

文章编号:1005-0108(2026)02-0152-12

DOI:10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.20240172

# 基于卷曲螺旋组装策略的新型 HIV-1 多肽类融合抑制剂的研究进展

金义辉<sup>#</sup>, 黄妍<sup>#</sup>, 高鑫, 霍彩霞<sup>\*</sup>, 梁国栋<sup>\*</sup>

(内蒙古医科大学 药学院 基于化学生物学的候选药物设计与筛选重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010110)

**摘要:**人类免疫缺陷病毒(HIV)引发的获得性免疫缺陷综合征长期严重危害人类健康,抗 HIV 药物的研究从未停止。HIV 在侵入宿主细胞早期阶段需经历膜融合过程,其中包膜蛋白变构形成的六股螺旋束(6-HB)是驱动膜融合的核心结构,也是多肽类融合抑制剂发挥作用的关键靶点。目前已上市的多肽类抑制剂多为源自 HIV-1 包膜蛋白跨膜亚基 CHR 区域的 C 肽类抑制剂,如恩夫韦肽、艾博韦泰,但在临床使用过程中存在易产生耐药性以及对突变体抵抗力低等问题。源自 HIV-1 包膜蛋白跨膜亚基 NHR 区域的 N 肽作为新型多肽类融合抑制剂,因其独特的卷曲螺旋活性构象和作用机制,有望为解决已上市 C 肽类药物的临床局限提供新途径。因此,N 肽类融合抑制剂越来越受到研究者的重视,以组装卷曲螺旋活性构象为策略的研究方法逐步趋于成熟。本文综述了目前已报道的新型 N 肽类融合抑制剂的研究方法,以期新型抗病毒药物的设计提供参考。

**关键词:**人类免疫缺陷病毒;获得性免疫缺陷综合征;卷曲螺旋;多肽类融合抑制剂

中图分类号:R914

文献标志码:A

包膜病毒是一种具有脂质双层膜结构的病毒,主要由核酸、蛋白质及脂质构成,感染力较强,严重感染可导致死亡<sup>[1-2]</sup>。包膜病毒侵染宿主细

胞主要分为六步,即吸附、侵入、脱壳、遗传物质复制、组装和释放,其中吸附后的膜融合过程是决定感染成功与否的关键环节(图 1)<sup>[3-7]</sup>。

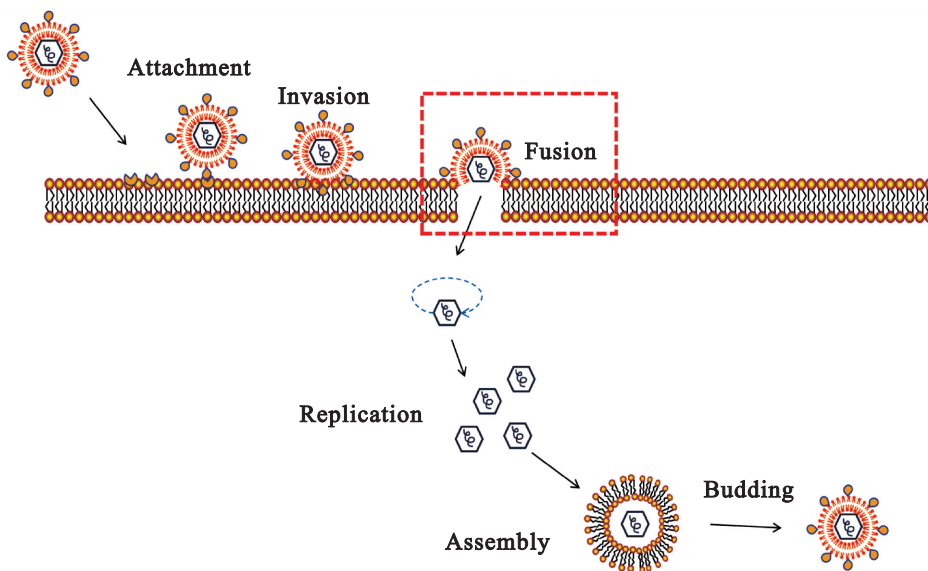


Figure 1 The process of virus invasion into host cells

收稿日期:2024-10-01

基金项目:内蒙古自治区重点研发和成果转化计划项目(2025KJHZ0064);内蒙古医科大学实验室开放基金项目(2024ZN26);内蒙古医科大学 2025 年大学生科技创新“英才培育”项目(YCPY2025005);内蒙古医科大学创客培育项目(101322025051);呼和浩特市基础研究与应用基础研究项目(2024-规-基-20)

作者简介:<sup>#</sup>作者贡献等同:金义辉(2001-),男(回族),内蒙古呼伦贝尔人,硕士研究生,E-mail:1900721114@qq.com;黄妍(2002-),女(汉族),内蒙古赤峰人,硕士研究生,E-mail:13150928695@163.com; \* 通信作者:霍彩霞(1970-),女(汉族),北京人,博士,高级工程师,主要从事新药开发与药物分子结构改造与优化,E-mail:hcxbm@126.com;梁国栋(1990-),男(汉族),内蒙古包头人,博士,高级工程师,主要从事抗病毒肽类药物发现与设计,E-mail:lgd08502214@163.com。

根据病毒包膜糖蛋白在膜融合前后构象的不同,可将包膜病毒分为 I、II、III 型,其中 I 型包膜病毒最为常见<sup>[8]</sup>。I 型代表性包膜病毒包括人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、中东呼吸综合征冠状病毒(middle east respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)、流感病毒(influenza virus)、新型冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)等,均能引发人类传染性疾病。

## 1 HIV-1 膜融合机制与融合抑制剂

HIV-1 侵入宿主细胞早期的膜融合过程主要由包膜蛋白介导,病毒首先识别宿主细胞表面的受体并与之结合,在辅助受体 CXCR4 或 CCR5 的参与下,包膜蛋白 gp120 亚基发生解离,引发另一个跨膜亚基 gp41 发生构象变化。gp41 的 N 端重复序列(N-terminal heptads repeat, NHR)优先组装形成具有疏水口袋的三螺旋卷曲结构(N-trimer),其下游 C 端重复序列(C-terminal heptads repeat, CHR)则向 NHR 反向折叠,以疏水作用、氢键、盐桥等与 N-trimer 结合,形成六股螺旋束(six-helix bundle, 6-HB)结构<sup>[9]</sup>。以上融合过程会释放大量能量,驱动病毒包膜与宿主细胞膜融合并形成融合孔,病毒遗传物质通过融合孔进入

宿主细胞,完成后续侵染步骤<sup>[10]</sup>。多项研究表明,6-HB 是 HIV-1 膜融合的核心结构,靶向 6-HB 可有效阻止膜融合过程<sup>[11]</sup>。因此,以 6-HB 结构域为靶点、能够抑制 HIV-1 侵染宿主细胞的化合物被称为融合抑制剂,主要包括多肽类、小分子类及疫苗类等<sup>[12]</sup>。

多肽类融合抑制剂通常根据序列来源与作用机制分为 C 肽和 N 肽两类。在 HIV-1 研究领域,第一个获批上市的融合抑制剂恩夫韦肽(enfuvirtide)属于 C 肽,其能够作用于 HIV-1 包膜蛋白跨膜亚基 gp41 的 NHR 区域,抑制 6-HB 形成,从而发挥抗病毒活性<sup>[13-14]</sup>。但随着多年的临床使用,恩夫韦肽逐渐产生用药依从性差、成本较高以及诱导耐药等缺点<sup>[15]</sup>。因此,设计能够解决恩夫韦肽临床应用缺陷的新型融合抑制剂成为当前研究热点,而发掘全新多肽先导化合物则为这类新药开发奠定了重要基础。目前,研究者主要聚焦于 C 肽类融合抑制剂的先导化合物筛选与结构修饰,但始终无法解决 C 肽类耐药性差、对突变体抑制力弱以及体内生物利用度低等问题<sup>[10,16-21]</sup>。与 C 肽相比,N 肽序列来源于 NHR 区域,可模拟 N-trimer 活性构象并以 CHR 为作用靶点,破坏内源性 6-HB 的形成,从而阻止病毒侵入宿主细胞(图 2)。

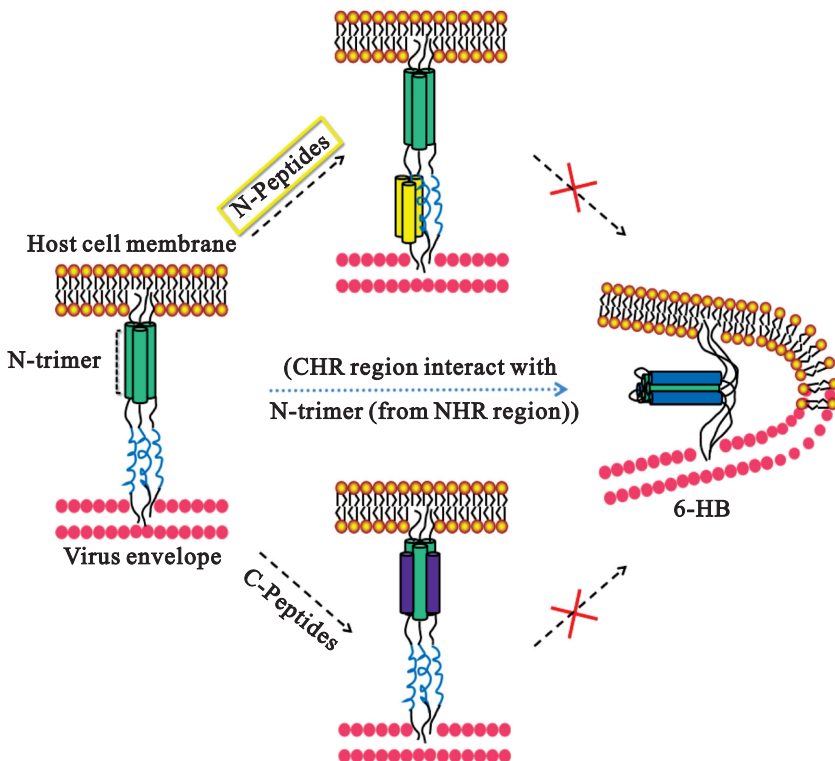


Figure 2 Schematic diagram of N-peptide and C-peptide blocking 6-HB formation

N 肽类融合抑制剂被视为具有新结构、新靶点、新作用机制的多肽类抑制剂,其深入开发有望解决 C 肽类抑制剂的临床应用限制<sup>[22]</sup>。

目前研究认为,N 肽类融合抑制剂需要组装为类似 N-trimer 的三螺旋活性构象,才能与 CHR 结合并阻断内源性 6-HB 形成。但直接来源于 NHR 区域的天然 N 肽在生理条件或溶液中无法自主组装,易发生聚集沉淀,导致稳定性差,抗 HIV-1 活性往往低于 C 肽<sup>[22-23]</sup>。针对此问题,研究者开发了一系列组装策略以克服 N 肽难以维持三螺旋构象的缺点,使其具有良好的理化性质,并能以 N-trimer 样活性结构作用于靶点,实现纳摩尔水平的抗病毒活性。相较于 C 肽,越来越多的新型 N 肽先导化合物还呈现出对多种耐药毒株抑制活性强、药物代谢动力学特性优良等优点<sup>[22,24-26]</sup>。本文作者综述了以组装卷曲螺旋活性构象为开发策略的新型 N 肽类融合抑制剂的研究进展,以期为新型抗 HIV-1 药物的研发提供参考。

## 2 基于位点突变组装卷曲螺旋活性构象的 N 肽研究策略

多肽序列位点突变是优化多肽结构的常用方法,也是 N 肽抑制剂早期的主要研究策略。通过规律性的位点突变,可帮助 N 肽构建 N-trimer 活性构象,进而与靶点结合发挥抑制作用。早在 2002 年,Bewley 等<sup>[27]</sup>以天然 N 肽 N36 为模版,将其 e、g 位的氨基酸残基分别突变为天然 C 肽 C34 中对应的 e、g 位残基,得到 N36<sub>Mut(e,g)</sub>(图 3),并通过超速离心、圆二色谱等实验证实,该突变体具有自组装成三螺旋结构的能力。随后,该团队通过牛痘病毒定量融合实验评价 N36<sub>Mut(e,g)</sub>抑制 HIV-1 侵染宿主细胞的能力,结果显示 N36<sub>Mut(e,g)</sub>的 IC<sub>50</sub>值可达 308 nmol·L<sup>-1</sup>,抑制活性是 N36 的 50 倍,由此证明,通过位点突变策略能够有效促进天然 N 肽形成三螺旋结构,从而显著提高抑制活性<sup>[28]</sup>。

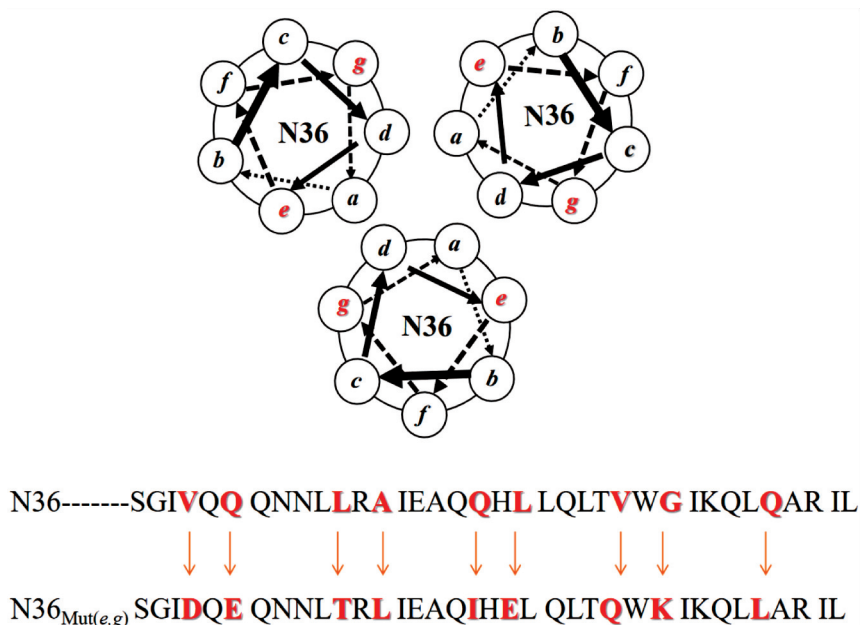


Figure 3 Site mutations strategy for designing coiled-coil N-peptide N36<sub>Mut(e,g)</sub>

近期研究证明,利用位点突变组装卷曲螺旋结构以提高抗病毒活性的策略,在疫苗类融合抑制剂的研究中也有应用。2023 年,Banach 等<sup>[29]</sup>以靶向抗体 VRC34.01 为模板,对其 VH\_T59Y、VH\_T59F、VH\_E2K、VH\_E2P 等部分进行位点突变,得到了一种螺旋度更高,与靶点结合表面积更大的优化变体疫苗 VRC34.01<sub>mm28</sub>,与模板抗体相比,其抗病毒效力提高了 10 倍,且对多种病

毒突变株具有更广泛的抑制活性。

因此,基于位点突变组装卷曲螺旋活性构象的研究策略,能够有效构建与靶点匹配的蛋白质/多肽高级活性构象,从而获得抗 HIV-1 活性更高的抑制剂。此策略不仅可以有效应用于 HIV-1 领域,在流感病毒、埃博拉病毒、新型冠状病毒等其他 I 型包膜病毒领域的相关研究中也有广泛报道<sup>[30-33]</sup>。

### 3 基于卷曲螺旋工具肽嵌合构建活性构象的 N 肽研究策略

卷曲螺旋是广泛存在于多种天然蛋白质中的一类超螺旋结构,因其结构简单且具有规律性,使之成为研究蛋白质相互作用与折叠的理想模型<sup>[34]</sup>。1953年, Watson 等<sup>[35]</sup>首次提出了卷曲螺旋结构及其组装规律,即卷曲螺旋是由两个及以上的  $\alpha$  螺旋构成,利用其中疏水残基间的疏水作用,相互缠绕形成平行或反平行的超螺旋结构域

(图4)。卷曲螺旋结构遵循七肽重复规则,即能够形成卷曲螺旋的蛋白质/多肽序列中通常具有序列重复现象,每个重复序列区一般含有七个氨基酸残基,被称为七重复区域,其氨基酸残基位点依次标记为  $a, b, c, d, e, f, g$ 。其中,  $a, d$  位是位于卷曲螺旋结构核心的残基,多为 Leu、Ile 等疏水性氨基酸,通过疏水作用形成卷曲螺旋的疏水内核;  $e, g$  位则位于疏水内核的外侧,多为 Lys、Glu 等带电极性氨基酸,通过静电作用进一步维持卷曲螺旋结构的稳定性<sup>[36-38]</sup>。

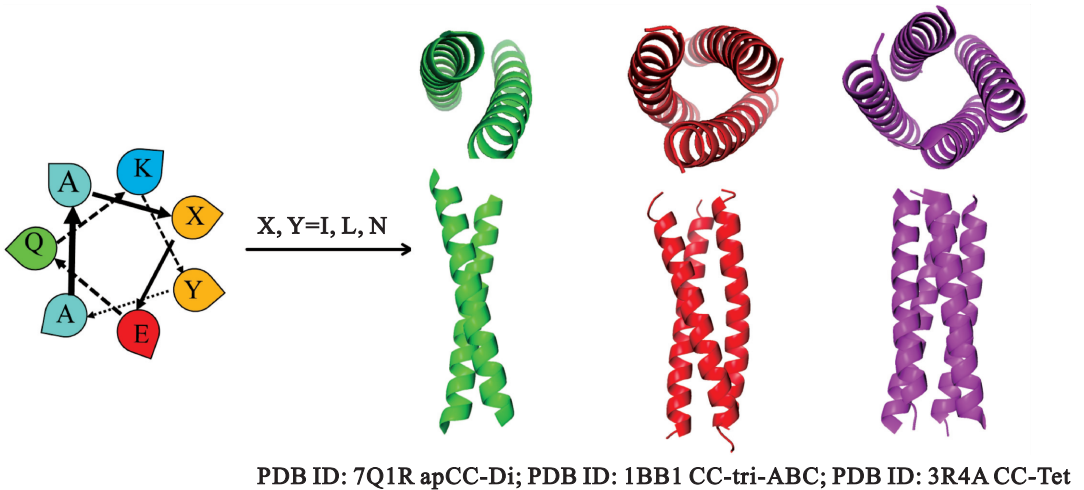


Figure 4 Schematic diagram of coiled-coil structures

卷曲螺旋结构通过牢固的组装可以提高蛋白质/多肽分子的稳定性,而天然 N 肽离体后无法自组装形成三螺旋活性结构。基于互补协同策略,研究者尝试将卷曲螺旋工具肽与 N 肽进行嵌合,得到能够形成稳定卷曲三螺旋结构且发挥良好抗病毒活性的新型 N 肽。

1998年, Suzuki 等<sup>[24]</sup>从头设计合成了一种具有四个七肽重复序列的工具肽,并将其命名为异亮氨酸拉链肽(isoleucine zipper, IZ, 图5)。即在卷曲螺旋的  $a, d$  位以 Ile 取代 Leu,在  $e, g$  位引入 Glu 和 Lys,利用静电作用稳定螺旋结构,并在  $b, c$  位分别引入 Glu 和 Ala,最终得到能够组装为三螺旋的工具肽 IZ。研究者进一步通过实验证明,工具肽 IZ 能够与 HIV-1 跨膜亚基 gp41 中 NHR 区域的关键序列 N17 嵌合,所组成的 IZN17 (图5) 抗病毒活性可达  $22 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,与阳性对照恩夫韦肽相当。

随后, Eckert 等<sup>[39-40]</sup>通过 Fmoc 固相多肽合成法得到了一条序列为 RMKQIEDKIEEIESKQK-

KIENEIARIKK<sup>[41]</sup>的工具肽 IQ (图5)。IQ 与 IZ 类似,能够组装为三螺旋,将 IQ 与跨膜亚基 gp41 中 NHR 区域的关键序列 N17、N23、N36 嵌合后,得到一系列纳摩尔水平抗病毒活性的嵌合肽 IQN17、IQN23、IQN36 (图5),表明了工具肽的嵌合对 N 肽抗病毒活性的发挥具有很好的辅助作用<sup>[39,42-43]</sup>。

第三种工具肽由 Papanikolopoulou 等<sup>[44-46]</sup>报道,研究人员将 T4 噬菌体纤维蛋白中的三聚体结构 Foldon 蛋白与 HIV-1 跨膜亚基 gp41 中 NHR 区域的关键序列 N28、N36 嵌合,得到 N28Fd、N36Fd (图5) 两种嵌合肽,其抗 HIV-1 活性分别为  $99 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $39 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。与天然 N 肽相比,嵌合肽的抑制活性提高了数个数量级。

综上,基于卷曲螺旋规则的工具肽组装策略,可将经典工具肽与天然 N 肽嵌合,使所得的新型嵌合 N 肽能够自组装成三螺旋结构,从而与靶点紧密结合,显著提高抗病毒活性、广谱抗突变能力以及药物稳定性。

**Tool peptides:**

IZ: IKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEK

IQ: RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK

Foldon protein: GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

**Key sequences:**

N17: LLQLTVWGIKQLQARIL

N23: IEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

N28: IEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERY

N36: SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

**Chimerized N-peptides:**

IZN17: IKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEK-LLQLTVWGIKQLQARIL

IQN17: RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK-LLQLTVWGIKQLQARIL

IQN23: RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK-LIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

IQN36: RMKQIEDKIEEIESKQKKIENEIARIKK-LISGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL

N28Fd: IEAQQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERY-GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

N36Fd: SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQARIL-GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL

Figure 5 Design of N-peptide sequences based on coiled-coil tool peptide chimeras  
(cords represent tool peptides and key sequences chimerized by covalent bond)

## 4 基于异肽键捆绑卷曲螺旋活性构象的 N 肽研究策略

二硫键是蛋白设计中广泛使用的共价键,能够在蛋白质分子内或分子间形成稳定交联,从而显著增强蛋白质的结构稳定性和热稳定性。因此,研究者尝试引入二硫键来稳定 N 肽的三螺旋活性结构<sup>[47]</sup>。例如,Louis 等<sup>[48]</sup>利用两个 Cys 形成二硫键,设计了三聚体 N35<sub>CCG</sub>-N13 和 N34<sub>CCG</sub>(图 6),可以在纳摩尔浓度下抑制 HIV-1 包膜蛋白介导的细胞融合。Bianchi 等<sup>[49]</sup>以 IZN17 为前体,通过在螺旋两端交叉引入三对二硫键,获得结

构稳定的三聚体新型 N 肽 (CCIZN17)<sub>3</sub>(图 6)。在单周期传染性实验中,研究者比较了 (CCIZN17)<sub>3</sub> 与单体 N17 以及 C 肽类融合抑制剂 DP178 对 HIV<sub>HXB2</sub>、HIV<sub>NL4-3</sub>、HIV<sub>MN-1</sub> 三种病毒的抑制活性,结果显示 (CCIZN17)<sub>3</sub> 的抗病毒活性远远高于 N17 和 DP178。然而,随着对 N 肽类融合抑制剂稳定性的深入研究,研究者发现二硫键在体内容易被谷胱甘肽还原酶或氧化还原酶降解,在一定程度上影响其体内活性。因此,研究者提出了一种全新的 N 肽开发策略——异肽键捆绑策略<sup>[47,50]</sup>(图 7A),以期进一步提高 N 肽的结构稳定性及抗病毒活性。

**Key sequences:**

N13: SGIVQQNNLLRA

N17: -----LLQLTVWGIKQLQARIL

N34: SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQLQAR

N35: SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQCCGRI

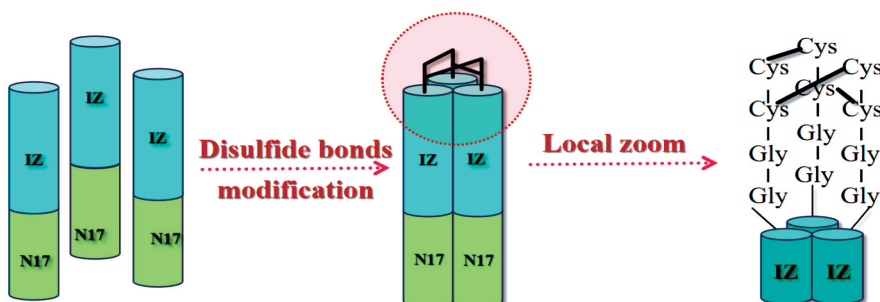
**Disulfide-bond peptides:**N35<sub>CCG</sub>-N13: SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQCCGRISGIVQQNNLLRAN34<sub>CCG</sub>:---SGIVQQNNLLRAIEAQQHLLQLTVWGIKQCCGR(CCIZN17)<sub>3</sub>: (CCG)GIKKEIEAIKKEQEAIKKKIEAIEKLLQLTVWGIKQLQARIL)<sub>3</sub>

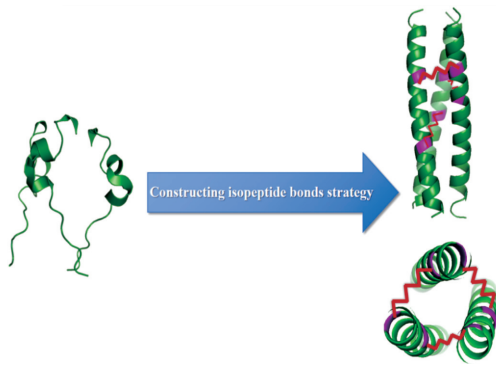
Figure 6 Disulfide bond-bundling strategy for designing coiled-coil N-peptide

异肽键是一种稳定的共价键,结构类似于肽键,由一个氨基酸非  $\alpha$  位的氨基或羧基与另一氨基酸的羧基或氨基缩合形成酰胺键<sup>[51]</sup>。Lai 等<sup>[47,51-54]</sup>发现,Lys、Glu、Asn、Asp 是形成异肽键的关键氨基酸。异肽键可以使蛋白质/多肽具有极高的热力学稳定性、化学稳定性以及 pH 耐受性<sup>[54-57]</sup>,并能有效抵抗蛋白酶水解<sup>[58]</sup>。因此,研究者尝试使用异肽键捆绑的方式来代替二硫键交联。

Li<sup>[22]</sup>建立了将异肽键引入 IZ 骨架嵌合 N 肽的设计方法,并系统总结了异肽键捆绑卷曲螺旋的设计规律。在工具肽不同位点构建异肽键方面:以  $(CCIZN17)_3$  中 IZN17 序列为模板,通过引入异肽键来取代螺旋间的二硫键。如图 7B 所示,一个螺旋第 4 位的 Glu 和邻近螺旋第 9' 位的 Lys 交联形成异肽键得到  $(IZN17L)_3$ ; 一个螺旋第 4 + 7 位的 Glu 和邻近螺旋 9' + 7' 位的 Lys 交联形成异肽键得到  $(IZN17M)_3$ ; 一个螺旋 4 + 7 + 7 位的 Glu 和邻近螺旋 9' + 7' + 7' 位的 Lys 交联形成异肽键得到  $(IZN17R)_3$ 。即工具肽序列中第 4、4 + 7、4 + 7 + 7 位的 Glu 能与平行序列第 9'、9' + 7'、9' + 7' + 7' 位的 Lys 发生交联,空间上表

现为两个螺旋间形成一对异肽键,三个螺旋共形成三对异肽键。在截短工具肽方面:从多肽合成难度和未来开发成本考量,IZ 仅作为 N 肽辅助组装的骨架,没有抗病毒活性,因此可以在保证 N 肽抗病毒活性的基础上对其进行截短。Li<sup>[22]</sup>选择  $(IZN17R)_3$  为模板,从 IZ 的 N 端分别缩短 7、10、14 个氨基酸残基,仍可正常构建异肽键,获得了  $(IZ17N17)_3$ 、 $(IZ10N17)_3$ 、 $(IZ14N17)_3$  (图 7B) 三种短肽。抗 HIV-1 活性实验结果显示,三条短肽均具有纳摩尔水平抑制活性。在延长天然序列方面:为进一步提高 N 肽与靶点的结合能力及抑制活性,可延长 N 肽结构中的天然序列长度<sup>[24]</sup>。Li 选择较短的  $(IZ14N17)_3$  和  $(IZ10N17)_3$  为模板,在 N17 的 N 端和 C 端分别延长七个天然序列残基得到  $(IZ14N24N)_3$ 、 $(IZ10N24N)_3$ 、 $(IZ14N24C)_3$ 、 $(IZ10N24C)_3$  (图 7B)。抗 HIV-1 活性实验结果表明,以上四种 N 肽均表现出纳摩尔水平活性,其中  $(IZ14N24N)_3$  的抑制活性最高,IC<sub>50</sub> 值可达 2.79 nmol·L<sup>-1</sup>。与阳性对照相比,上述新型 N 肽均具有更高的抗病毒活性和稳定性。

A



B



Figure 7 Schematic diagram of isopeptide bond formation among coiled-coils (A); Isopeptide bond-bundling strategy for designing IZ-based coiled-coil N-peptide (B)

研究者发现,异肽键捆绑三螺旋策略还可以运用于其他病毒融合抑制剂的开发。例如,Zheng 等<sup>[59]</sup>以 MERS-CoV 刺突 S 蛋白 S2 亚基 NHR 区域中的 21 个氨基酸残基片段为模版,通过 Glu 和 Lys 之间形成异肽键,构建了 N 肽三聚体结构模型。该课题组进一步以 MERS-CoV 包膜蛋白 S2 亚基 998 ~ 1 041 位衍生的 HR1P 为模版,基于异肽键捆绑三螺旋策略,获得三聚体 N 肽  $(HR1PM1EKNQ)_3$ 。该多肽并未出现聚沉现

象,这说明相较于天然多肽 HR1P,其水溶性和聚集倾向均有一定程度的改善,并且在细胞融合实验中, $(HR1PM1EKNQ)_3$  的 IC<sub>50</sub> 值可达到微摩尔水平<sup>[23]</sup>。

综上,异肽键捆绑三螺旋策略可有效提高三螺旋结构的稳定性并增强抗病毒活性,不仅已成为 HIV-1 领域较为成熟的开发策略,也有望用于具有类似 6-HB 结构和膜融合机制的病毒抑制剂开发。

## 5 基于生物重组技术构建卷曲螺旋活性构象的 N 肽研究策略

生物重组技术能够通过重组 DNA 表达来制备蛋白质/多肽大分子<sup>[60]</sup>。基于生物重组技术特性,研究者将天然 N 肽通过 DNA 表达形成首尾连接的多聚体蛋白,其在溶液中能够组装为含 N-trimer 结构的多聚体,从而有效发挥抗病毒活性。例如,Li<sup>[22]</sup>通过生物重组技术将天然 N 肽 N35 和 N13 首尾连接形成稳定三聚体,得到重组蛋白 N35<sub>CCG</sub>-N13, IC<sub>50</sub> 值可达 15 nmol · L<sup>-1</sup>。Louis 等<sup>[61]</sup>采用六个氨基酸残基组成的环状连接器,将源自 NHR 的 N34 和源自 CHR 的 C28 相连,得到复合物 N34-L<sub>6</sub>-C28,再进一步连接源自 NHR 的 N35,最终得到三聚体重组蛋白 N<sub>CCG</sub>-gp41。痘病毒的细胞融合抑制实验结果表明, N<sub>CCG</sub>-gp41

抑制 HIV-1 包膜蛋白介导的细胞融合的 IC<sub>50</sub> 值为 16.1 nmol · L<sup>-1</sup>,与对照 C34 活性相当。

生物重组技术不仅可用于组装三聚体 N 肽,还可用于制备含 N-trimer 结构的五聚体蛋白大分子抑制剂。例如,Root 等<sup>[62]</sup>设计的由三段天然 N 肽 N40 和两段天然 C 肽 C38 交替连接组成的五聚体蛋白 5-Helix,其缺失的第三个 C 肽空位可为 gp41 的 CHR 区域提供一个高亲和力结合位点(图 8)。5-Helix 在生理条件下可正确折叠组装,且具有较好的稳定性和可溶性。在 HIV-1 细胞融合抑制实验中,5-Helix 的 IC<sub>50</sub> 值为 13 nmol · L<sup>-1</sup>,表现出良好的抗病毒活性。

综上,基于生物重组技术实现多肽“碎片化再组装”,可以获得具有抗 HIV-1 潜力的蛋白大分子,因其包含能够组成 N-trimer 的 N 肽序列,所以该方法为设计新型 N 肽抑制剂提供了新视角。

### Peptide fragments:

N13: SGIVQQNLLRA

N35: SGIVQQNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQCCGRI

N34: SGIVQQNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQAR

**N40: QLLSGIVQQNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARILA**

C28: WMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEK

**C38: HTTMEWDREINNYTSLIHSLEESQNQQEKNEQELLE**

### Recombinant peptides:

**5-Helix: N40-GGSGG-C38-GSSGG-N40-GGSGG-C38-GSSGG-N40**

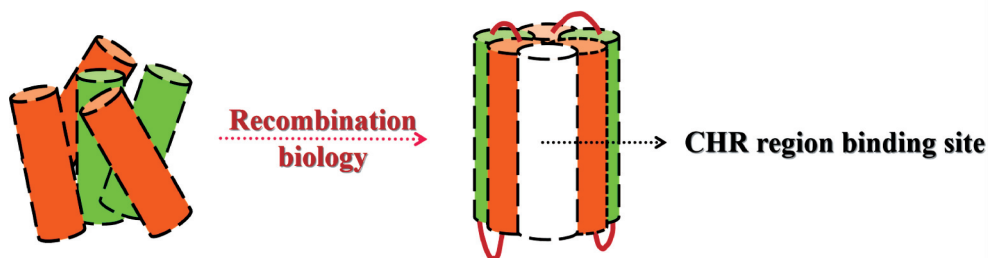


Figure 8 Recombinant biology-based strategy for designing coiled-coil N-peptide

## 6 基于小分子骨架构建卷曲螺旋活性构象的 N 肽研究策略

目前,小分子骨架在生物化学和药物设计中扮演着至关重要的角色,它们不仅能够作为结构稳定的核心单元,还能通过特定的化学修饰和组装,赋予分子新的功能和特性<sup>[49,63-64]</sup>。在抗病毒药物研究领域,小分子骨架凭借其结构可塑性和易于化学修饰的特点,成为开发新型抗病毒抑制剂的重要载体。鉴于 N 肽需要形成多股同源螺旋才能发挥抑制活性,研究者建立了以小分子骨架刚性定向约束天然 N 肽,使其形成稳定的三螺

旋活性构象的方法,即基于小分子骨架构建卷曲螺旋 N 肽的研究策略。

2010 年, Nakahara 等<sup>[65]</sup>在水溶液中将具有三个等长分支的新型小分子骨架以酯醛基团与天然多肽 N36 的 N 端 Cys 连接,得到新型 N 肽 triN36e(图 9)。圆二色谱结果显示, triN36e 在 208 nm 和 222 nm 处均出现特征性峰形,表明其具有高度有序的  $\alpha$  螺旋结构,且三聚体 triN36e 的螺旋含量显著高于单体 N36。后续活性实验结果表明,与 N36 相比, triN36e 的抗病毒活性提高了 3 倍,与靶点的结合能力提高了 30 倍,这表明以小分子骨架构建活性 N 肽策略切实可行。

2024年, Wu 等<sup>[66]</sup>使用肯普三酸(Kemp's triacid, KTA)骨架为模板,与天然多肽 N51 连接得到三聚体 KTA(N51)<sub>3</sub>(图9),与 N51 相比, KTA(N51)<sub>3</sub>的抑制活性提高了10倍。随后,为了探究此策略的通用性,该团队进一步采用三溴乙酰化小分子骨架与 N51 连接,得到了一系列抗病毒活性以及对病毒突变体适应性良好的新型 N 肽。

值得注意的是, Nomura 等<sup>[67]</sup>发现小分子骨架组装三螺旋策略同样可用于 C 肽类融合抑制

剂的开发。该研究利用新型对称骨架模板 C3,与天然多肽 C34 改造得到的 C34REG 以 Cys 与硫酯基团选择性偶联,获得三聚体 triC34e,其抑制效力是天然多肽 C34 的100倍。

综上,小分子骨架组装三螺旋策略通过刚性约束将三条天然多肽连接为一个大分子,且由于小分子骨架位于多肽末端,所以多肽链仍能保留较高的自由度以形成卷曲螺旋。该策略适用范围广、开发潜力大,是一种高效且前景广阔的融合抑制剂修饰策略。

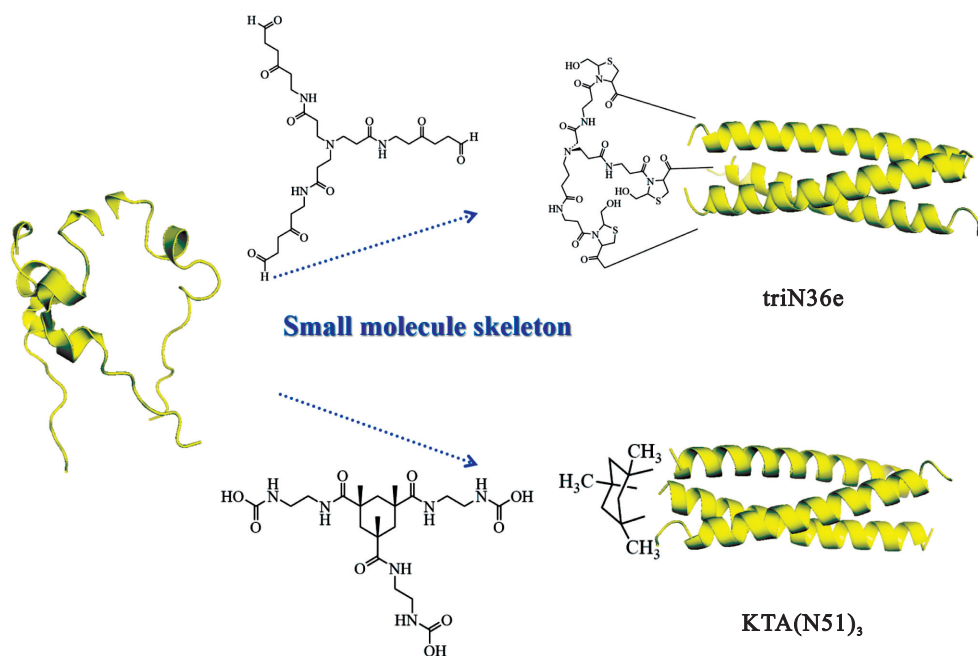


Figure 9 Small molecule skeleton-based strategy for designing coiled-coil N-peptide

## 7 结语与展望

多年来,经过抗病毒领域研究者的不懈努力,针对病毒入侵宿主细胞早期膜融合过程的多肽类融合抑制剂的研究取得了显著进展<sup>[19,68-70]</sup>。在 C 肽类融合抑制剂逐渐面临耐药、代谢稳定性差等困境的情况下,新型 N 肽类抑制剂以独特的活性构象作用于靶点,展现出优异的抗病毒活性。作为一类极具潜力的候选分子, N 肽在新型多肽类融合抑制剂的开发方面被寄予厚望。但是,从天然 N 肽向非天然 N 肽的优化改造仍面临诸多挑战,设计可自组装形成活性结构、对病毒突变体适应性强、且易于后期成药开发的新型 N 肽先导化合物,已成为当前的研究热点。

### 参考文献:

[1] YAO Y J, MENG G X, HAN Y Y, et al. Advances in

inhibition of enveloped virus infection by bacillus and its metabolites [J]. J Microbiol (微生物学杂志), 2024, 44(2): 97-108.

[2] BADANI H, GARRY R F, WIMLEY W C. Peptide entry inhibitors of enveloped viruses: the importance of interfacial hydrophobicity [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1839(9): 2180-2197.

[3] SHANG J, WAN Y, LUO C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(21): 11727-11734.

[4] LI Y, WEI Y, LI H, et al. Effect of viral infection on host cell metabolism: a review [J]. Chinese J Biotechnol, 2023, 39(9): 3566-3578.

[5] XIAO T, CAI Y, CHEN B. HIV-1 entry and membrane fusion inhibitors [J]. Viruses, 2021, 13(5): 735.

[6] QADIR M I, MALIK S A. HIV fusion inhibitors [J]. Rev Med Virol, 2010, 20(1): 23-33.

- [7] SU S, LIU X, KANG Q Z, et al. Research progress on the role of host cell membrane skeleton proteins in the infection and replication of virus[J]. Chin J Virol(病毒学报), 2021, 37(5): 1227 - 1233.
- [8] WANG J, LI P, LI R, et al. Structural basis of HIV-1 gp41 N-trimer for designing bifunctional peptide-based fusion inhibitors[J]. Curr Med Chem, 2025, 32(25): 5321 - 5337.
- [9] DÜZGÜNES N, FERNANDEZ-FUENTES N, KONOPKA K. Inhibition of viral membrane fusion by peptides and approaches to peptide design[J]. Pathogens, 2021, 10(12): 1599.
- [10] MENG G P, LIANG G D, ZHANG P Y, et al. Membrane fusion mechanism based anti-class I enveloped virus peptides: research advances[J]. Int J Pharm Res(国际药学研究杂志), 2017, 44(11): 995 - 1005.
- [11] WANG H, WANG C. Peptide-based dual HIV and coronavirus entry inhibitors[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1366: 87 - 100.
- [12] EGGINK D, BERKHOUT B, SANDERS R W. Inhibition of HIV-1 by fusion inhibitors[J]. Curr Pharm Des, 2010, 16(33): 3716 - 3728.
- [13] LIU Y J, ZHAO G S, XU Y W. Progress of study on fusion inhibitors[J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2004, 4: 168 - 172.
- [14] HUANG Y, ZHAO Y, GA L, et al. The research process of novel short peptide-based HIV-1 fusion inhibitors[J]. Chin J Med Chem(中国药物化学杂志), 2024, 34(5): 409 - 420.
- [15] SU S, XU W, JIANG S. Virus entry inhibitors: past, present, and future[J]. Adv Exp Med Biol, 2022, 1366: 1 - 13.
- [16] CHONG H, YAO X, ZHANG C, et al. Biophysical property and broad anti-HIV activity of albuvertide, a 3-maleimidopropionic acid-modified peptide fusion inhibitor[J]. PLoS One, 2012, 7(3): e32599.
- [17] MARTIN-CARBONERO L. Discontinuation of the clinical development of fusion inhibitor T-1249[J]. AIDS Rev, 2004, 6(1): 61.
- [18] CHAN D C, FASS D, BERGER J M, et al. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein[J]. Cell, 1997, 89(2): 263 - 273.
- [19] GUO Y, WANG T Y, FAN X W. Development status and research progress of HIV-1 peptide fusion inhibitors[J]. J Baotou Med Coll(包头医学院学报), 2017, 33(12): 124 - 129.
- [20] SHI W G, JIA Q Y, LIU K L. The current progress in the development of HIV-1 fusion inhibitors[J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2010, 45(2): 184 - 193.
- [21] CHONG H, WU X, SU Y, et al. Development of potent and long-acting HIV-1 fusion inhibitors[J]. AIDS, 2016, 30(8): 1187 - 1196.
- [22] LI X. Research on chimeric N-peptide HIV-1 fusion inhibitors based on site-specific cross-linking *via* isopeptide bond[D]. Beijing: Acad Mil Med Sci(中国人民解放军军事医学科学院), 2017.
- [23] ZHENG X. Preliminary exploration of N-peptide MERS-CoV fusion inhibitors stabilized by isopeptide bonds[D]. Beijing: Acad Mil Med Sci(中国人民解放军军事医学科学院), 2017.
- [24] SUZUKI K, HIROAKI H, KOHDA D, et al. An isoleucine zipper peptide forms a native-like triple stranded coiled coil in solution[J]. Protein Eng, 1998, 11(11): 1051 - 1055.
- [25] LI X, LAI W Q, JIANG X F, et al. Design, synthesis and activity screening of isopeptide bond-tethered N peptides as HIV-1 fusion inhibitors[J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2016, 37(5): 881 - 885.
- [26] NA H Y, GA L, LIU Y, et al. Research progress of novel peptide-based viral fusion inhibitors[J]. J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2023, 40(12): 1691 - 1702.
- [27] BEWLEY C A, LOUIS J M, GHIRLANDO R, et al. Design of a novel peptide inhibitor of HIV fusion that disrupts the internal trimeric coiled-coil of gp41[J]. J Biol Chem, 2002, 277(16): 14238 - 14245.
- [28] YANG W, LI Z L. Research progress on HIV-1 fusion inhibitors targeting gp41[J]. J Med Forum(医药论坛杂志), 2007, 10: 125 - 128.
- [29] BANACH B B, PLETNEV S, OLIA A S, et al. Antibody-directed evolution reveals a mechanism for enhanced neutralization at the HIV-1 fusion peptide site[J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 7593.
- [30] MADAN B, ZHANG B, XU K, et al. Mutational fitness landscapes reveal genetic and structural improvement pathways for a vaccine-elicited HIV-1 broadly neutralizing antibody[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(10): e2011653118.
- [31] BANACH B B, TRIPATHI P, DASILVA P L, et al. Highly protective antimalarial antibodies *via* precision library generation and yeast display screening[J]. J Exp Med, 2022, 219(8): e20220323.

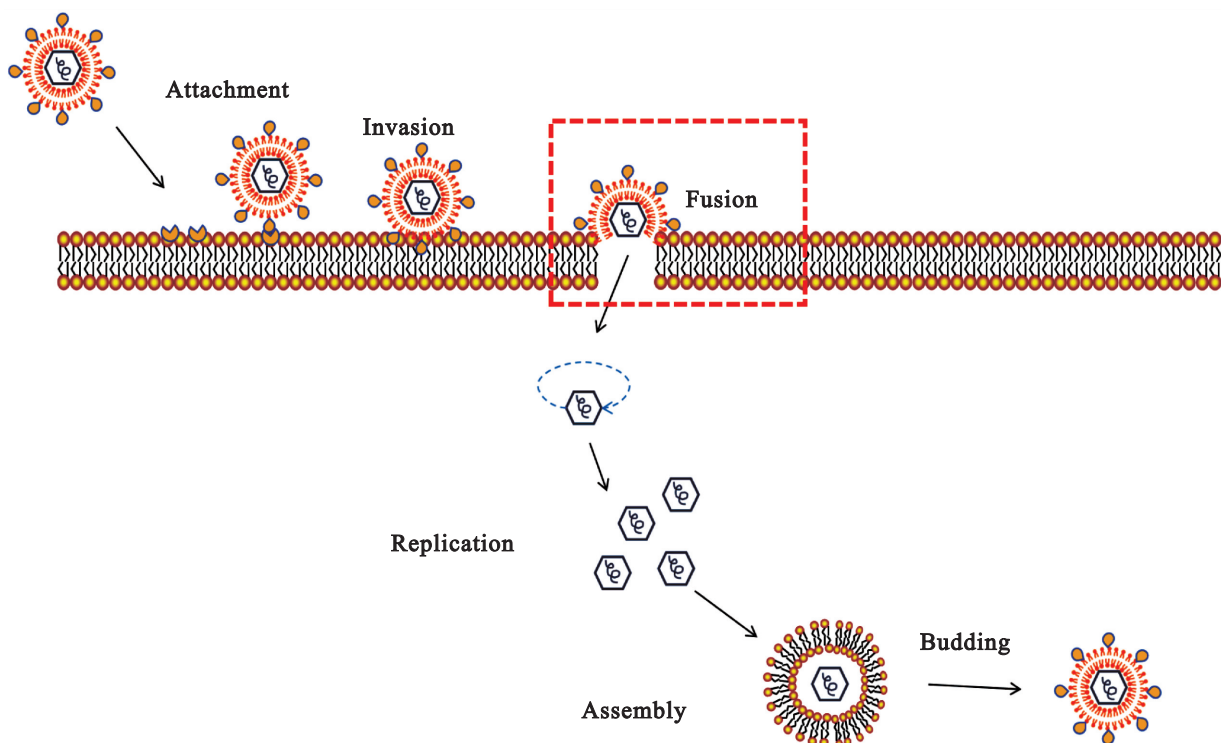
- [32] WANG B, DEKOSKY B J, TIMM M R, et al. Functional interrogation and mining of natively paired human V(H):V(L) antibody repertoires [J]. *Nat Biotechnol*, 2018, 36(2): 152–155.
- [33] NIU X, YAN Q, YAO Z, et al. Longitudinal analysis of the antibody repertoire of a Zika virus-infected patient revealed dynamic changes in antibody response [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 111–123.
- [34] WEI X, ZENG X G, ZHOU M H. Progress on the study of coiled coils in protein structures [J]. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2004, 5: 565–571.
- [35] WATSON J D, CRICK F H. A structure for deoxyribose nucleic acid [J]. *Nature*, 2003, 421(6921): 397–398.
- [36] PAULING L, COREY R B, BRANSON H R. The structure of proteins, two hydrogen-bonded helical configurations of the polypeptide chain [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1951, 37(4): 205–211.
- [37] RAMACHANDRAN G N, RAMAKRISHNAN C, SASISEKHARAN V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations [J]. *J Mol Biol*, 1963, 7(1): 95–99.
- [38] RAMACHANDRAN G N, VENKATACHALAM C M, KRIMM S. Stereochemical criteria for polypeptide and protein chain conformations. 3. Helical and hydrogen-bonded polypeptide chains [J]. *Biophys*, 1966, 6(6): 849–872.
- [39] ECKERT D M, KIM P S. Design of potent inhibitors of HIV-1 entry from the gp41 N-peptide region [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(20): 11187–11192.
- [40] CLINTON T R, WEINSTOCK M T, JACOBSEN M T, et al. Design and characterization of ebolavirus GP prehairpin intermediate mimics as drug targets [J]. *Protein Sci*, 2015, 24(4): 446–463.
- [41] ECKERT D M, MALASHKEVICH V N, KIM P S. Crystal structure of GCN4-pIQI, a trimeric coiled coil with buried polar residues [J]. *Protein Sci*, 1998, 284(4): 859–865.
- [42] SIEBERT X, HUMMER G. Hydrophobicity maps of the N-peptide coiled coil of HIV-1 gp41 [J]. *Biochemistry*, 2002, 41(9): 2956–2961.
- [43] COOLEY L A, LEWIN S R. HIV-1 cell entry and advances in viral entry inhibitor therapy [J]. *J Clin Virol*, 2003, 26(2): 121–132.
- [44] PAPANIKOLOPOULOU K, FORGE V, GOELTZ P, et al. Formation of highly stable chimeric trimers by fusion of an adenovirus fiber shaft fragment with the foldon domain of bacteriophage t4 fibrin [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(10): 8991–8998.
- [45] YANG X, LEE J, MAHONY E M, et al. Highly stable trimers formed by human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoproteins fused with the trimeric motif of T4 bacteriophage fibrin [J]. *J Virol*, 2002, 76(9): 4634–4642.
- [46] CHEN X, LU L, QI Z, et al. Novel recombinant engineered gp41 N-terminal heptad repeat trimers and their potential as anti-HIV-1 therapeutics or microbicides [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(33): 25506–25515.
- [47] LAI W, WANG C, YAN J, et al. Suitable fusion of N-terminal heptad repeats to achieve covalently stabilized potent N-peptide inhibitors of HIV-1 infection [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28(4): 115214.
- [48] LOUIS J M, NESHEIWAT I, CHANG L, et al. Covalent trimers of the internal N-terminal trimeric coiled-coil of gp41 and antibodies directed against them are potent inhibitors of HIV envelope-mediated cell fusion [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(22): 20278–20285.
- [49] 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(36): 12903–12908.
- [50] KOBAYAKAWA T, EBHARA K, HONDA Y, et al. Dimeric C34 derivatives linked through disulfide bridges as new HIV-1 fusion inhibitors [J]. *ChemBioChem*, 2019, 20(16): 2101–2108.
- [51] ZAKERI B, FIERER J O, CELIK E, et al. Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(12): 690–697.
- [52] FIERER J O, VEGGIANI G, HOWARTH M. SpyLi-gase peptide-peptide ligation polymerizes affibodies to enhance magnetic cancer cell capture [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(13): 1176–1181.
- [53] BRUNE K D, LENEGHAN D B, BRIAN I J, et al. Plug-and-display: decoration of virus-like particles *via* isopeptide bonds for modular immunization [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 19234.
- [54] KANG H J, BAKER E N. Intramolecular isopeptide bonds give thermodynamic and proteolytic stability to the major pilin protein of streptococcus pyogenes

- [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20729–20737.
- [55] HAGAN R M, BJÖRNSSON R, MCMAHON S A, et al. NMR spectroscopic and theoretical analysis of a spontaneously formed Lys-Asp isopeptide bond[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2010, 49(45): 8421–8425.
- [56] IZORÉ T, CONTRERAS-MARTEL C, MORTAJI L, et al. Structural basis of host cell recognition by the pilus adhesin from streptococcus pneumoniae [J]. *Structure*, 2010, 18(1): 106–115.
- [57] ELMORTAJI L, TERRASSE R, DESSEN A, et al. Stability and assembly of pilus subunits of streptococcus pneumoniae [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(16): 12405–12415.
- [58] BALIN B J, LOEWY A G, APPELT D M. Analysis of transglutaminase-catalyzed isopeptide bonds in paired helical filaments and neurofibrillary tangles from Alzheimer's disease [J]. *Methods Enzymol*, 1999, 309: 172–186.
- [59] ZHENG X, LIANG G D, WANG C, et al. Construction of isopeptide bridge-tethered NHR-trimeric coiled-coil in MERS-CoV membrane fusion protein [J]. *Chem J Chin Univ (高等学校化学学报)*, 2016, 37(9): 1643–1648.
- [60] CHEN X, ZARO J L, SHEN W C. Fusion protein linkers: property, design and functionality [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65(10): 1357–1369.
- [61] LOUIS J M, BEWLEY C A, CLORE G M. Design and properties of N(CCG)-gp41, a chimeric gp41 molecule with nanomolar HIV fusion inhibitory activity [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(31): 29485–29489.
- [62] ROOT M J, KAY M S, KIM P S. Protein design of an HIV-1 entry inhibitor [J]. *Science*, 2001, 291(5505): 884–888.
- [63] LU M, JI H, SHEN S. Subdomain folding and biological activity of the core structure from human immunodeficiency virus type 1 gp41; implications for viral membrane fusion [J]. *J Virol*, 1999, 73(5): 4433–4438.
- [64] CHEN X H, XIE L. Progress in next generation NNRTIs against drug-resistant HIV virus [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2006, 16(3): 182–187.
- [65] NAKAHARA T, NOMURA W, OHBA K, et al. Remodeling of dynamic structures of HIV-1 envelope proteins leads to synthetic antigen molecules inducing neutralizing antibodies [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(4): 709–714.
- [66] WU C, RAHEEM I T, NAHAS D D, et al. Stabilized trimeric peptide immunogens of the complete HIV-1 gp41 N-heptad repeat and their use as HIV-1 vaccine candidates [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2024, 121(22): e2317230121.
- [67] NOMURA W, MIZUGUCHI T, TAMAMURA H. Multimerized HIV-gp41-derived peptides as fusion inhibitors and vaccines [J]. *Biopolymers*, 2016, 106(4): 622–628.
- [68] LIU C M, ZENG D D, LI X, et al. Research progress in polypeptide fusion inhibitors targeting HIV-1 transmembrane protein gp41 [J]. *Anti-infection Pharmacy (抗感染药理学)*, 2023, 20(7): 677–681, 728.
- [69] SHI W G, QIE J K, LIU K L. Current status and trends of HIV fusion inhibitors [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2006, 17: 1429–1435.
- [70] XU Y Z, WU W Y. Advancement on the study of peptides fusion inhibitors anti HIV-1 targeting gp41 [J]. *Clin Med (临床医学)*, 2016, 36(3): 117–120, 127–128.

## Research progress of novel HIV-1 peptide-based fusion inhibitors based on coiled-coil assembly strategy

JIN Yihui<sup>#</sup>, HUANG Yan<sup>#</sup>, GAO Xin, HUO Caixia<sup>\*</sup>, LIANG Guodong<sup>\*</sup>  
(Key Laboratory of Candidate Drug Design and Screening Based on Chemical Biology,  
School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

**Abstract:** Acquired immune deficiency syndrome (AIDS), caused by human immunodeficiency virus (HIV), remains a persistent threat to human health. Therefore, the development effective anti-HIV therapeutics is imperative. HIV-1 invasion into host cells relies on a membrane fusion process, in which the six-helix bundle (6-HB) serves as a pivotal structure driving this process, representing a key target for peptide fusion inhibitors to exert antiviral activity. Currently marketed agents, primarily C-peptide inhibitors derived from the HIV-1 CHR region, such as enfuvirtide and albuvirtide, exhibit limitations including drug resistance and poor mutant adaptation. In contrast to C-peptides, N-peptides are derived from the HIV-1 NHR region, and feature a novel helical active conformation and mechanism of action. They are expected to be developed as novel peptide inhibitors to overcome the drawbacks of the currently approved C-peptides. Accordingly, N-peptide fusion inhibitors have attracted considerable attention, and strategies for stabilizing their helically active conformations have become increasingly mature. This paper reviews the reported modification strategies for novel N-peptides fusion inhibitors, aiming to provide a valuable reference for the design of novel antiviral agents.



**Key words:** HIV; AIDS; coiled-coil; peptide-based fusion inhibitor