

构象锁定 HIV-1 融合抑制剂的合成及抗 HIV-1 活性研究

郭叶^a 傅莉莉^b 范晓文^a 史宣玲^{*,b}^(a) 包头医学院药学院 包头 014060^(b) 清华大学医学院 艾滋病综合研究中心 北京 100084

摘要 西夫韦肽(SFT)是一种有效抗 HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus-1)融合抑制剂, 它比已上市融合抑制药物 T20 拥有更高的药效及药代稳定性, 目前已完成了 IIb 临床实验. 以西夫韦肽为模板, 通过构象锁定策略将多肽中原有的盐桥替换为共价键合成了 SFT 订书肽 SFT-1 和 SFT-2. 产物结构经圆二光谱确认形成了 α -螺旋. 对所有合成多肽进行了抗 HIV-1 活性检测, 结果表明 SFT 订书肽对 7 个 HIV-1 假病毒株抑制活性均高于 SFT, 其中 SFT-1 对 B'亚型和 B'C 重组亚型病毒株抑制活性最高, SFT-2 对 B、CRF01_AE 和 CRF08_BC 亚型病毒株抑制活性最高.

关键词 西夫韦肽; HIV 融合抑制剂; 构象锁定; 抗 HIV-1 活性

Synthesis and Anti-HIV-1 Activity of Stapled HIV-1 Fusion Inhibitors

Guo, Ye^a Fu, Lili^b Fan, Xiaowen^a Shi, Xuanling^{*,b}^(a) School of Pharmacy, Baotou Medical College, Baotou 014060^(b) Comprehensive AIDS Research Center, School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084

Abstract Sifuvirtide (SFT) is a potent anti-HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) fusion inhibitor and it shows higher potency and pharmacokinetic stability than the approved fusion inhibitor T20. At present, sifuvirtide has completed the phase IIb clinical trial in China. In this study, SFT-1 and SFT-2 were synthesized via all-hydrocarbon cross-linking system with replacing the original salt bridge in SFT by hydrocarbon covalent bond, using sifuvirtide as template. The anti-HIV-1 activity was evaluated for all synthetic peptides. The results indicated that SFT stapled peptides displayed high inhibitory activity against seven HIV-1 pseudovirus strains, and SFT-1 showed the highest inhibitory activity against B' and B'C subtype virus strains, SFT-2 showed the highest inhibitory activity against B, CRF01_AE and CRF08_BC subtype virus strains.

Keywords sifuvirtide; HIV-1 fusion inhibitor; hydrocarbon stapling; anti-HIV-1 activity

西夫韦肽(Sifuvirtide, SFT)^[1]是一种有效的 HIV-1 (human immunodeficiency virus-1) 融合抑制剂(fusion inhibitors). SFT 含有 36 个氨基酸, 序列衍生于 HIV-1 E 亚型包膜糖蛋白 gp41C 端重复序列(C-terminal heptad repeat, CHR), 经计算机三维结构模拟分析后, 多肽序列中对于活性和稳定性无关的 i 和 i+4 位置氨基酸被替换成谷氨酸和精氨酸, 进而形成盐桥稳定结构, 并在 C 端引入谷氨酸 N 端引入丝氨酸增加 SFT 稳定性^[2]. SFT 较目前唯一由 FDA (US Food and Drug Administration) 批准上市的 HIV-1 多肽融合抑制剂 T20 (Enfuvirtide) 拥有以下优点^[3-5]: 抗 HIV-1 活性提高了约 20 倍, 克服 T20 单次注射剂量大问题, 降低用药费用; 在人体内的

半衰期提高了约 3.4 倍, 克服了 T20 频繁注射问题, 提高了患者生活质量; 作用靶点与 T20 不同, 克服了 T20 耐药性的问题. 目前, SFT 已完成 IIb 临床试验, 并被证明抗 HIV-1 活性显著^[6]. 因此, SFT 被认为是继 T20 之后最有潜力成功上市的 HIV-1 融合抑制剂^[7]. 在这一背景下, 发展具有更高抗 HIV-1 活性的 SFT 类似物成为当前 HIV 融合抑制剂研究的重要问题之一. 本工作通过在 SFT 序列中引入构象锁定合成了一系列具有稳定 α -螺旋结构的 SFT 订书肽, 并对其二级结构和抗 HIV-1 假病毒活性进行测试, 活性测试结果表明 SFT 订书肽对 HIV-1 标准株和中国流行株假病毒的抑制活性均高于 SFT.

* Corresponding author. E-mail: shixuanlingsk@mail.tsinghua.edu.cn

Received October 25, 2017; revised January 8, 2018; published online January 18, 2018.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 21602121), the Natural Science Foundation of Inner Mongolia (No. 2016BS0201) and the Doctoral Science Foundation of Baotou Medical College (No. BSJJ201620).

国家自然科学基金(No. 21602121)、内蒙古自然科学基金(No. 2016BS0201)和包头医学院博士科学基金(No. BSJJ201620)资助项目.

1 结果与讨论

1.1 设计与合成

SFT 二级结构被发现在溶液中是无规则卷曲结构,而当体系中存在 N36 多肽(SFT 作用靶点 NHR 区域截取序列)时, SFT 可以与 N36 形成稳定的 α -螺旋结构^[2]. 据此实验结果, 我们推测 SFT 与靶点作用时需要由无规则卷曲结构变为 α -螺旋结构. 因此, 我们设计提前使 SFT 类似物形成稳定的 α -螺旋结构, 降低其与靶点结合时构象变化所需能量来提高其抑制 HIV-1 的活性.

构象锁定是由 Verdine 组^[8]发展用于合成具有 α -螺旋结构多肽的主要方法之一. 这种方法通过将多肽序列中 $i, i+4$ 位置残基替换为侧链末端含有双键的非天然氨基酸 S_5 , 再经烯烃复分解反应将两个 S_5 侧链连接形成类似订书钉的结构促使多肽 α -螺旋构象锁定. 构象锁定较其它锁定策略具有显著提高多肽螺旋程度^[9]、使用便捷(固相多肽合成所需的 Fmoc- S_5 -OH 已经商品化)^[10]和应用范围广^[11~14]的优点. 这里, 我们选取构象锁定来合成具有 α -螺旋结构的 SFT 类似物. 我们设计在 SFT 序列中按照图 1 所示分别进行 1 次锁定和 2 次锁定得到 SFT-1 和 SFT-2. SFT-1 中锁定引入的位置位于 SFT 序列中部暴露在溶剂面的用于形成盐桥结构的 18 位 Arg 和 22 位 Glu. SFT-2 中锁定引入的位置位于多肽的溶剂暴露面用于形成盐桥的两个位置 18 位 Arg 和 22 位 Glu, 25 位 Glu 和 29 位 Arg.

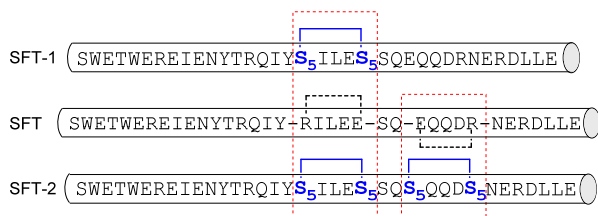
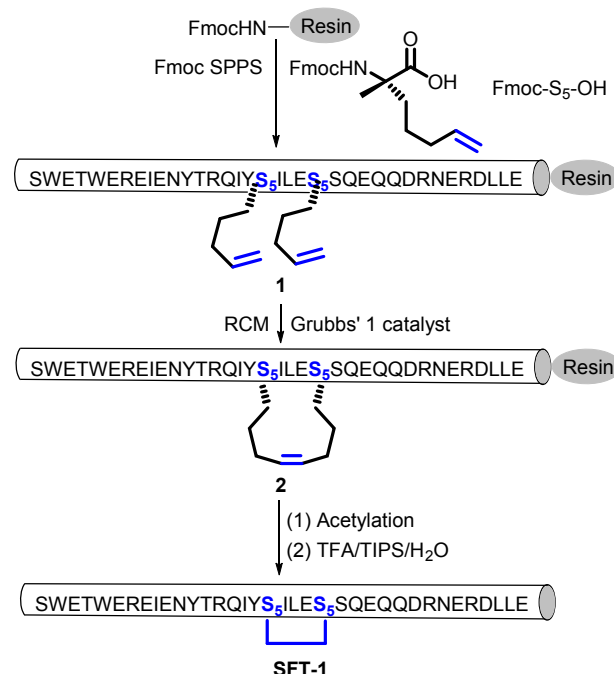


图 1 SFT 和 SFT 订书肽序列
Figure 1 Sequence of SFT and SFT stapled peptides

目标多肽 SFT-1 使用 Rink amide AM 树脂通过标准 Fmoc (9-fluorenyl-methyloxycarbonyl)固相多肽合成方法^[15]进行合成(Scheme 1). 按照设计引入锁定的位置分别将 18 位 Arg 和 22 位 Glu 替换为 Fmoc- S_5 -OH 在树脂上进行氨基酸缩合得到中间体 1. 然后使用 Grubbs' 1 代催化剂对中间体 1 进行烯烃复分解环关反应得到中间体 2. 对中间体 2 的 N 端进行乙酰化修饰后, 使用三氟乙酸(trifluoroacetic acid, TFA)切割试剂处理即可得到 SFT-1. 目标多肽 SFT-2 的合成采用与 SFT-1 类似的方法, 在第一个引入锁定的位置将两氨基酸全部替换为 Fmoc- S_5 -OH 后, 使用 Grubbs' 1 代催化剂处理进行第 1 次关环反应, 然后再进行剩余氨基酸的缩合. 所有氨基

酸在树脂上缩合完毕后再进行第 2 次关环反应、乙酰化修饰和切割得到 SFT-2. 经质谱鉴定及高效液相色谱(HPLC)纯化后得到纯度大于 95%的 SFT-订书肽 SFT-1 和 SFT-2.



图式 1 SFT-1 的合成路线
Scheme 1 Synthetic route for SFT-1

1.2 二级结构

SFT 和 SFT 订书肽均采用圆二光谱表征二级结构. 如图 2 所示, 圆二光谱中 SFT 订书肽在 195 nm 处有正吸收峰, 208 和 222 nm 处有负吸收峰, 与文献^[16]报道典型 α -螺旋结构的特征吸收峰位置一致, 表明 SFT 订书肽均形成了 α -螺旋结构. 但 SFT 在以上三处特征吸收峰位置处无吸收, 在 204 nm 处有吸收峰, 表明 SFT 是以无规则卷曲构象存在, 这与 He 课题组^[2]报道 SFT 是无规则卷曲结构一致. 这一结果说明构象锁定可以使 SFT 形成稳定的 α -螺旋结构. 根据螺旋度计算公式^[17]计算得到 SFT-1 和 SFT-2 的螺旋程度分别为 43.3% 和 35.9%.

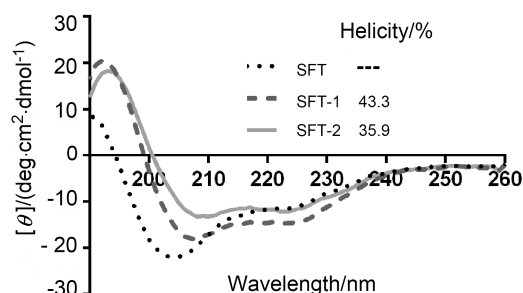


图 2 SFT 和 SFT-订书肽的二级结构
Figure 2 Secondary structure of SFT and SFT-stapled peptides

SFT-1 较 SFT-2 螺旋程度高说明只在多肽序列中 18Arg 和 22Glu 处引入 C—H 键锁定更有利于 SFT 形成 α -螺旋结构。

1.3 抗 HIV-1 假病毒活性

通过测定 HIV-1 假病毒中携带的报告基因荧光素酶催化底物后产生化学反应的发光强度, 得到 SFT 和 SFT 订书肽抑制 HIV-1 假病毒标准株(JRFL 和 HXB2)和中国流行株(CNE6, CNE11, CNE15, CNE30 和 CNE5)的中和活性(表 1)。由表 1 可见, SFT 对 5 个不同亚型 HIV-1 假病毒呈现纳摩尔级别的抑制活性, 这与文献报道 SFT 是广谱融合抑制剂一致。SFT 订书肽也对 7 个 HIV-1 假病毒均表现出纳摩尔级别的抑制活性, 且活性整体高于 SFT, 其中 SFT-1 对 7 个病毒株的抑制活性较 SFT 提高 1.2~8.3 倍, SFT-2 的活性较 SFT 提高 1.0~7.8 倍。这可能是由于 SFT 订书肽预先形成稳定的 α -螺旋结构减少了与靶点结合时的熵消耗, 从而提高其抗 HIV-1 假病毒中和活性。对 SFT-1 和 SFT-2 抗 HIV-1 假病毒活性进行统计学分析, 发现 SFT-1 对 CNE6、CNE11、CNE15 和 CNE30 假病毒株的抑制活性显著高于 SFT ($P<0.05$), 活性差异具有统计学意义, SFT-2 对 HXB2、JRFL、CNE15、CNE30 和 CNE5 假病毒抑制活性显著高于 SFT ($P<0.05$), 活性差异具有统计学意义。对比新合成融合抑制剂 SFT 锁定多肽对假病毒的抑制活性发现 SFT-1 对 CNE6、CNE11 和 CNE15 病毒株的抑制活性最强, 而 SFT-2 对 JRFL 和 HXB2 CNE30 和 CNE5 病毒株的抑制活性最强, 具体的构象锁定位置不同对于 SFT 结构和活性的影响有待进一步研究。

2 结论

采用构象锁定方法, 以 Fmoc 保护氨基酸为原料, 经过多肽固相缩合反应合成出了 SFT 及新的 SFT 类似物 SFT 订书肽。目标化合物的圆二光谱证明所合成的 SFT 订书肽均具有 α -螺旋结构, 其中 SFT-1 的螺旋程度最高。抗 HIV-1 假病毒活性研究表明 SFT 订书肽对 7 个假病毒的抑制活性整体高于 SFT, 其中 SFT-1 抗 CNE6,

CNE5 和 CN15 的活性较 SFT 显著提升了 1.6~8.3 倍, SFT-2 抗 CNE30, CNE5-CRF01, JRFL 和 HXB2 的活性较 SFT 显著提升 1.6~4.3 倍。综合分析圆二色谱和抗 HIV-1 假病毒活性数据表明提高 SFT 的螺旋性可以提高其对 6 种不同亚型 HIV-1 假病毒的抑制活性。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

高效液相色谱为岛津高效液相色谱, 质谱仪为 Agilent 1200 型。Fmoc 保护的氨基酸购自上海吉尔生化生物科技公司, Fmoc-S₅-OH 购自北京欧凯纳斯试剂公司, Rink amide 树脂购自天津南开合成, 其余试剂均为市售分析纯。HIV 全长膜蛋白质粒 pcDNA3.1+购自 Invitrogen。

3.2 实验方法

3.2.1 SFT 的合成

使用 200 mg Rink amide 树脂(取代度为 0.3 mmol·g⁻¹)通过 Fmoc 固相合成技术合成 SFT, 氨基酸的投量为 4 equiv., 缩合剂 HCTU [*O*-(6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate] 的投量为 3.8 equiv., DIEA (*N,N*-diisopropylethylamine)的投量为 8 equiv. [18~20]。待多肽在树脂上组装完毕后, 脱去最后一个氨基酸的 Fmoc 保护基使用 3 mL 含 10%醋酸酐(0.3 mL)和 10% DIEA (0.3 mL)的 DMF (*N,N*-dimethylformamide)溶液对其进行乙酰化修饰。反应 10 min 后, 洗涤树脂并加入 10 mL 含 2.5%水(0.25 mL), 2.5% TIPS (0.25 mL)的 TFA 切割试剂反应 3 h。N₂ 处理切割试剂后, 加入冰乙醚沉淀得到白色粉末状粗肽, 使用 HPLC 和 ESI-MS 对其进行分析鉴定和纯化, 得到 73.1 mg 白色絮状固体, 分离产率为 25.8%。ESI-MS *m/z*: 4726.9 ([*M*+*H*]⁺), 1576.3 ([*M*+3*H*]³⁺), 1182.5 ([*M*+4*H*]⁴⁺), 946.3 ([*M*+5*H*]⁵⁺), 788.7 ([*M*+6*H*]⁶⁺)。

3.2.2 SFT-1 的合成

使用与合成 SFT 相同投量的树脂, 氨基酸和缩合剂

表 1 SFT 和 SFT-订书肽抗 HIV-1 假病毒活性^a
Table 1 Inhibitory activity of SFT and SFT-stapled peptide against HIV-1 pseudovirus

Pseudovirus	Subtype	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)		<i>P</i> 1	<i>t</i> 1	IC ₅₀ /(nmol·L ⁻¹)		<i>P</i> 2	<i>t</i> 2
		SFT	SFT-1			SFT-2			
HXB2	B	0.47±0.13	0.27±0.04	0.064	2.547	0.14±0.04	*	0.014	4.202
JRFL	B	8.18±1.29	5.88±1.48	0.112	2.029	1.92±1.01	*	0.003	6.618
CNE6	B'	4.04±0.55	1.98±0.56	0.010	4.546	3.74±1.12		0.698	0.416
CNE11	B'	7.38±1.31	4.57±0.72	0.031	3.256	7.45±2.24		0.956	0.047
CNE15	B'C	40.04±1.77	4.84±1.10	0.000	29.254	5.12±0.16		0.000	34.033
CNE30	CRF08_BC	51.05±5.15	29.67±4.27	0.005	5.535	18.89±4.82	*	0.001	7.897
CNE5	CRF01_AE	7.36±0.08	6.25±1.71	0.324	1.123	4.48±1.77	*	0.048	2.815

^a 每个多肽的抑制活性均被测量 3 次; *表示活性最高多肽; *P*1 和 *t*1, *P*2 和 *t*2 分别对应于 SFT 和 SFT-1, SFT 和 SFT-2 的统计学分析。

通过 Fmoc 固相合成技术制备 SFT-1. 缩合 Fmoc-S₅-OH 时, 氨基酸的投量为 2 equiv., HATU [*O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetramethyluronium hexafluorophosphate] 的投量为 1.9 equiv., HOAt (1-hydroxy-7-azabenzotriazole) 的投量为 2 equiv., DIEA 的投量为 4 equiv., 反应时间为 2 h. 待所有氨基酸组装完毕后, 加入 21 mg Grubbs' 1 代催化剂的二氯甲烷(dichloromethane, DCM) 溶液避光反应 2 h. 烯烃复分解反应结束后再进行乙酰化修饰, 切割. 经 HPLC 和 ESI-MS 对其进行分析鉴定和纯化后得到 59.5 mg 白色絮状固体, 分离产率为 21.4%. ESI-MS *m/z*: 4635.1 ([M+H]⁺), 1545.7 ([M+3H]³⁺), 1159.6 ([M+4H]⁴⁺), 927.9 ([M+5H]⁵⁺).

3.2.3 SFT-2 的合成

使用与合成 SFT-1 相同投量的树脂, 氨基酸, Fmoc-S₅-OH 和缩合剂通过 Fmoc 固相合成技术制备 SFT-2. 待前两个 Fmoc-S₅-OH 缩合完毕后, 加入 21 mg Grubbs' 1 代催化剂的 DCM 溶液进行第一次烯烃复分解反应. 反应后洗涤树脂继续进行剩余氨基酸的缩合. 所有氨基酸缩合完毕后, 再次加入 Grubbs' 1 一代催化剂进行第二次烯烃复分解反应. 反应结束后进行乙酰化修饰, 切割. 经 HPLC 和 ESI-MS 对其进行分析鉴定和纯化后得到 51.9 mg 白色絮状固体, 分离产率为 18.6%. ESI-MS *m/z*: 4657.6 ([M+H]⁺), 1553.2 ([M+3H]³⁺), 1165.2([M+4H]⁴⁺), 932.3 ([M+5H]⁵⁺).

3.2.4 二级结构测定

将 SFT, SFT-1 和 SFT-2 分别溶于 1X 磷酸盐缓冲溶液(pH 7.4)中配制为 50 μmol/L 的待测样品. 样品池为 1 mm 的石英比色皿. Jasco-715 圆二光谱仪的测量参数为波长 185~260 nm, 步长 0.5 nm, 带宽 1 nm, 累计收集 3 次数据. 在 25 °C 下, 使用圆二色谱仪分别采集 SFT, SFT-1 和 SFT-2 的椭圆度数据, 并根据螺旋度计算公式计算各多肽的螺旋度.

3.2.5 抗 HIV-1 假病毒活性测试

将 SFT, SFT-1 和 SFT-2 溶于二甲基亚砜(DMSO)中分别制备为 1 mg/L 储存液. 使用 CNE6, CNE11, CNE15, CNE30, CNE5, JRFL, HXB2 HIV-1 假病毒(含有荧光素酶报告基因)检测系统分别对 3 条多肽检测, 通过测定 HIV-1 假病毒中携带的报告基因荧光素酶催化底物后, 产生化学反应的发光强度, 得到多肽抑制 HIV-1 假病毒感染易感细胞 GHOST(3)X4/R5 的中和活性. 将不同浓度的 SFT, SFT-1 和 SFT-2 置于 96 孔板中, 每孔加入 200 TCID₅₀ (50% tissue culture infectious dose)的 HIV-1 假病毒,

同时设立空白对照组和阴性对照组, 再将 96 孔板置于 37 °C 恒温培养箱中孵化 1 h. 抑制剂作用后, 每孔加入 100 μL 已处理好的 GHOST(3)X4/R5 细胞(1.5×10^5 个·mL⁻¹), 继续孵化 60 h. 弃去 96 孔板上清培养基, 加入 100 μL 新鲜磷酸盐缓冲溶液和 50 μL 荧光素酶检测试剂避光反应 2 min; 裂解 96 孔板中的细胞, 使用化学发光仪测定发光强度, 并计算抑制率.

辅助材料(Supporting Information) SFT, SFT-1 和 SFT-2 的 MS 和 HPLC 谱图. 这些材料可以免费从本刊网站(<http://sioc-journal.cn/>)上下载.

References

- [1] Dai, S. J.; Dou, G. F.; Qiang, X. H.; Song, H. F.; Tang, Z. M.; Liu, D. S.; Liu, X. W.; Yang, L. M.; Zheng, Y. T.; Liang, Q. *Acta Pharmacol. Sin.* **2005**, *26*, 1274.
- [2] He, Y.; Xiao, Y.; Song, H.; Liang, Q.; Ju, D.; Chen, X.; Lu, H.; Jing, W.; Jiang, S.; Zhang, L. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 11126.
- [3] Tan, J. J.; Ma, X. T.; Liu, C.; Zhang, X. Y.; Wang, C. X. *Curr. Pharm. Des.* **2013**, *19*, 1810.
- [4] Tennyson, R. L.; Walker, S. N.; Ikeda, T.; Harris, R. S.; Kennan, A. J.; McNaughton, B. R. *ChemBioChem* **2016**, *17*, 1945.
- [5] Zhang, D.; Li, W.; Jiang, S. *Expert. Opin. Ther. Pat.* **2015**, *25*, 159.
- [6] Yu, F.; Lu, L.; Du, L. Y.; Zhu, X. J.; Debnath, A. K.; Jiang, S. B. *Viruses* **2013**, *5*, 127.
- [7] Yao, X.; Chong, H.; Zhang, C.; Waltersperger, S.; Wang, M.; Cui, S.; He, Y. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 6788.
- [8] Schafmeister, C. E.; Po, J.; Verdine, G. L. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 5891.
- [9] Wachter, F.; Morgan, A. M.; Godes, M.; Mourtada, R.; Bird, G. H.; Walensky, L. D. *Oncogene* **2017**, *36*, 2184.
- [10] Bird, G. H.; Mazzola, E.; Opoku-Nsiah, K.; Lammert, M. A.; Godes, M.; Neuberger, D. S.; Walensky, L. D. *Nat. Chem. Biol.* **2016**, *12*, 845.
- [11] Gao, S.; Guo, Y.; Li, H. Y.; Fang, G. M. *Prog. Chem.* **2014**, *26*, 100 (in Chinese). (高帅, 郭叶, 李海燕, 方葛敏, 化学进展, **2014**, *26*, 100.)
- [12] Hu, X.; He, Y.; Wu, L.; Hao, Y.; Wang, Z.; Zheng, W. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 5446.
- [13] Cui, H. K.; Qing, J.; Guo, Y.; Wang, Y. J.; Cui, L. J.; He, T. H.; Zhang, L. Q.; Liu, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21*, 3547.
- [14] Cui, H. K.; Zhao, B.; Li, Y.; Guo, Y.; Hu, H.; Liu, L.; Chen, Y. G. *Cell Res.* **2013**, *23*, 581.
- [15] Lau, Y. H.; de Andrade, P.; Wu, Y.; Spring, D. R. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 91.
- [16] Keeling, K. L.; Cho, O.; Scanlon, D. B.; Booker, G. W.; Abell, A. D.; Wegener, K. L. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 9731.
- [17] Wang, D. Y.; Chen, K.; Kulp III, J. L.; Arora, P. S. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 9248.
- [18] Fang, G. M.; Wang, J.-X.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *51*, 10347.
- [19] Fang, G. M.; Li, Y. M.; Shen, F.; Huang, Y. C.; Li, J. B.; Lin, Y.; Cui, H. K.; Liu, L. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 7645.
- [20] Zheng, J. S.; Tang, S.; Qi, Y. K.; Wang, Z. P.; Liu, L. *Nat. Protoc.* **2013**, *8*, 2483.

(Lu, Y.)