

HIV-1 融合抑制剂研究现状及发展趋势

史卫国, 贾启燕, 刘克良*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: HIV-1 融合抑制剂是继逆转录酶和蛋白酶抑制剂后的新一类抗 HIV 感染药物, 通过阻断病毒与靶细胞膜的融合从而抑制病毒进入靶细胞, 在感染的初始环节切断 HIV-1 的传播, 其中多肽类融合抑制剂 T-20 已于 2003 年上市。HIV-1 融合抑制剂以 HIV-1 跨膜糖蛋白 gp41 为作用靶标, 它们是一些天然或合成的多肽以及小分子化合物, 通过与 gp41 功能区结合从而抑制其促融合功能的发挥。近年来, 随着对膜融合过程分子机制以及 gp41 功能研究的不断深入, 新的以 gp41 不同功能区为靶点的融合抑制剂分子不断被发现, 成为倍受关注的研究热点之一。本文着重对近年来 HIV-1 融合抑制剂的研究现状及发展趋势进行综述。

关键词: HIV-1 融合抑制剂; gp41; C 肽; N 肽; 小分子融合抑制剂

中图分类号: R916

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 02-0184-10

The current progress in the development of HIV-1 fusion inhibitors

SHI Wei-guo, JIA Qi-yan, LIU Ke-liang*

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: HIV-1 fusion inhibitors are a new class of anti-HIV compounds, which block the entry of HIV into target cells through preventing the fusion between viral and cell plasma membrane and thus interrupt the initial steps of viral replication. T-20 (enfuvirtide), which has been clinically approved as the first fusion inhibitor of HIV-1 by U.S. FDA in 2003, can suppress replication of HIV variants with multi-drug resistance to reverse transcriptase and protease inhibitors. Peptides and small molecules display potent anti-HIV fusion activities by targeting gp41 thus inhibit its fusogenic function. In recent years, with the development of studies on the molecular mechanism of HIV membrane fusion process and the function of gp41, many new fusion inhibitors are found and some have been in advanced clinical trials. This review discusses recent progress in the development of HIV-1 fusion inhibitors targeting the gp41.

Key words: HIV-1 fusion inhibitor; gp41; C peptide; N peptide; small molecule

艾滋病 (AIDS) 主要是由于人免疫缺陷病毒 I 型 (HIV-1) 感染导致的致死性传染疾病, 目前在全球范围流行。根据联合国艾滋病规划署 (UNAIDS) 报道, 截止 2008 年 12 月, 全球 HIV-1 感染者大约 3 340 万; 2008 年有超过 200 万人死于艾滋病相关疾病。据统计, 目前全球每天新增的艾滋病病毒感染者

数多达 7 500 人^[1]。有效的疫苗接种是预防 HIV-1 感染的最佳途径, 但是, 对艾滋病疫苗的研究屡受挫折, 一直难有实质性进展。最近, 美国和泰国研究人员联合宣布, 一种新型名为 RV144 的试验疫苗可使人体感染艾滋病病毒的风险降低 31.2%。这是世界上第一种具有一定免疫效果的艾滋病疫苗, 能否获得批准尚需更广泛地验证。就目前的试验结果看, 这种疫苗只能是一种辅助手段, 还不能完全取代预防艾滋病的其他措施^[2]。因此, 化学药物仍然是当前控制 AIDS 的主要手段。

HIV-1 感染宿主细胞是一个复杂的过程, 包括吸

收稿日期: 2009-10-10.

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项综合性新药研发技术大平台 (2009ZX90301-002); 国家自然科学基金面上项目 (30973617); 中国博士后科学基金特别资助项目 (200801064).

*通讯作者 Tel: 86-10-68169363, Fax: 86-10-68211656,

E-mail: keliangliu@yahoo.com

附、进入、脱壳、逆转录、整合、复制、转录、翻译、装配、成熟等各个阶段。HIV-1 通过吸附及膜融合进入靶细胞后, 结构破裂, 释放出遗传物质 RNA 和逆转录酶, 进行逆转录, 合成的 cDNA 通过整合酶插入到感染细胞的染色体中, 变成潜在病毒。当被感染细胞进行复制时, 激活 HIV DNA 制造按病毒 DNA 编码的蛋白质及新的病毒 RNA, 然后, 这些新病毒原料组装成未成熟的病毒, 在细胞表面形成芽状突起, 细胞膜成为病毒的外层膜, 从感染细胞破出, 最后, 在蛋白酶作用下对前体蛋白进行加工, 组装成成熟的病毒颗粒。上述过程的每个阶段均涉及特异性酶或蛋白参与作用, 它们都可能成为化学药物的有效靶标。到目前为止, 经美国 FDA 批准上市的用于抗 HIV-1 感染的化合物共 25 种, 根据作用机制不同, 可分为 4 大类: 逆转录酶抑制剂, 包括核苷类逆转录酶抑制剂 (8 种) 和非核苷类逆转录酶抑制剂 (4 种)、蛋白酶抑制剂 (10 种)、整合酶抑制剂 (1 种)、以及 HIV 进入抑制剂 (HIV entry inhibitor), 包括辅助受体 CCR5 拮抗剂 (1 种), 以及 HIV-1 融合抑制剂 (1 种)。

逆转录酶及蛋白酶抑制剂是最早开发成功的抗 HIV-1 药物, 对抑制艾滋病的传播起到了巨大作用, 但是, 由于长期用药带来的副作用以及 HIV 变异导致的耐药性问题的日益突出, 开发针对新作用靶点的抗 HIV 药物, 成为当务之急; 而进入抑制剂, 由于其在病毒复制早期发挥作用, 在感染的最初阶段抑制病毒的传播, 因此在预防和治疗 HIV-1 感染方面具有独特的优势。HIV-1 进入靶细胞的过程包括 3 个连续的步骤 (图 1): 首先, HIV-1 包膜糖蛋白表面亚基 gp120 与靶细胞膜的 CD4 受体结合, 附着在细胞上; 接着, gp120 再与靶细胞的辅助受体 (CCR5 或 CXCR4) 结合; 最后跨膜亚基 gp41 的构象发生改变,

其 N 端的融合肽插入到宿主细胞膜内, 启动病毒包膜与靶细胞膜的融合, 完成病毒进入宿主细胞的过程^[3,4]。针对这 3 个步骤, HIV-1 进入抑制剂可分为: 吸附抑制剂、辅助受体结合抑制剂和融合抑制剂; 其中融合抑制剂以 HIV-1 跨膜糖蛋白 gp41 为靶点, 抑制 gp41 介导膜融合功能性核心结构六螺旋体 (six-helix bundle, 6-HB) 的形成。近年来, 随着对膜融合过程分子机制及 gp41 功能研究的不断深入, 新的以 gp41 不同功能区为靶点的融合抑制剂分子不断被发现, 成为倍受关注的研究热点之一。本文着重对近年来 HIV-1 融合抑制剂的研究现状及发展趋势进行综述。

1 HIV-1 gp41 的功能及融合抑制剂 T-20

2003 年 3 月, 由瑞士罗氏 (Roche) 公司和美国 Trimeris 公司共同研制的 HIV-1 多肽类融合抑制剂 enfuvirtide (Fuzeon), 又名 T-20, 经美国 FDA 批准上市, 标志着 HIV-1 跨膜糖蛋白 gp41 作为抗 HIV-1 药物有效靶点的确认。

Gp41 是介导 HIV-1 与靶细胞膜融合的特异性蛋白, 是融合抑制剂的作用靶标。Gp41 由融合肽 (FP)、胞外区、跨膜区等构成。在其胞外区内存在两个与膜融合密切相关的螺旋结构功能区, 即 N 末端重复序列 (N-terminal heptad repeat, HR1 或 NHR, aa: 542–592) 和 C 末端重复序列 (C-terminal heptad repeat, HR2 或 CHR, aa: 623–665) (图 2)。膜融合过程中, HR2 与 HR1 相互作用, 形成一种六螺旋体核心结构 (six-helix bundle, 6-HB), 使得两种膜相互接近, 最终发生融合。Gp41 6-HB 分子结构的发现为其作为药物靶标奠定了基础。X-射线晶体衍射分析表明^[5], 6-HB 核心结构中, 3 个 N 肽 (N36) 形成位于中心的三聚体复合螺旋核 (coiled coil), 而 3 个 C 肽 (C34) 以反向平行的方式分别结合在 3 个 N 肽构成三聚体

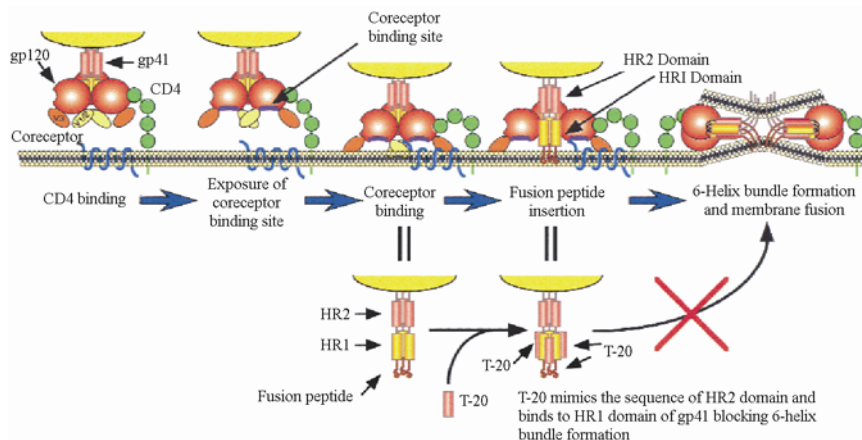


图 1 HIV-1 进入靶细胞过程及 T-20 作用机制示意图^[3]

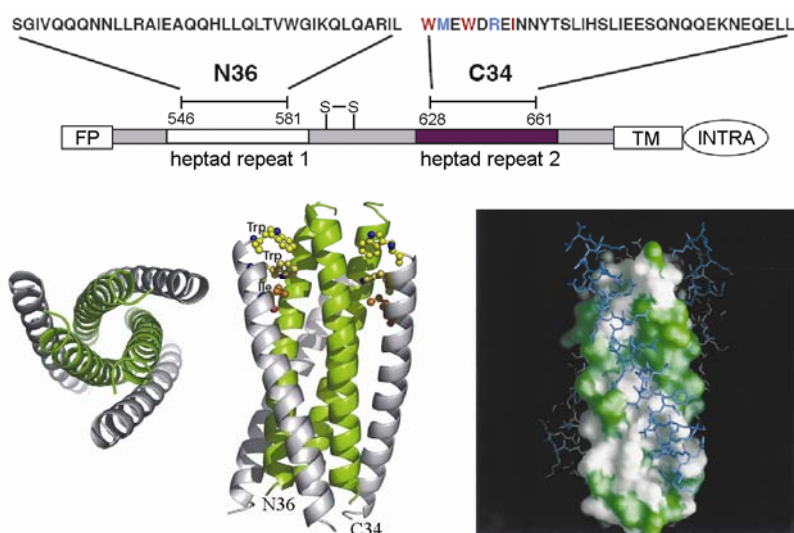


图2 HIV-1 gp41 及 6-HB 的结构示意图^[4-6]

(N-trimer) 表面的疏水性沟槽内 (图 2)。6-HB 形成过程中存在一个中间过渡态, 此时 3 个 N 螺旋三聚体已经形成, 但还未与 C 螺旋形成 6-HB, 衍生于 gp41 HR2 区域的多肽 (称为 C 肽) 如 T-20, C34 等能够与 N-trimer 作用, 占据 C 螺旋的作用位点, 从而竞争性地抑制了 C 螺旋与 N 螺旋形成 6-HB, 使得病毒膜融合过程不能完成 (图 1), 从而阻断病毒进入靶细胞。除 N 螺旋三聚体外, gp41 的融合肽以及 HR2 区域, 也可作为融合抑制剂作用靶点。

2 多肽类 HIV-1 融合抑制剂

2.1 C 肽类融合抑制剂

C 肽是指衍生于 HR2 的合成多肽, 它们以 gp41 NHR 三聚体 (N-trimer) 为作用靶标, 是目前研究最多且最具药物研发前景的 HIV-1 融合抑制剂。除已上市的 T-20 外, 目前还有多个 C 肽类化合物正处于不同的临床研究阶段。

对于新一代 C 肽类融合抑制剂研究, 目前的重点是克服对 T-20 已经产生的耐药性, 同时针对 T-20 的一些缺陷或不足进行改进, 如体内生物利用度低, 使用不便 (皮下注射, 一天两次), 价格昂贵等。由于 HIV-1 逆转录酶高的差错率以及病毒再生繁殖的快速性, 使得 HIV-1 能够对所有治疗药物产生耐药性。T-20 是直接衍生于天然 HR2 序列的 36 肽, 天然结构虽然最大限度地满足了天然底物 (作用靶标) 对药物结构的要求, 但亦导致 T-20 对 gp41 天然突变的抵抗力低, 容易产生耐药性。靶标 HR1 区域个别位点氨基酸残基的突变即可导致对 T-20 耐药^[7]。研究表明, HR1 第 36~45 位残基 (GIVQQNNLL) 是 T-20 的主要结合部位, 该部位残基突变是导致 T-20 耐药

性产生的主要因素。通常, 单个残基突变会导致对 T-20 敏感度下降 5~10 倍, 而两个残基突变则会使敏感度下降 100 倍^[8-10]。

针对 T-20 已产生的耐药性, 目前的策略主要是改变 C 肽的靶标作用位点, 使其不同于 T-20; 同时对天然 HR2 序列进行修饰改造, 引入能够提高序列螺旋性及稳定性的残基, 进一步提高序列的靶标结合活性及抑制融合活性。

T-1249 是罗氏及 Trimeris 公司开发的继 T-20 后第二代多肽类融合抑制剂, 为一个嵌合序列 39 肽, 由 HIV-1、HIV-2 以及猿免疫缺陷病毒 (SIV) HR2 区域相关序列构成。与 T-20 相比, 在其 N 端增加了与 N-trimer 疏水性口袋区结合序列。尽管 T-1249 的活性比 T-20 高出一个数量级, 但 HR1 突变 (残基 37 和 38) 仍然对其产生耐药性, 并且由于制剂等问题, 对 T-1249 的临床研究已于 2004 年停止^[11, 12]。

随后, Trimeris 公司推出了第三代多肽类 HIV-1 融合抑制剂 T-1144^[13], 它的作用位点与 T-20 完全不同, 主要为 HR1 的疏水性口袋区。T-1144 是一个 38 肽, 是由天然 HR2 序列 T651 (C38: aa 626-673) 修饰而来, 通过对 T651 序列与靶标作用非关键性残基进行替换, 引入能够稳定 α -螺旋结构的丙氨酸 (Ala) 以及由正负离子对相互作用形成的盐桥, 进一步增强序列的 α -螺旋性及与 N 肽形成 6-HB 的稳定性, 同时改善药代动力学性质。I 期临床研究结果表明, T-1144 能够显著抑制 T-20 耐药性毒株, 同时比 T-20 显示了更高的活性及更好的药代动力学性质, 为方便使用, 该公司目前还正在研制可一月一次使用的

缓释剂型。

此外,运用类似 T-1144 的理性设计方法, Dwyer 等^[14]进一步设计了一系列高活性抗 HIV 融合多肽,如 T-2635、T-267221、T-267227 等,与 T-20 和 T-1249 相比,新序列抗耐药性病毒活性提高了大约 3 600 倍,生物利用度提高了 100 倍,并且,病毒需要更大的突变来降低对该类多肽的敏感性,这些变异对活性的影响也远比 T-20 低。因此,这些多肽的研制为进一步的临床研究提供了可靠的保证。

天津扶素生物技术有限公司开发的 sifuvirtide (西夫韦肽)^[15, 16]属于第三代 HIV-1 融合抑制剂,是一个 36 肽,通过引入盐桥及稳定螺旋残基提高天然 C 肽序列的稳定性及抗融合活性。Sifuvirtide 以 HR1 的疏水口袋区为其主要作用靶点,它的效价比 T-20 高 20 倍,并且对 T-20 耐药毒株有很好的抑制效果。目前处于 II 期临床阶段。

He 等^[17, 18]发现 32 肽的 CP621-652 及其类似物 CP32M,具有异常高的抑制 T-20 耐药性毒株活性。该多肽在 HR2 的位置比 C34 向口袋结合区 (pocket binding domain, PBD) 的上游方向移动了七个氨基酸,因此含有疏水性口袋结合区 (PBD) 但并不含 T-20 序列中与 HR1 33-45 位残基结合序列。表明改变作用位点确实可以达到抑制 T-20 耐药性的目的。并且该结果表明 PBD 上游序列⁶²¹QIWNNMT⁶²⁷同样具有稳定 6-HB 作用。

为进一步增强 C34 的螺旋稳定性及水溶性, Otake 等^[19-22]将能形成盐桥的残基引入到 C34 螺旋与溶剂作用面的位置,而保留螺旋与靶标作用面的残基不变,得到的 C34 类似物 SC34EK 的水溶性比 C34 提高了近 1 000 倍,同时保持了与 C34 类似的抑制 HIV 融合活性,且能够有效抑制 T-20 耐药性毒株。随后又发现其截短类似物 SC29EK 同样保持了高的螺旋性及抑制 T-20 耐药性毒株活性。

上述设计均系在天然 HR2 序列的基础上,通过对序列中与靶标作用非关键的、非保守性氨基酸残基进行修饰或替换得到的。这种基于天然配基结构的设计,是目前 C 肽类融合抑制剂设计的主要方式。

最近, Qi 和 Shi 等^[23, 24]设计了基于靶标结构的完全非天然序列 α -螺旋肽,目的是探讨非天然序列的抗融合功能,以及这类与天然配基非同源性序列对耐药性的作用。应用基于靶标三维结构的计算机辅助理性设计方法,设计了完全非天然序列的 α -螺旋 5HR 系列多肽 (5HR_a、5HR_b、5HR_c 和 5HR_d),它们的序列与 T-20、C34 等天然 C 肽序列完全不同,系由

5 个重复拷贝的七残基构成的 35 肽。生物活性评价结果表明, 5HR 系列多肽确实显示了一定程度的抑制 HIV-1 细胞融合及抑制 6-HB 形成活性,并且,将与靶标特定功能区位点作用的序列,如脂膜结合区 (lipid binding domain, LBD), 口袋结合区 (pocket binding domain, PBD) 等,引入到所设计的非天然序列中,导致抑制活性显著提高^[22, 23]。实验结果初步表明了非天然序列抗融合多肽设计具有现实可行性,对其结构和功能的深入研究有助于新结构融合抑制分子的发现,同时,设计方法对于其他含 I 型膜融合蛋白病毒抑制剂设计亦具有参考意义。

HIV 融合抑制剂耐药性机制比较复杂,与其他抗 HIV 药物通常作用于一个特定的位点不同, HIV-1 C 肽类融合抑制剂作用在 gp41 HR1 的多个位点,甚至是在 HR1 区域外的位点,因此可以在 HR1 或其他靶标区引起多重耐药性突变。此外,研究发现, T-20 耐药毒株 HR1 突变同时往往会伴随 HR2 区域的突变,如 T-20 序列部位 N126K、E137K 及 S138A 等,这些突变似乎能够在一定程度上修复由于 HR1 突变而导致的 T-20 部位与 HR1 (突变后) 结合活性的降低^[25]。对于 HR1 突变导致耐药是因为这些区域含有药物的作用靶点。但是,在耐药突变中伴随的位于药物靶点外突变的作用,是一个值得探讨的问题,因为这些突变对抑制剂与其作用靶点的结合并无直接的影响。

最近, Ray 和 Cai 等^[26, 27]应用动力学的细胞-细胞融合检测方法 (a kinetic cell-cell fusion assay),证明了 T-20 耐药毒株相应的 HR2 区突变,是病毒为了修复由于单纯 HR1 突变而导致的融合动力学延迟而产生的适应性突变。它们构造了能够表达 HIV-1 包膜糖蛋白 (Env) 的单独 HR1 突变以及 HR1/HR2 同时突变的效应细胞 (effector cell),比较二者同靶细胞的融合动力学差异。结果表明,单独的 HR1 突变能够显著延迟融合动力学,致使融合过程比未突变延长 19 min,这使得病毒对宿主免疫防御体系变得敏感,降低病毒适应性。但是,同时 HR1/HR2 的突变能够使延迟的融合动力学恢复到接近初始水平,从而在一定程度上修复由于药物靶点突变而导致受损的病毒适应性。该结果对理解 HIV-1 对融合抑制剂耐药机制提供了新思路,可用于指导克服抗药性新的 HIV 融合抑制剂的设计。Izumi 等^[28]将耐药毒株 HR2 区域 S138A 突变引入 T-20 序列,发现仅 S138A 一个位置氨基酸残基改变即能够使得结构改造的 T-20 恢复对耐药性 HIV-1 毒株的抑制活性。

在克服耐药性的基础上,通过对 C 肽的进一步

修饰而提高其活性或生物利用度也是目前研究的方向之一。TRI-999^[29]是一个用脂肪酸缀合策略修饰的 C 肽, 目的是为了提 高生物利用度。其基本序列为衍生于 HR2 的 36 肽, 比 C34 向 N 端延长了 2 个氨基酸。通过在其 C 端 30 位的赖氨酸 (Lys₃₀) 侧链上连接一个 C18 脂肪酸, 不但保持了其原有的抗病毒活性, 还使得序列的生物利用度得到明显改善。T-20 C 端脂膜结合区 (lipid binding domain, LBD) 序列对其活性保持起主要作用, Shai 等^[30]将 T-20 C 端 LBD 序列的 10 个氨基酸去掉, 结果导致 T-20 活性降低 5 000 倍, 而连接一个 C16 脂肪酸代替被去掉 C 端序列后, 基本恢复了与 T-20 相当的活性。最近, Ingallinella 等^[31]将与细胞膜作用的胆固醇分子通过一个短的 linker 连接到 C34 的 C 端 (C34-Chol), 导致修饰后序列体外抑制细胞融合 IC₅₀ 值比 C34 提高了 50 倍, 达到皮摩尔 (4 pmol·L⁻¹) 水平, 是目前所有融合抑制剂中活性最高的分子, 同时显著改善了 C34 的药代动力学性质。

2.2 N 肽类融合抑制剂 N 肽是最早被发现具有抑制 HIV-1 融合活性的多肽, 它们是衍生于 gp41 HR1 的序列, 如 DP-107 (aa: 558-595) 是第一个被发现具有抗融合活性的多肽。N 肽可能的作用机制有两种: 一是与 HR2 结合抑制 6-HB 形成; 二是与 HR1 形成异源三聚体从而破坏自身 N-trimer 的形成。尽管 N 肽显示了一定的抑制 HIV 融合活性, 但与 C 肽相比, 它们的活性很低, 如 DP-107 的活性比 T-20 低 1 000 倍^[32]。并且, 单一的 N 肽溶解性差且容易自身聚集, 因此, 对 N 肽的研究主要集中在克服上述缺陷方面。

Eckert 等^[33]将一段可溶性的亮氨酸拉链序列与 N 肽结合, 使得这种嵌合型 N 肽在溶液中形成一种可溶性的、稳定的、N-trimer 类似物。这种方式使得 N 肽能够维持卷曲螺旋构象, 并且, 使其抗病毒活性得到显著提高。其中活性最高的化合物 IQN23, 抑制 HIV-1 融合 IC₅₀ 值达到 15 nmol·L⁻¹。这种嵌合 N 肽抑制活性与其形成三聚体的稳定性密切相关。随后, Bianchi 等^[34]通过引入链间二硫键共价稳定所形成的三聚体结构, 使得抑制活性进一步增强, 活性最高的化合物 CCIZN17 抑制 HIV-1 融合 IC₅₀ 值达到 260 pmol·L⁻¹。

5-螺旋 (5-helix) 是 Root 等^[35]设计的一种重组表达的小分子蛋白。它是基于 N36/C34 六螺旋束晶体结构设计而成的一种包含 220 个氨基酸残基的多肽 (N40-GGSGG-C38-GSSGG-N40-GGSGG-C38-GSSGG-N40), 由 gp41 6-HB 的 5 股 (3 股 N 端螺旋和 2 股 C

端螺旋) 构成。5-Helix 在溶液中形成可溶的, 非常稳定的 α 螺旋结构。由于其缺少一个 C 肽, 因此所暴露的 N 螺旋可以与 gp41HR2 区结合而抑制 6-HB 的形成。5-螺旋具有很强的抑制 HIV-1 膜融合的能力, IC₅₀ 值为 13 nmol·L⁻¹。

Shai 等^[36]将 C8、C12、C16 等不同长度的脂肪酸连接到 N36 的 N 端, 结果其抗 HIV-1 融合活性得到显著提高, 且抑制活性随链长度的增加而增加。C16-N36 的 IC₅₀ 值为 (72 ± 27) nmol·L⁻¹, 而未连接脂肪酸的 N36 IC₅₀ 值为 (584 ± 46) nmol·L⁻¹。表明将 N 肽锚定到细胞膜上也能显著提高其抑制活性。而且, 脂肪酸连接到 N36 C 端得到的结果与 N 端结果相差不大, 表明脂肪酸链长度与活性密切相关, 但是肽链的方向性对其活性发挥并不重要。进一步的分析表明 C16-N36 并非以 CHR 为作用靶标, 而是主要通过 NHR 作用而发挥抑制活性。

最近, 对单一 N 肽的研究也有进展, Dwyer 等^[37]报道了一系列用蛋白质设计方法得到的能够形成可溶性、热稳定 N-trimer 的单纯的 N 肽。并对其中一个 49 肽形成的 N-trimer 的 X-射线晶体结构进行了详细分析。这是关于单纯 N 肽形成 N-trimer 晶体结构的首次报道。尽管 CD 谱结果表明这类 N 肽能够形成稳定的螺旋结构, 如 N13 Δ Trimer 所形成的 N-trimer 具有接近 100% 的螺旋构象, T_m 值大于 97 °C, 但其抗病毒活性并不高, 比野生型 N 肽仅略有提高。

2.3 以 gp41 融合肽 (fusion peptide, FP) 为靶标的融合抑制剂 融合肽是指 gp41 跨膜糖蛋白 N 端由大约 23 个氨基酸组成的高度疏水区域, 在 HIV-1 包膜与宿主细胞膜融合过程中起着十分关键的作用。膜融合初期, HIV-1 包膜糖蛋白表面亚基 gp120 分别与靶细胞表面 CD4 受体和辅助受体结合后, 导致 gp41 的构象发生改变, 其 N 端 FP 暴露出来, 插入宿主细胞膜并锚定其中, 是启动融合过程的第一步。Munch 等^[38]通过对上万升血液透析液分离鉴定, 从 100 多万个肽序列中发现了一种可以阻断 HIV-1 病毒感染的天然成分, 并命名为病毒抑制肽 (VIRIP)。VIRIP 由 20 个天然氨基酸组成, 通过与 FP 特异性结合, 阻断 FP 插入细胞膜, 从而抑制膜的融合。通过对 VIRIP 进行结构改造及修饰, 研究者设计合成了 600 多个类似物, 并在其中发现了若干含二硫键的肽序列, 活性比 VIRIP 提高了两个数量级, 达纳摩尔水平。同时实验数据显示, VIRIP 可抑制包括对目前临床药物已产生耐药的病毒株在内的 60 多种 HIV 毒株, 且没有细胞毒性。进一步的研究表明: FP 区域具有高度保守性,

HIV-1 病毒对 VIRIP 产生耐药性突变的几率甚小。因此, VIRIP 类似物具有良好的成药性, 为研发全新的抗 AIDS 药物带来了希望。

2.4 非天然氨基酸修饰的 HIV-1 融合抑制多肽 D 肽 (由 D 型氨基酸构成的肽) 能够抑制蛋白酶降解, 具有潜在的口服生物利用度。应用镜像噬菌体展示方法, Eckert 等^[39]筛选了一个大的 (>10⁹ 个) 肽库, 发现了一系列具有中等抑制活性的 (IC₅₀ 值约 10 μmol·L⁻¹) D 型环 18 肽, 它们能够特异性结合 N-trimer 的疏水性口袋区, 从而表明单纯的口袋区也可作为小分子融合抑制剂作用靶标。运用同样的方法, Welch 等^[40]报道了一组活性更高的 D 型环 15 肽, 并发现其三聚体抑制 HIV-1 融合 IC₅₀ 值达到 250 pmol·L⁻¹。

Gaston 等^[41]报道了 3 个 D 型氨基酸取代的 C34 类似物 C34M3, 在保持与 C34 相当活性的基础上, 其水溶性比 C34 提高了 6 倍, 血浆稳定性比 C34 提高 2

倍, 表明个别 D 型氨基酸替换也可以提高 C 肽抗酶解稳定性。最近, Horne 等^[42]将 β 氨基酸以及环状 β 氨基酸引入到 C 肽 T-2635 序列的特定位置, 得到的 α/β 肽能模拟 T-2635 的结构及功能, 生物物理学检测及活性评价结果表明 α/β 肽能以与 α 肽相同的机制有效抑制 HIV-1 细胞融合, 同时, 与相应的 α 肽相比, α/β 肽对蛋白水解酶的敏感性显著降低。Bautista 等^[43]报道的一系列 β³ 十肽, 也显示了一定的抑制 HIV 细胞融合活性 (微摩尔水平)。

3 小分子 HIV-1 融合抑制剂

由于肽类 HIV-1 融合抑制剂生物利用度低, 不宜口服, 必须经皮下注射使用, 因此, 开发口服小分子融合抑制剂也是研究的方向之一。同 C 肽相同, 小分子化合物也是通过抑制 6-HB 形成来抑制融合, 它们的作用靶标是 gp41 N-trimer 的疏水性口袋区。

在 gp41 6-HB 结构 N-trimer 表面存在一个疏水性

表 1 以 gp41 为靶标的 HIV-1 多肽类融合抑制剂

名称	序列	参考文献
C 肽		
T-20	Y T SLIHSLIEESQ N Q Q EKNEQ E LL E LDKWASL W N W F	6
C34	W ME W D R E I NNY T SLIHSLIEESQ N Q Q EKNEQ E LL	5
T-1249	W Q E W E Q K I T AL L E Q A Q I Q Q E KNE Y EL Q KL D KWASL W E W F	13
T-1144	T T W E A W D R A I A E Y A A R I E A L L R A L Q E Q E K N E A A L R E L	13
T-2635	T T W E A W D R A I A E Y A A R I E A L I R A A Q E Q E K N E A A L R E L	14
T-267221	T T W E A W D R A I A E Y A A R I E A L I R A L Q E Q E K N E A A L R E L	14
T-267227	T T W E A W D R A I A E Y A A R I E A L I R A A Q E Q E K N E A A L R E	14
Sifuvirtide	S W E T W E R E I EN Y T R Q I Y R I L E S Q E Q D R N E R D L L E	15, 16
CP621-652	Q I W N N M T W ME W D R E I NNY T SLIHSLIEESQ N Q	17
CP32M	V E W N E M T W ME W E R E I ENY T K L I Y K I L E S Q E Q	18
SC34EK	W Z [*] W D R K I E E Y T K I E L I K S Q E Q E K N E K E L K	19
SC29EK	W E E W D K K I E E Y T K I E L I K S E E Q Q K N	21
5HR	E E Y T K I E E Y T K I E E Y T K I E E Y T K I E E Y T K I	23
C34-Chol*	W ME W D R E I NNY T SLIHSLIEESQ N Q Q EKNEQ E LL G S G (Chol)	31
C34M3	W e E W D R K I N N Y T S L I H S L I E S Q N Q Q e K N E k E L L [*]	41
病毒抑制肽		
VIRIP	L E A I P M S I P P E V K F N K P F V F	38
N 肽		
N36	S G I V Q Q N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T W G I K Q L Q A R I L	5
DP-107	N N L L R A I E A Q Q H L L Q L T W G I K Q L Q A R I L A V E R Y L K D Q	32
IQN23	R M K Q I E D K I E E I E S K Q K I E N E I A R I K K L I E A Q Q H L L Q L T W G I K Q L Q A R I L	33
CCIZN17	C C G G I K K E I E A I K K E Q E A I K K I E A I E K L L Q L T W G I K Q L Q A R I L	34
N13ΔTrimer	N N I L R A I E K I Q H L I Q L I V R G I K Q I Q E R I L A I E R Y I K D I	37

SC34EK 序列中 Z 为非天然的正亮氨酸 (Nle) 以替代甲硫氨酸 (Met), 避免侧链巯基的氧化性; Chol: 胆固醇分子; WeEWD RKINNYTSLIHSLIEESQNQQeKNEkELL: 序列中的小写字母 e 和 k 分别代表 D 型谷氨酸和赖氨酸; 表中 C 肽红色序列代表口袋结合区序列 (PBD), 蓝色代表脂膜结合区序列 (LBD), N 肽序列中的绿色代表 N-trimer 的疏水性口袋形成序列

口袋区, 由 N 肽 C 端的 17 个氨基酸残基构成, 6-HB 结构中, C34 N 端的 3 个残基 (Trp⁶²⁸、Trp⁶³¹ 和 Ile⁶³⁵) 的疏水性侧链结合到这个口袋区中, 它们对 6-HB 稳定性及抗融合活性均起到十分关键的作用 (图 3)。同时, 由于特定结构的小分子化合物也可以通过与口袋区结合而产生抑制融合活性, 因而使得口袋区成为引人注目的小分子融合抑制剂作用靶标^[44]。

应用分子对接技术, Debnath 等^[45]筛选了一个含 20 000 个有机分子的化合物库, 发现 16 个化合物能够与疏水性口袋区达到最佳拟合, 进一步的生物活性检测, 最终发现两个化合物 ADS-J1 和 ADS-J2 (图 4) 显示了一定的抑制 HIV-1 细胞融合活性, IC₅₀ 值分别为 4.95 和 21.85 μg·mL⁻¹。

Jiang 等^[46]报道了两个结构简单的吡咯衍生物 NB-2 和 NB-64 (图 4), 它们具有抑制 HIV-1 细胞融合活性, EC₅₀ 值分别为 1.04 和 2.21 μmol·L⁻¹。它们以 N-trimer 的疏水性口袋区为作用靶标, 抑制 gp41 6-HB 形成。随后, Liu 等^[47]以 NB-2 和 NB-64 为苗头化合物进行优化, 设计合成了 42 个新结构吡咯衍生物, 经生物活性测试, 发现 11 个化合物同样显示了微摩尔水平的抑制 HIV 复制活性。其中活性最好的化合物 A₁₂ (EC₅₀ = 0.69 μmol·L⁻¹) (图 4) 经分子对接发现只是部分占据了疏水口袋空间, 表明增大 A₁₂ 的分子大小有可能得到活性更高的化合物。最近, Katritzky 等^[48]报道了一系列活性更高的呋喃衍生物 11a-o (图 4), 它们比 NB-2 和 NB-64 具有更大的分子体积, 能够占据疏水口袋的更大空间。其中活性最高的 3 个化合物 (11a, 11b, 11d) 抑制 HIV-1 复制 (EC₅₀ 值小于 100 nmol·L⁻¹), 比 NB-2 和 NB-64 提高了 20 多倍。

Frey 等^[49]应用基于蛋白靶标的高通量筛选方法, 发现了一系列小分子化合物具有抑制 HIV-1 融合活性, 如化合物 5M038、5M041 及 6M007 (图 4), 它们抑制 HIV-1 细胞融合, IC₅₀ 值分别为 38、18 和

39 μmol·L⁻¹。

Lee-Huang 等^[50]报道了两种从橄榄叶中提取出来的天然小分子化合物橄榄苦甙 (oleuropein, Ole) 和羟基酪醇 (hydroxytyrosol, HT), 它们能够与 N-trimer 的疏水口袋结合, 抑制 HIV-1 复制, IC₅₀ 分别为 73 和 68 nmol·L⁻¹, 抑制 6-HB 形成, EC₅₀ 分别为 66 和 58 nmol·L⁻¹。

4 总结与展望

T-20 的发现开辟了利用肽类药物控制 HIV-1 的新领域。尽管由于其自身的一些缺陷及不足, 限制了 T-20 更广泛的应用。但是, 由于膜融合是 HIV-1 进入靶细胞的关键步骤, 因此, 融合抑制剂的研究, 不仅能够提供新的抗 HIV 感染化合物, 而且, 研究结果对于进一步明确膜融合分子机制以及揭示 gp41 在膜融合状态下的实际结构, 具有重要意义。目前, 对于新结构融合抑制剂研究, C 肽仍然是研究最多的品种, 重点在于克服 T-20 耐药性。通过对天然 HR2 序列进行结构改造, 近年来在抑制 T-20 耐药性研究方面已经取得了显著进展, 得到了一系列能够有效抑制 T-20 耐药毒株的新化合物进入临床试验。同时, HR2 功能区范围不断被拓展, 从 N 端 PBD 上游到 C 端邻近病毒包膜的近膜外侧区 (membrane proximal external region, MPER) 序列^[51-53], 均显示出对 C 肽的抑制活性及 6-HB 稳定性具有特定作用。由于 HIV-1 膜融合实际过程中 6-HB 的结构还不清楚, 通过对 C 肽的研究必将增进对这一过程真实情况的了解。

临床上, T-20 与其他类型的抗 HIV-1 药物联合使用以降低其耐药性突变几率^[54]。最近, Pan 等^[13, 55]发现将 Sifuvirtide、T-1144 等与 T-20 组合使用能够产生很好的协同效果, 对 T-20 敏感毒株及耐药性毒株都具有很强的抑制活性, 表明不同的融合抑制剂联用也能起到协同效果。N 肽由于其作用和结构特点, 多数活性低于 C 肽类抑制剂, 而活性好的三聚体 N 肽分子量大, 离实际应用还有较大距离。

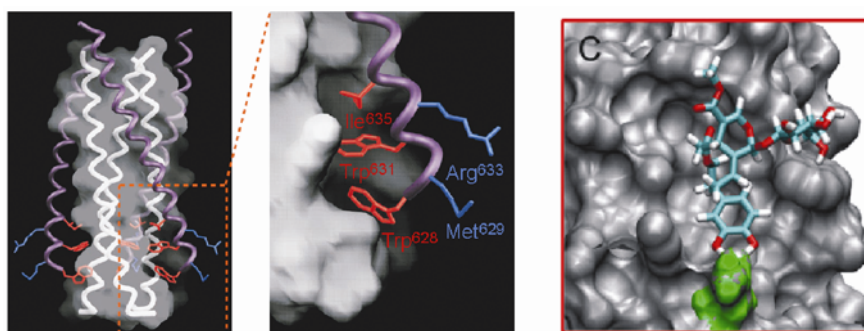


图 3 gp41 疏水性口袋以及小分子与口袋区的结合^[43,44]

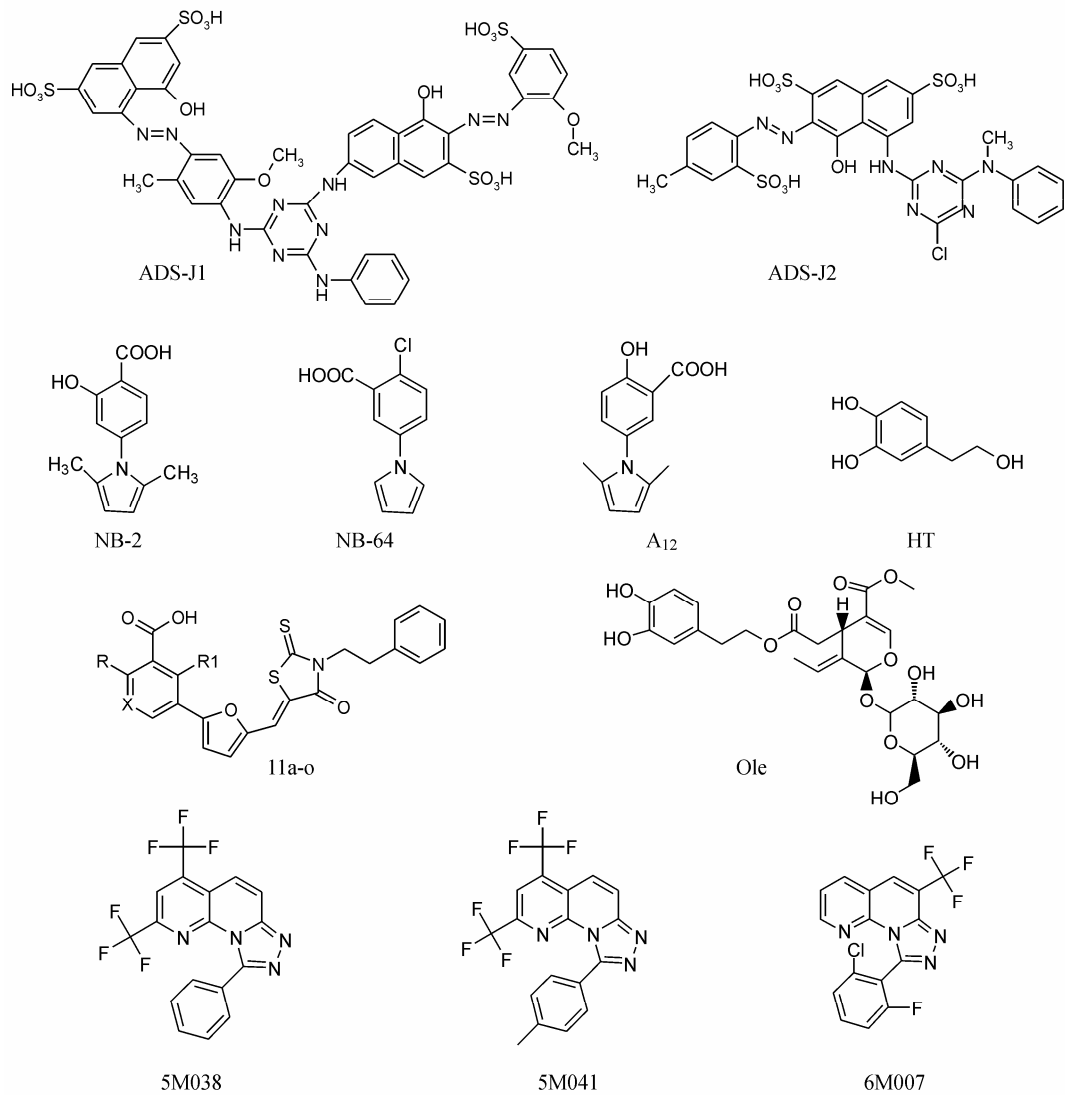


图 4 作用于 gp41 N-trimer 口袋区的小分子融合抑制剂

VIRIP 的发现不仅提供了一种天然的药物先导物, 而且表明融合肽 (FP) 可能作为抗融合药物作用的新靶标^[56-58]。由于 gp41 融合肽的高度保守性, 因此不易产生耐药突变。小分子融合抑制剂尽管具有口服生物利用度等优势, 但其活性与多肽类相比还有很大差距, 能否研发为药物有赖于对现有小分子的改造以及对其作用靶标结构的深入研究^[59]。

总之, 随着对 gp41 结构及功能认识的进一步深化, HIV-1 融合抑制剂种类日益增多, 必将导致对 HIV-1 融合机制总体认识的提高, 进而产生新的理论和思路, 指导理性的融合抑制剂设计。

References

- [1] UNAIDS. AIDS epidemic update; December 2007. Report nr UNAIDS/07.27E/JC1322E.
- [2] <http://www.primeboost3.org>.
- [3] Doms RW, Trono D. The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield [J]. *Genes Dev*, 2000, 14: 2677-2688.
- [4] Moore JP, Doms RW. The entry of entry inhibitors: a fusion of science and medicine [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10598-10602.
- [5] Chan DC, Fass D, Berger JM, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein [J]. *Cell*, 1997, 89: 263-273.
- [6] Naider F, Anglister J. Peptides in the treatment of AIDS [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2009, 19: 473-482.
- [7] Lu J, Deeks S, Hoh R, et al. Rapid emergence of enfuvirtide resistance in HIV-1 infected patients results of a clonal analysis [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2006, 43: 60-64.
- [8] Clavel F, Hance AJ. HIV drug resistance [J]. *N Engl J Med*, 2004, 350: 1023-1035.
- [9] Colman P. New antivirals and drug resistance [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 95-118.

- [10] Shafer R, Schapiro J. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART [J]. *AIDS Rev*, 2008, 10: 67-84.
- [11] Melby T, Demasi R, Cammack N, et al. Evolution of genotypic and phenotypic resistance during chronic treatment with the fusion inhibitor T-1249 [J]. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 2007, 23: 1366-1373.
- [12] Martin-Carbonero L. Discontinuation of the clinical development of fusion inhibitor T-1249 [J]. *AIDS Rev*, 2004, 6: 61.
- [13] Pan C, Cai L, Lu H, et al. Combinations of the first and next generation HIV fusion inhibitors exhibit highly potent synergistic effect against enfuvirtide-sensitive and resistant HIV-1 strains [J]. *J Virol*, 2009, 83: 7862-7872.
- [14] Dwyer JJ, Wilson KL, Davison DK, et al. Design of helical, oligomeric HIV-1 fusion inhibitor peptides with potent activity against enfuvirtide-resistant virus [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 12772-12777.
- [15] He Y, Xiao Y, Song H, et al. Design and evaluation of sifuvirtide, a novel HIV-1 fusion inhibitor [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 11126-11134.
- [16] Wang R, Yang L, Wang Y, et al. Sifuvirtide, a potent HIV fusion inhibitor peptide [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 382: 540-544.
- [17] He Y, Cheng J, Lu H, et al. Potent HIV fusion inhibitors against enfuvirtide-resistant HIV-1 strains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 16332-16337.
- [18] He Y, Cheng J, Li J, et al. Identification of a critical motif for the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gp41 core structure: implications for designing novel anti-HIV fusion inhibitors [J]. *J Virol*, 2008, 82: 6349-6358.
- [19] Otaka A, Nakamura M, Nameki D, et al. Remodeling of gp41-C34 peptide leads to highly effective inhibitors of the fusion of HIV-1 with target cells [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2002, 41: 2937-2940.
- [20] Nishikawa H, Nakamura S, Kodama E, et al. Electrostatically constrained alpha-helical peptide inhibits replication of HIV-1 resistant to enfuvirtide [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2009, 41: 891-899.
- [21] Naito T, Izumi K, Kodama E, et al. SC29EK, a peptide fusion inhibitor with enhanced alpha-helicity, inhibits replication of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 1013-1018.
- [22] Oishi S, Ito S, Nishikawa H, et al. Design of a novel HIV-1 fusion inhibitor that displays a minimal interface for binding affinity [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 388-391.
- [23] Qi Z, Shi W, Xue N, et al. Rationally designed anti-HIV peptides containing multifunctional domains as molecule probes for studying the mechanisms of action of the first and second generation HIV fusion inhibitors [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 30376-30384.
- [24] Shi W, Qi Z, Pan C, et al. Novel anti-HIV peptides containing multiple copies of artificially designed heptad repeat motifs [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 374: 767-772.
- [25] Shafer R, Schapiro J. HIV-1 drug resistance mutations: an updated framework for the second decade of HAART [J]. *AIDS Rev*, 2008, 10: 67-84.
- [26] Ray N, Blackburn LA, Doms RW. HR-2 mutations in human immunodeficiency virus type 1 gp41 restore fusion kinetics delayed by HR-1 mutations that cause clinical resistance to enfuvirtide [J]. *J Virol*, 2009, 83: 2989-2995.
- [27] Cai L, Jiang SB. Drug-resistant viruses may repair impaired fitness by mutations outside the drug target site [J]. *Future Microbiol*, 2009, 4: 507-509.
- [28] Izumi K, Kodama E, Shimura K, et al. Design of peptide-based inhibitors for human immunodeficiency virus type 1 strains resistant to T-20 [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 4914-4920.
- [29] Zhang H, Schneider SE, Bray BL, et al. Process development of TRI-999, a fatty-acid-modified HIV fusion inhibitory peptide [J]. *Org Proc Res Dev*, 2008, 12: 101-110.
- [30] Wexler-Cohen Y, Shai Y. Demonstrating the C-terminal boundary of the HIV 1 fusion conformation in a dynamic ongoing fusion process and implication for fusion inhibition [J]. *FASEB J*, 2007, 21: 3677-3684.
- [31] Ingallinella P, Bianchia E, Ladwa NA, et al. Addition of a cholesterol group to an HIV-1 peptide fusion inhibitor dramatically increases its antiviral potency [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 5801-5806.
- [32] Wild C, Oas T, McDaniel C, et al. A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 10537-10541.
- [33] Eckert DM, Kim PS. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 11187-11192.
- [34] Bianchi E, Finotto M, Ingallinella P, et al. Covalent stabilization of coiled coils of the HIV gp41 N region yields extremely potent and broad inhibitors of viral infection [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 12903-12908.
- [35] Root MJ, Kay MS, Kim PS. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor [J]. *Science*, 2001, 291: 884-888.
- [36] Wexler-Cohen Y, Shai Y. Membrane-anchored HIV-1 N-heptad repeat peptides are highly potent cell fusion inhibitors via an altered mode of action [J]. *PLoS Pathog*, 2009, 5:

- e1000509.
- [37] Dwyer JJ, Wilson KL, Martin K, et al. Design of an engineered N-terminal HIV-1 gp41 trimer with enhanced stability and potency [J]. *Protein Sci*, 2008, 17: 633–643.
- [38] Munch J, Standker L, Adermann K, et al. Discovery and optimization of a natural HIV-1 entry inhibitor targeting the gp41 fusion peptide [J]. *Cell*, 2007, 129: 263–275.
- [39] Eckert DM, Malashkevich VN, Hong LH, et al. Inhibiting HIV-1 entry: discovery of *D*-peptide inhibitors that target the gp41 coiled-coil pocket [J]. *Cell*, 1999, 99: 103–115.
- [40] Welch BD, VanDemark AP, Heroux A, et al. Potent *D*-peptide inhibitors of HIV-1 entry [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 16828–16833.
- [41] Gaston F, Granados GC, Madurga S, et al. Development and characterization of peptidic fusion inhibitors derived from HIV-1 gp41 with partial *D*-amino acid substitutions [J]. *ChemMedChem*, 2009, 4: 570–581.
- [42] Horne WS, Johnson LM, Ketas TJ, et al. Structural and biological mimicry of protein surface recognition by α/β -peptide foldamers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 14751–14756.
- [43] Bautista AD, Stephens OM, Wang L, et al. Identification of a β^3 -peptide HIV fusion inhibitor with improved potency in live cells [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19: 3736–3738.
- [44] Chan DC, Chutkowski CT, Kim PS. Evidence that a prominent cavity in the coiled coil of HIV type 1 gp41 is an attractive drug target [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 15613–15617.
- [45] Debnath AK, Radigan L, Jiang SB. Structure-based identification of small molecule antiviral compounds targeted to the gp41 core structure of the human immunodeficiency virus [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 3203–3209.
- [46] Jiang SB, Lu H, Liu S, et al. *N*-substituted pyrrole derivatives as novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitors that interfere with the gp41 six-helix bundle formation and block virus fusion [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 4349–4359.
- [47] Liu K, Lu H, Hou L, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of *N*-carboxyphenylpyrrole derivatives as potent HIV fusion inhibitors targeting gp41 [J]. *J Med Chem*, 2008, 51: 7843–7854.
- [48] Katritzky AR, Tala SR, Lu H, et al. Design, synthesis, and structure-activity relationship of a novel series of 2-aryl 5-(4-oxo-3-phenethyl-2-thioxothiazolidinylidene)methyl)furans as HIV-1 entry inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 7631–7639.
- [49] Frey G, Rits-Volloch S, Zhang X, et al. Small molecules that bind the inner core of gp41 and inhibit HIV envelope-mediated fusion [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 13938–13943.
- [50] Lee-Huang S, Huang PL, Zhang D, et al. Discovery of small-molecule HIV-1 fusion and integrase inhibitors oleuropein and hydroxytyrosol: Part I. Fusion inhibition [J]. *Biochem Biophys Research Comm*, 2007, 354: 872–878.
- [51] Montero M, van Houten N, Wang X, et al. The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72: 54–84.
- [52] Noah E, Biron Z, Naider F, et al. The membrane proximal external region of the HIV-1 envelope glycoprotein gp41 contributes to the stabilization of the six-helix bundle formed with a matching N' peptide [J]. *Biochemistry*, 2008, 47: 6782–6792.
- [53] Champagne K, Shishido A, Root MJ. Interactions of HIV-1 inhibitory peptide T20 with the gp41 N-HR coiled coil [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284: 3619–3627.
- [54] Quinones-Mateu M, Moore-Dudley D, Jegede O, et al. Viral drug resistance and fitness [J]. *Adv Pharmacol*, 2008, 56: 258–296.
- [55] Pan C, Lu H, Qi Z, et al. Synergistic efficacy of combination of enfuvirtide and sifuvirtide, the first and next generation HIV fusion inhibitors [J]. *AIDS*, 2009, 23: 639–641.
- [56] Qiang W, Weliky DP. HIV fusion peptide and its cross-linked oligomers: efficient syntheses, significance of the trimer in fusion activity, correlation of strand conformation with membrane cholesterol, and proximity to lipid headgroups [J]. *Biochemistry*, 2009, 48: 289–301.
- [57] Cohen T, Pevsner-Fischer M, Cohen N, et al. Characterization of the interacting domain of the HIV-1 fusion peptide with the transmembrane domain of the T-cell receptor [J]. *Biochemistry*, 2008, 47: 4826–4833.
- [58] Barz B, Wong TC, Kosztin I. Membrane curvature and surface area per lipid affect the conformation and oligomeric state of HIV-1 fusion peptide: a combined FTIR and MD simulation study [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1778: 945–953.
- [59] Balogh E, Wu D, Zhou G, et al. NMR second site screening for structure determination of ligands bound in the hydrophobic pocket of HIV-1 gp41 [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 2821–2823.