT es una diana bastante interesante de cara al desarrollo de nuevos antivirales, pues es una diana no explotada. La RT del VIH-1 es una proteína heterodimérica, formada por las subunidades p66 y p51 (Figura 1), y que cuenta con dos sitios catalíticos esenciales para su actividad: el dominio RNasa H y el dominio DNA polimerasa. El dominio RNasa H se encuentra en la subunidad p66, con su centro activo a unos 14-18 nucleótidos de distancia del sitio catalítico de la actividad DNA polimerasa [29]. La actividad RNasa H es fundamental en el ciclo del virus. Consta de una actividad endonucleasa que hidroliza la hebra de RNA en los complejos heterodúplex RNA/DNA, los cuales se forman como paso intermedio en la retrotranscripción del ssRNA al dsDNA viral. Además, la actividad RNasa H es necesaria en otros pasos de la retrotranscripción, tales como la degradación del cebador de tRNA durante la síntesis de la cadena positiva de DNA y está involucrada en la generación de secuencias ricas en purina (PPTs), también necesarios para la síntesis de la hebra positiva de DNA [30].

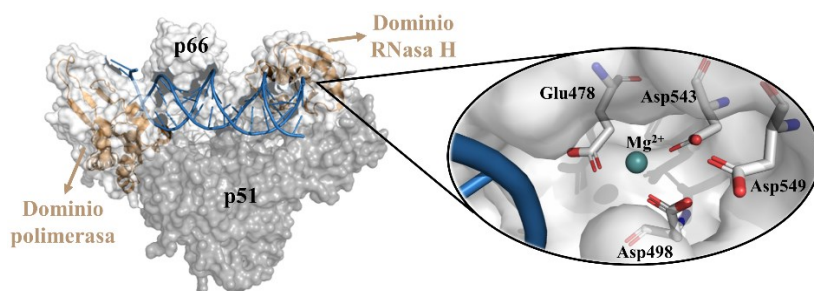


Figura 1.- Estructura de la RT del VIH-1. A la izquierda se muestra el heterodímero p66/p51 que compone la RT unido a una doble hebra de DNA, mientras que a la derecha se observa en detalle el sitio catalítico del dominio RNasa H. El diagrama ha sido realizado con PyMOL a partir de las coordenadas 3KLF de Protein Data Bank.

El sitio catalítico de la RNasa H contiene cuatro aminoácidos clave para su mecanismo de acción, que se encuentran conservados en esta familia de proteínas. Forman el motivo DEDD, integrado por Asp443, Glu478, Asp498 y Asp549 (ubicación mostrada en Figura 1). Estos aminoácidos se asocian a uno o dos cationes divalentes (comúnmente Mg²⁺), los cuales son necesarios para el corte del enlace fosfodiéster entre los ribonucleótidos de la cadena de RNA [30].

Inhibición de la actividad RNasa H

El dominio RNasa H no solo resulta interesante por ser una diana no explotada, sino también porque ofrece la posibilidad de desarrollar inhibidores duales o incluso múltiples, es decir, que estén dirigidos a varias dianas. Esto es posible fundamentalmente por dos características: la primera sería que el sitio activo de la RNasa H se encuentra próximo al dominio DNA polimerasa de la RT, por lo que sería posible desarrollar inhibidores que afecten a ambos sitios activos, por ejemplo, mediante inhibidores alostéricos que afecten a toda la proteína o que alteren a la trayectoria de los heterodúplex RNA/DNA. Y una segunda característica que sería la similitud estructural entre el sitio activo de la RNasa H y el de la integrasa viral, que también es una metaloenzima que cuenta con tres aminoácidos altamente conservados en su sitio catalítico, similar al motivo DEDD de la RNasa H: Asp64, Asp116 y Glu152 (motivo DDE) [30].

Además, en los últimos años se han desarrollado distintos compuestos que han mostrado inhibición de la actividad RNasa H y otras dianas (descritos por Tramontano *et al.* [30]). Estos inhibidores se clasifican en dos grupos según como afecten a la RNasa H: inhibidores del sitio activo y alostéricos [31]. Los

inhibidores del sitio activo actúan como quelantes de los metales divalentes presentes en el bolsillo catalítico y, debido a su similitud, este tipo de inhibidores tienen el potencial de inhibir también el sitio activo de la integrasa. Todos los inhibidores descubiertos muestran una gran variedad estructural, pero tienen en común la siguiente distribución: una parte hidrofóbica, una secuencia conectora y un farmacóforo compuesto por tres oxígenos, los cuales quelan los metales divalentes [32, 33]. Por otra parte, los **inhibidores alostéricos** actúan uniéndose a bolsillos cercanos al sitio catalítico de la RNasa H y afectan a su actividad mediante cambios conformacionales, que también pueden influir en el dominio de la DNA polimerasa [30].

En este trabajo se han examinado compuestos conocidos por afectar a la actividad RNasa H del VIH y se ha evaluado si afectan a otras actividades enzimáticas: la DNA polimerasa y la integrasa viral. Actualmente existen inhibidores duales de la RNasa H y cada una de las otras dos actividades, pero ninguno ha llegado a clínica, sobre todo por su toxicidad [30]. Sería de gran utilidad el descubrimiento de nuevos inhibidores duales o incluso triples que ataquen con gran potencia a las tres dianas. Esto podría ayudar a resolver varios de los problemas que presenta la actual terapia antirretroviral. En primer lugar, el simple hecho de descubrir nuevos antivirales es de gran utilidad, pues representan alternativas para aquellos casos en los que se desarrollan resistencias. Además, el hecho de que el inhibidor sea múltiple también disminuiría la probabilidad de que se desarrollen resistencias, pues es más difícil que el virus desarrolle resistencia simultánea en varias dianas que en una sola.

Por último, a modo especulativo, contar con un inhibidor múltiple podría incluso conseguir reducir el cóctel de antivirales que se administra. Recientemente se ha visto que la terapia con un NRTI (lamivudina) y un inhibidor de la integrasa (dolutegravir) podría ser un tratamiento adecuado para pacientes avirémicos (sin niveles detectables de VIH tras seguir la terapia convencional) [34]; así pues, no sería descabellado pensar que también se podría administrar una terapia con un inhibidor dual y otro antiviral o un único inhibidor triple. Debemos recordar que la terapia antirretroviral ha de administrarse toda la vida, por lo que tomar uno o dos antivirales en lugar de tres podría disminuir los efectos secundarios y la toxicidad a largo plazo.

Materiales y métodos

Expresión y purificación de enzima RT

Una variante silvestre de la RT del VIH-1 grupo M subtipo B cepa BH10 (BH10_WT) disponible en el laboratorio se expresó y purificó tal como se ha descrito con anterioridad [35, 36]. Brevemente, la subunidad p66 de la RT y la proteasa viral se co-expresan en *Escherichia coli* XL1 Blue para obtener el heterodímero p66/p51. A continuación, se lisan las células y se purifica la proteína por cromatografía de intercambio iónico seguida de una cromatografía de afinidad de níquel y posterior diálisis frente a solución tampón Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), conteniendo NaCl 25 mM, EDTA 1 mM y 10% (w/v) de glicerol. Finalmente, la enzima se concentra en Centricon/Centriprep, se evalúa su pureza en geles de poliacrilamida y SDS y se determina la concentración de enzima activa mediante ensayos bioquímicos [37].

Inhibidores

Los compuestos utilizados (Figura 2) han sido suministrados por el laboratorio de los Dres. Peng Zhan y Xinyong Liu (Shandong University, Jinan, China), y sus características se han descrito en las publicaciones de Sun *et al.* [32] y Gao *et al.* [38].

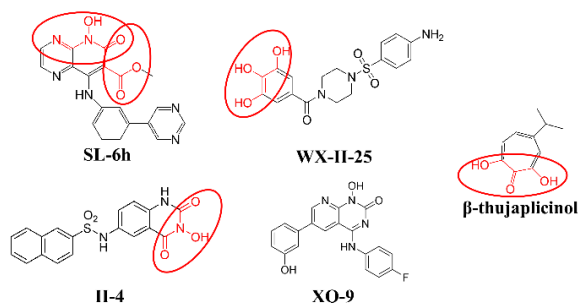


Figura 2.- Inhibidores de la actividad RNasa H evaluados en este trabajo. Estructura de los inhibidores examinados (SL-6h, WX-II-25, II-4 y XQ-9) y de β -thujaplicinol, inhibidor selectivo de la RNasa H utilizado como referencia en los ensayos. Se han señalado en rojo los farmacóforos con actividad quelante. SL-6h cuenta con dos configuraciones quelantes distintas señaladas por los dos círculos rojos.

Complejos molde/iniciador

Para la preparación de sustratos para evaluar las actividades RNasa H y DNA polimerasa se utilizaron oligonucleótidos sintéticos obtenidos de Sigma, cuyas secuencias se detallan en la Tabla 1.

Nombre	5'	Secuencia	3'
31T (RNA)	5'	UUUUUUUUUAGGAUACAUUGGUUAAAGUUA	3'
21P (DNA)	3'	CCTATGTATACCAATTCATA	5'
PCIS-87 (DNA)	5'	CCGTTCTATAACGGTATGATGGTAAACATTCTTGAGT	3'
PCIS-94 (RNA)	3'	ACCAUUUGUAAGAACUCACG	5'

Tabla 1.- Complejos molde/iniciador empleados. Se ha representado con una estrella amarilla el marcaje con fósforo radiactivo en el extremo 5' realizado en los oligonucleótidos 31T y PCIS-87.

Los oligonucleótidos 31T y PCIS-87 (Tabla 1) se marcaron en el extremo 5' con fósforo radiactivo. La reacción de marcado consistió en la incubación de 1 µCi de [γ³²P]ATP (3000 Ci/mmol, Perkin Elmer) y 5 U de polinucleótido quinasa del fago T4 (New England BioLabs) durante 45 minutos a 37°C, en presencia de tampón Tris-HCl 70 mM (pH 7,5), que contenía MgCl₂ 10 mM y DTT 5 mM. A continuación, se inactivó la quinasa del fago T4 mediante una incubación a 90°C durante 10 min. La correcta incorporación del fosfato radiactivo se confirmó mediante una cromatografía de capa fina en placas de PEI-celulosa (TLC, 20x20 cm; Merck) en presencia de Na₂HPO₄ 0,5 M como fase móvil. El resultado de la cromatografía fue visualizado utilizando placas fotoestimulables 2040S y un lector BAS-1500 (Fuji).

Posteriormente, se prepararon los complejos molde/iniciador con los oligonucleótidos marcados anteriormente. Las condiciones de hibridación variaron en función del híbrido. Así, para el complejo 31T/21P se mezclaron el oligonucleótido 31T marcado y 21P a una concentración 7 veces superior en presencia de una solución con NaCl 50 mM y Tris-HCl 50 mM (pH 8,0). Por otra parte, para el híbrido PCIS-87/PCIS-94 se mezclaron el oligonucleótido PCIS-87 marcado, el mismo oligonucleótido frío (sin marcar) a una concentración 11 veces superior y el oligonucleótido PCIS-94 a una concentración 48 veces superior al PCIS-87 marcado; todo ello en presencia de NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM. En todos los casos, tras la adición de los reactivos anteriores, estos fueron incubados a 100°C durante 4 minutos y se dejaron enfriar lentamente a temperatura ambiente. Por último, los híbridos obtenidos fueron diluidos a la concentración deseada para los ensayos posteriores en solución tampón 550 mM Hepes (pH 7,0), conteniendo NaCl 150 mM y acetato de magnesio 150 mM.

Inhibición de la actividad RNasa H

Se utilizó el complejo 31T/21P (Tabla 1), con el oligonucleótido 31T marcado radiactivamente. La mezcla de reacción contó con los siguientes componentes: complejo molde/iniciador 25 nM, enzima RT 85 nM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, solución tampón Tris-HCl (pH 8,0), dimetilsulfóxido (DMSO) 5% y el inhibidor a evaluar disuelto en DMSO 50%; todo ello en un volumen final de 21 µL.

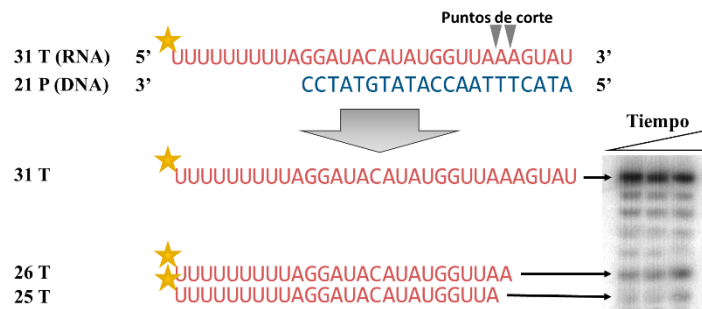


Figura 3.- Fundamentos del ensayo de inhibición de la actividad RNasa H. Si la RT no se encuentra inhibida, se asocia al complejo 31T/21P y produce un tipo de corte denominado *DNA 3'-end directed*, en el cual el dominio DNA polimerasa se asocia al extremo 3' de la cadena de DNA 21P y el dominio RNasa H (situado a unos 14-18 pares de bases) es capaz de cortar el RNA 31T en las posiciones -25 y -26. Los productos de corte pueden ser cuantificados en un gel de electroforesis. Cuanto menor sea la inhibición de la actividad RNasa H, mayor es la cantidad de productos cortados con respecto al 31T intacto. La estrella amarilla representa el marcaje radiactivo en el extremo 5' del oligonucleótido 31T.

En primer lugar, se preincubó una mezcla de 19 µL con todos los reactivos salvo el complejo molde iniciador a 37°C durante 5 minutos. A continuación, la reacción fue iniciada mediante la adición de 2 µL de complejo molde/iniciador y se tomaron alícuotas de la mezcla de reacción a distintos tiempos (15, 30 y 90 segundos), las cuales fueron mezcladas en igual volumen de solución de parada (ácido etilendiaminotetraacético 10 mM en 90% formamida conteniendo xilencianol 3 mg/ml y azul de bromofenol 3 mg/ml) para detener la reacción. Los productos de reacción fueron separados en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida y urea, y se visualizaron y cuantificaron mediante el empleo de placas fotoestimulables 2040S y un lector BAS-1500 (Fuji), utilizando el software

TINA versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania). Ejemplo indicado en la Figura 3.

La inhibición de cada compuesto se calculó mediante la evaluación de la cantidad relativa del oligonucleótido 31T cortado con respecto a la cantidad de oligonucleótido intacto (corte relativo), y comparada con el corte relativo en ausencia de compuestos inhibidores. Los valores de concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}) de cada compuesto se hallaron mediante interpolación en las curvas de dosis-respuesta correspondientes.

Inhibición de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA

Se empleó el complejo molde/iniciador PCIS-87/PCIS-94, con el iniciador PCIS-87 marcado radiativamente (Tabla 1). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 21 μ L, conteniendo complejo molde/iniciador 30 nM, enzima RT 7-14 nM, dGTPs 25 μ M, dCTPs 25 μ M, solución tampón Hepes pH 7,0 (conteniendo 15 mM NaCl, acetato de magnesio 15 mM, acetato potásico 130 mM, ditiotreitól 1 mM y 5% (w/v) polietilenglicol (PEG) 6000 y el inhibidor a evaluar disuelto en DMSO 50%.

En primer lugar se preincubó durante 5 min a 37°C una solución de 18,9 μ L que contenía el complejo molde/iniciador, la RT, el buffer y el inhibidor correspondiente. A continuación, la reacción de polimerización se inició añadiendo 2,1 μ L de los dNTPs diluidos en el mismo buffer. Se tomaron alícuotas a distintos tiempos (30, 60 y 120 s, y 10 min) y se mezclaron con un volumen igual de la solución de parada utilizada en los ensayos de actividad RNasa H. Los productos de reacción se separaron en condiciones desnaturalizantes en geles de poliacrilamida y urea, y se visualizaron y cuantificaron mediante el empleo de placas fotoestimulables 2040S y un lector BAS-1500 (Fuji), utilizando el software TINA versión 2.09 (Raytest Isotopenmessgerate GmbH, Staubenhardt, Alemania). Ejemplo indicado en la Figura 4.

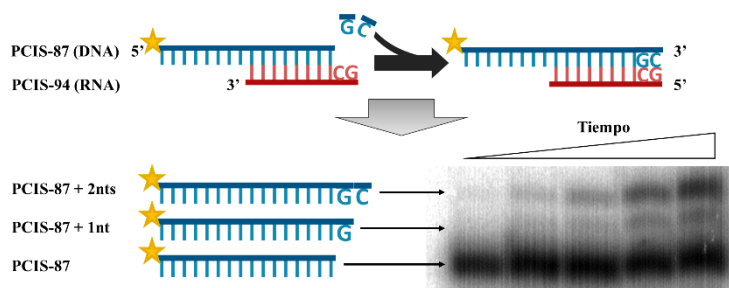


Figura 4.- Fundamentos del ensayo de inhibición de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA. Si la RT no se encuentra inhibida, se asocia al complejo PCIS-87/PCIS-94 y es capaz de elongar el oligonucleótido PCIS-87 mediante la adición de 2 nucleótidos. Los productos elongados pueden ser cuantificados en un gel de electroforesis. Cuanto menor sea la inhibición de la actividad polimerasa, mayor es la cantidad de productos elongados con respecto al PCIS-87 intacto. La estrella amarilla representa el marcaje radiactivo en el extremo 5' del oligonucleótido PCIS-87.

La inhibición de cada compuesto se calculó mediante la evaluación de la cantidad relativa de cebador elongado con respecto a cebador sin elongar (elongación relativa), y comparada con la elongación relativa en ausencia de compuestos inhibidores. Los valores IC_{50} de cada compuesto se hallaron mediante interpolación en las curvas de dosis-respuesta correspondientes.

Inhibición de la actividad integrasa

La obtención de la enzima integrasa y los ensayos de inhibición de su actividad han sido realizados por personal del laboratorio dirigido por el doctor Luis Menéndez Arias [32]. La enzima integrasa cuenta principalmente con tres actividades: procesado de 3', transferencia de banda y desintegración. En este trabajo se muestran los datos de inhibición de distintos compuestos sobre la transferencia de banda, es decir, la actividad de la integrasa que une covalentemente el DNA viral al DNA de la célula hospedadora.

Resultados

Inhibición de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA

Todos los compuestos evaluados muestran una débil inhibición de la actividad polimerasa. Comparando los porcentajes de inhibición de cada compuesto a 50 μ M, SL-6h es el inhibidor más potente, pues muestra un 30,3 % \pm 10,7 de inhibición, superior a la ofrecida por WX-II-25 (<15 %), II-4 (18,9 % \pm 11,4) y XQ-9 (22,1 % \pm 9,1). Hay que tener en cuenta que la desviación típica de los valores de inhibición

es relativamente elevada, por lo que las diferencias entre SL-6h y los inhibidores II-4 y XQ-9 no serían significativas. En la Figura 5 se muestran, a modo de ejemplo, los resultados obtenidos para SL-6h.

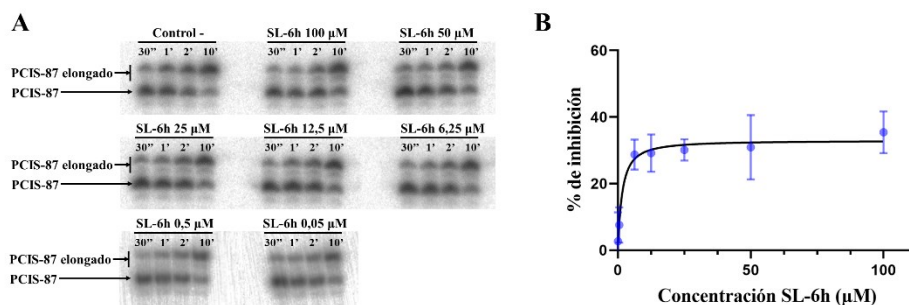


Figura 5.- Inhibición para SL-6h de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA. (A) Separación electroforética del cebador PCIS-87 intacto y PCIS-87 elongado. (B) Curva dosis-respuesta para la inhibición. Se representan los valores medios de inhibición para los tiempos 30, 60 y 90 s \pm la desviación estándar como barras de error (n=3).

Si comparamos la elongación relativa a los 10 minutos (Figura 5A), se aprecia que existe una mayor cantidad de cebador elongado en el control negativo con respecto a las distintas concentraciones del inhibidor. Y lo mismo sucede si se comparan el resto de tiempos. Esto es indicativo de que SL-6h inhibe la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA, siendo mayor la inhibición cuanto mayor sea su concentración. Sin embargo, esta inhibición es bastante débil, pues la cantidad de cebador elongado, a pesar de ser menor, no difiere mucho con respecto al control. Todos estos datos fueron cuantificados para calcular la curva dosis-respuesta correspondiente (Figura 5B). En ella se puede apreciar que la inhibición no fue superior al 50% en ninguna de las concentraciones evaluadas. Sería necesario realizar ensayos con un rango de concentraciones mayor para determinar con exactitud el IC_{50} , pero en cualquier caso la potencia inhibidora obtenida se considera baja.

Inhibición de la actividad RNasa H y la actividad integrasa

Los datos de inhibición de la actividad RNasa H y la actividad integrasa se muestran en la Tabla 2, donde se integran junto con los datos de inhibición de la actividad polimerasa explicados anteriormente.

Inhibidor	IC_{50} (μ M)		
	RDDP	RNasa H	INST
β -thujaplicinol	> 100	$1,98 \pm 0,22$	>100
SL-6h	> 50 (30,3 % \pm 10,7)	$1,85 \pm 0,60$	$10,85 \pm 2,22$
WX-II-25	> 50 (<15 %)	$0,72 \pm 0,07$	$\sim 1,0$
II-4	> 50 (18,9 % \pm 11,4)	$0,41 \pm 0,13$	-
XQ-9	> 50 (22,1 % \pm 9,1)	$0,71 \pm 0,13$	-

Tabla 2.- Actividad inhibitoria de compuestos dirigidos contra el centro activo de la RNasa H. Los valores indicados corresponden a la media \pm desviación estándar, obtenida a partir de al menos 2 experimentos. Los valores de inhibición de la RNasa H y de la actividad de transferencia de banda de la integrasa (INST) para β -thujaplicinol y WX-II-25 se han tomado de Gao *et al.* [38], mientras que los de SL-6h fueron determinados por Sun *et al.* [32]. Junto a los valores de inhibición para RDDP se muestra entre paréntesis el porcentaje de inhibición de los compuestos a 50 μ M.

En cuanto a la actividad RNasa H, todos los inhibidores muestran una gran potencia, con IC_{50} s del rango micromolar y submicromolar. En todos ellos el valor IC_{50} es inferior al existente para el inhibidor de referencia β -thujaplicinol, uno de los primeros inhibidores de la actividad RNasa H descubiertos, y que cuenta con gran potencia y selectividad hacia esta diana [39].

Y en cuanto a la actividad integrasa, únicamente WX-II-25 muestra una buena inhibición de esta actividad. Cuenta con un IC_{50} aproximado de 1 μ M, potencia similar a la observada para la inhibición de la actividad RNasa H. Su potencia inhibitoria de la actividad integrasa no se ha calculado con exactitud, pero se vio que a 1 μ M inhibía más de un 50% [38], por lo que su IC_{50} seguramente esté debajo de 1 μ M. Por el contrario, para SL-6h la potencia de inhibición es más modesta, con un IC_{50} de 10,85 μ M.

Con todos estos datos se aprecia que SL-6h es el único inhibidor triple, aunque con potencias muy dispares para las tres actividades, siendo potente para inhibir la RNasa H y con una inhibición modesta de la actividad polimerasa, a pesar de ser la mejor de los compuestos evaluados. Por contra, WX-II-25, que no es activo frente a la DNA polimerasa, muestra mejores potencias para la actividad RNasa H e integrasa, siendo ambas del rango submicromolar. Y, por último, encontramos que los mejores inhibidores de la RNasa H (II-4 y XQ-9) muestran una inhibición intermedia de la actividad polimerasa, pero se desconoce su eficacia frente a la integrasa, que quedaría pendiente de evaluar.

Discusión

Desde que se comenzó la búsqueda de antivirales para el VIH, la enzima RT ha sido uno de los objetivos principales debido a su papel esencial en el ciclo replicativo. De hecho, casi la mitad de los antivirales descubiertos afectan a esta enzima y constituyen la base de todos los tratamientos antirretrovirales actuales [40]. Sin embargo, todos ellos interfieren con la actividad DNA polimerasa, no habiendo ningún fármaco antiviral que afecte a la actividad RNasa H. Por este motivo, cada vez son mayores los esfuerzos para conseguir inhibidores de la RNasa H que puedan llegar a la clínica, pues los antivirales conseguidos hasta ahora han fracasado sobre todo por su toxicidad [30].

En este trabajo se han evaluado los inhibidores WX-II-25, SL-6h, II-4, y XQ-9, los cuales fueron obtenidos con el objetivo de inhibir la actividad RNasa H. Esta inhibición ha sido confirmada en todos ellos y se ha explorado su capacidad para inhibir otras dianas, bien por ser quelantes inhibidores del sitio activo que podrían inhibir la integrasa por su similitud estructural del sitio activo, o bien por si afectan al dominio polimerasa RT, cercano al dominio RNasa H. Ninguno de los compuestos evaluados ha mostrado una inhibición considerable de la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA, siendo SL-6h el único que muestra cierta inhibición destacable. En cambio, algunos inhibidores sí han exhibido una inhibición potente frente a la integrasa, lo cual abre la posibilidad a su desarrollo como inhibidores duales.

Uno de los mejores inhibidores de la RNasa H evaluados es **WX-II-25** ($IC_{50} = 0,72 \mu M$), el cual además presenta una gran potencia frente a la integrasa ($IC_{50} \sim 1 \mu M$). Por tanto, es un inhibidor dual con potencias similares en ambas dianas (ratio $IC_{50} INST/IC_{50} RNasa H \sim 1,4$). WX-II-25 forma parte de una serie de compuestos sintetizados con las siguientes características: se sustituyó el anillo heptamérico del β -thujaplicinol (Figura 2) por un grupo aromático galoil, similar en estructura, y que sigue contando con el farmacóforo de 3 oxígenos (señalado en rojo en la Figura 2); y a esta estructura se le añadieron distintos grupos periféricos unidos a través de anillos de piperidina [41]. Por tanto, WX-II-25 se puede clasificar como inhibidor del sitio activo, pues cuenta con los oxígenos necesarios para quelar los magnesios del sitio catalítico. Curiosamente, a pesar de que β -thujaplicinol y WX-II-25 cuentan con un farmacóforo muy similar, WX-II-25 aparte de inhibir la RNasa H también afecta a la integrasa. Una explicación de esta diferencia podría ser el mayor tamaño de la parte hidrofóbica en WX-II-25. De hecho, esta característica se considera esencial para los inhibidores de la integrasa, pues todos los inhibidores descubiertos cuentan con una región de anclaje hidrofóbica que se asocia a una región altamente apolar cercana al sitio catalítico de la integrasa [42].

Otro inhibidor dual identificado es el compuesto **SL-6h**, aunque en este caso su potencia inhibitoria es peor que la vista en WX-II-25, tanto para la actividad RNasa H como para la actividad integrasa. Asimismo, muestra cierta inhibición frente a la actividad RDDP, por lo que se le podría considerar incluso un inhibidor triple. Su potencia frente a la RNasa H es relativamente buena, con un IC_{50} de $1,85 \mu M$, mientras que su inhibición de la actividad integrasa es más modesta ($IC_{50} = 10,85 \mu M$). Esto hace que la proporción relativa de ambos valores sea alta ($IC_{50} INST/IC_{50} RNasa H \sim 5,9$), por lo que a pesar de tener una actividad inhibitoria múltiple, SL-6h es más selectivo frente a la actividad RNasa H.

SL-6h forma parte de una serie de derivados de 5-hidroxipirido[2,3-b] pirazin-6 (5H)-onas [32], diseñados para tratar de inhibir la actividad RNasa H y la integrasa a través de la unión al bolsillo catalítico, por lo que también se clasifica como inhibidor del sitio activo. Todos los compuestos de la serie cuentan con una misma estructura con el farmacóforo de oxígenos (indicado en rojo en la Figura 2), y difieren entre ellos en función de los grupos biaril unidos al nitrógeno del carbono 4. Dentro de la serie, todos los compuestos cuentan con una buena inhibición de la actividad RNasa H, siendo SL-6h (identificado como compuesto 7f por Sun *et al.* [32]) uno de los más potentes. Sin embargo, el compuesto 7a destaca por contar con una mejor inhibición dual. Dado que SL-6h y 7a difieren únicamente por el grupo biaril, esta sustitución parece ser clave para modular una inhibición dual o más selectiva hacia la actividad RNasa H. Una explicación de esta diferencia podría deberse a la composición de los sitios activos: el sitio de la RNasa H cuenta con cuatro residuos ácidos con carga negativa (Asp443, Glu478, Asp498 y Asp549) que neutralizan completamente las cargas de los dos Mg^{2+} , mientras que en el sitio activo de la integrasa solo hay tres residuos ácidos, por lo que no es electrostáticamente neutro. Esto hace que la electronegatividad de los compuestos influya en la unión y, por tanto, en su inhibición [30].

Por otra parte, para los inhibidores **II-4** y **XQ-9**, con los datos obtenidos no se puede determinar si tienen actividad inhibitoria múltiple. Ambos son inhibidores muy buenos de la actividad RNasa H, con IC_{50} s del rango submicromolar ($0,41$ y $0,71 \mu M$ respectivamente). Por el contrario, apenas inhiben la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA (IC_{50} s mayores que $50 \mu M$) y se desconoce si son capaces de interferir con la enzima integrasa.

En los últimos años se han desarrollado numerosos inhibidores de la RNasa H (como los presentados en este trabajo) con capacidad de alterar otras dianas, habiéndose descubierto diversos inhibidores duales.

Por ejemplo, el compuesto 11j (un tipo de hidroxitienopirimidinediona) ha mostrado ser un inhibidor dual potente para las actividades RNasa H e integrasa (IC₅₀s de 0,04 y 2,10 μ M respectivamente), mientras que el compuesto 22 (un tipo de oxazinona) es potente frente a la RNasa H y la DNA polimerasa (IC₅₀s de 0,53 y 2,90 μ M respectivamente) [30]. Incluso se han llegado a describir inhibidores triples, como el compuesto 13j, un tipo de N-hidroxipirimidinediona que inhibe la actividad RNasa H con un IC₅₀ de 0,005 μ M, e interfiere también en la actividad DNA polimerasa dependiente de RNA e integrasa con valores IC₅₀ bajos (10,0 y 4,0 μ M respectivamente) [43]. El desarrollo de estos antivirales es muy complicado, habiendo distintas razones que explican su difícil creación y su posterior llegada a clínica. En primer lugar, encontramos que el surco del dominio RNasa H es poco profundo, por lo que proporciona escasos puntos de interacción con moléculas inhibitoras, haciendo difícil el desarrollo de buenos inhibidores que funcionen *in vitro*. Por otra parte, aquellos que funcionan *in vitro* suelen fallar en ensayos celulares y los pocos inhibidores que demuestran ser exitosos en ambos ensayos suelen mostrar toxicidades elevadas que impiden su llegada a la clínica [30].

Conclusión

En este trabajo destaca especialmente el compuesto WX-II-25, el cual ha demostrado ser un buen inhibidor dual de la actividad RNasa H e integrasa; así como el compuesto SL-6h, que además muestra cierta inhibición destacable de la actividad RDDP y que podría servir de referencia para el diseño de inhibidores triples con gran potencia. Por tanto, ambos serían buenos candidatos para continuar su investigación. En el futuro, entre otras cosas, sería conveniente determinar si los inhibidores II-4 y XQ-9 son capaces de inhibir la actividad integrasa; así como evaluar la inhibición de todos los compuestos en ensayos celulares, estudiar su permeabilidad de membrana, examinar su selectividad frente a RNasas humanas (para predecir si pueden ser tóxicos) y describir en detalle su unión a los enzimas, bien por estudios de mutagénesis dirigida o bien a través de cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear.

Referencias

1. Global health observatory data: WHO | HIV/AIDS. 2020 (1 de junio). En World Health Organization. <https://www.who.int/gho/hiv/en/>
2. Engelman, A., & Cherepanov, P. 2012. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 10(4): 279–290.
3. Li, G., & de Clercq, E. 2016. HIV Genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3): 679–731.
4. Inamdar, K., Floderer, C., Favard, C., & Muriaux, D. 2019. Monitoring HIV-1 assembly in living cells: insights from dynamic and single molecule microscopy. *Viruses*, 11(1): 72.
5. Seitz, R. (2016). Human immunodeficiency virus (HIV). *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 43(3): 203–222.
6. Wilen, C. B., Tilton, J. C., & Doms, R. W. 2012. HIV: cell binding and entry. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(8): a006866.
7. Hulme, A. E., Kelley, Z., Foley, D., & Hope, T. J. 2015. Complementary assays reveal a low level of CA associated with viral complexes in the nuclei of HIV-1-Infected Cells. *Journal of Virology*, 89(10): 5350–5361.
8. Freed, E. O. 2015. HIV-1 assembly, release and maturation. *Nature Reviews Microbiology*, 13(8): 484–496.
9. D'Urbano, V., de Crignis, E., & Re, M. C. 2018. Host restriction factors and human immunodeficiency virus (HIV-1): a dynamic interplay involving all phases of the viral life cycle. *Current HIV Research*, 16(3): 184–207.
10. Imran, M., Manzoor, S., Saalim, M., Resham, S., *et al.* 2016. HIV-1 and hijacking of the host immune system: the current scenario. *APMIS*, 124(10): 817–831.
11. Soliman, M., Srikrishna, G., & Balagopal, A. 2017. Mechanisms of HIV-1 control. *Current HIV/AIDS Reports*, 14(3): 101–109.
12. Ghimire, D., Rai, M., & Gaur, R. 2018. Novel host restriction factors implicated in HIV-1 replication. *Journal of General Virology*, 99(4): 435–446.
13. Pauls, E., Ruiz, A., Badia, R., Permanyer, M., *et al.* 2014. Cell cycle control and HIV-1 susceptibility are linked by CDK6-Dependent CDK2 phosphorylation of SAMHD1 in myeloid and lymphoid cells. *The Journal of Immunology*, 193(4): 1988–1997.

14. Tang, C., Ji, X., Wu, L., & Xiong, Y. 2015. Impaired dNTPase activity of SAMHD1 by phosphomimetic mutation of Thr-592. *Journal of Biological Chemistry*, 290(44): 26352–26359.
15. Harris, R. S., & Dudley, J. P. 2015. APOBECs and virus restriction. *Virology*, 479(1): 131–145.
16. Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligo, B., & Buttò, S. 2010. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: A brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 46(1): 5–14.
17. Lucas, S., & Nelson, A. M. 2015. HIV and the spectrum of human disease. *The Journal of Pathology*, 235(2): 229–241.
18. Eggleton, J. S., & Nagalli, S. 2020. Highly Active Antiretroviral Therapy (HAART). In: *StatPearls*. 1st edition. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.
19. Lu, D.-Y., Wu, H.-Y., Yarla, N. S., Xu, B., *et al.* 2017. HAART in HIV/AIDS treatments: future trends. *Infectious Disorders - Drug Targets*, 18(1): 15–22.
20. Saag, M. S., Benson, C. A., Gandhi, R. T., Hoy, J. F., *et al.* 2018. Antiretroviral drugs for treatment and prevention of HIV infection in adults: 2018 recommendations of the international antiviral society-USA panel. *Journal of the American Medical Association*, 316(2): 191–210.
21. Castro-Gonzalez, S., Colomer-Lluch, M., & Serra-Moreno, R. 2018. Barriers for HIV cure: the latent reservoir. *AIDS research and human retroviruses*, 34(9): 739–759.
22. Margolis, A. M., Heverling, H., Pham, P. A., & Stolbach, A. 2014. A review of the toxicity of HIV medications. *Journal of Medical Toxicology*, 10(1): 26–39.
23. Ghosn, J., Taiwo, B., Seedat, S., Autran, B., *et al.* 2018. Seminar HIV. *The Lancet*, 392(18): 685–697.
24. Hutter, G., Nowak, D., Mossner, M., Ganepola, S., *et al.* 2009. Long-term control of HIV by CCR5 delta32/delta32 stem-cell transplantation. *New England Journal of Medicine*, 360(7): 692–698.
25. Gupta, R. K., Abdul-Jawad, S., McCoy, L. E., Mok, H. P., *et al.* 2019. HIV-1 remission following CCR5Δ32/Δ32 haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature*, 568(7751): 244–248.
26. Jilg, N., & Li, J. Z. 2019. On the road to a HIV cure: moving beyond Berlin and London. *Infectious Disease Clinics of North America*, 33(3): 857–868.
27. Peterson, C. W., & Kiem, H. P. 2018. Cell and gene therapy for HIV cure. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 417(1): 211–248.
28. Burton, D. R. 2019. Advancing an HIV vaccine; advancing vaccinology. *Nature Reviews Immunology*, 19(2): 77–78.
29. Nowak, E., Potrzebowski, W., Konarev, P., Rausch, J. W., *et al.* 2013. Structural analysis of monomeric retroviral reverse transcriptase in complex with an RNA/DNA hybrid. *Nucleic Acids Research*, 41(6): 3874–3887.
30. Tramontano, E., Corona, A., & Menéndez-Arias, L. 2019. Ribonuclease H, an unexploited target for antiviral intervention against HIV and hepatitis B virus. *Antiviral Research*, 171(1): 104613.
31. Cao, L., Song, W., Clercq, E., Zhan, P., *et al.* 2014. Recent progress in the research of small molecule HIV-1 RNase H inhibitors. *Current Medicinal Chemistry*, 21(17): 1956–1967.
32. Sun, L., Gao, P., Dong, G., Zhang, X., *et al.* 2018. 5-Hydroxypyrido[2,3-b]pyrazin-6(5H)-one derivatives as novel dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H and integrase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 155(1): 714–724.
33. Gu, S.-X., Xue, P., Ju, X.-L., & Zhu, Y.-Y. 2016. Advances in rationally designed dual inhibitors of HIV-1 reverse transcriptase and integrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(21): 5007–5016.
34. de Miguel, R., Rial-Crestelo, D., Dominguez-Dominguez, L., Montejano, R., *et al.* 2020. Dolutegravir plus lamivudine for maintenance of HIV viral suppression in adults with and without historical resistance to lamivudine: 48-week results of a non-randomized, pilot clinical trial (ART-PRO). *EBioMedicine*, 55(1): 102779.
35. Kati, W. M., Johnson, K. A., Jerva, L. F., & Anderson, K. S. 1992. Mechanism and fidelity of HIV reverse transcriptase. *Journal of Biological Chemistry*, 267(36): 25988–25997.
36. Matamoros, T., Barrioluengo, V., Abia, D., & Menéndez-Arias, L. 2013. Major groove binding track residues of the connection subdomain of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase enhance cDNA synthesis at high temperatures. *Biochemistry*, 52(51): 9318–9328.

37. Boretto, J., Longhi, S., Navarro, J. M., Selmi, B., *et al.* 2001. An integrated system to study multiply substituted human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Analytical Biochemistry*, 292(1): 139–147.
38. Gao, P., Wang, X., Sun, L., Cheng, X., *et al.* 2019. Design, synthesis, and biologic evaluation of novel galloyl derivatives as HIV-1 RNase H inhibitors. *Chemical Biology and Drug Design*, 93(4): 582–589.
39. Budihas, S. R., Gorshkova, I., Gaidamakov, S., Wamiru, A., *et al.* 2005. Selective inhibition of HIV-1 reverse transcriptase-associated ribonuclease H activity by hydroxylated tropolones. *Nucleic Acids Research*, 33(4): 1249–1256.
40. de Clercq, E., & Li, G. 2016. Approved antiviral drugs over the past 50 years. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3): 695–747.
41. Gao, P., Wang, X., Sun, L., Cheng, X., *et al.* 2019. Design, synthesis, and biologic evaluation of novel galloyl derivatives as HIV-1 RNase H inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, 93(4): 582–589.
42. Gill, M. S. A., Hassan, S. S., & Ahemad, N. 2019. Evolution of HIV-1 reverse transcriptase and integrase dual inhibitors: Recent advances and developments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 179(1): 423–448.
43. Wang, X., Gao, P., Menendez-Arias, L., Liu, X., *et al.* 2018. Update on recent developments in small molecular HIV-1 RNase H inhibitors (2013-2016): opportunities and challenges. *Current Medicinal Chemistry*, 25(14): 1682–1702.