

# 苏拉明与 HIV-1 衣壳蛋白六聚体中 NTD/CTD 界面互作调节 CA 蛋白装配

许晓双, 张大为\*

(江苏理工学院电气信息工程学院生物信息与医药工程研究所, 江苏 常州 213001)

**摘要:** HIV-1 衣壳蛋白 (HIV-1 capsid protein, CA) 是寻找抗病毒药物的有效靶点。靶向 HIV-1 CA C 端结构域 (C-terminal domain of HIV-1 CA, CA CTD) 中的 CAI (capsid assembly inhibitor peptide) 结合口袋可用于筛选 CA 蛋白抑制剂。本研究基于均相时间分辨荧光技术发现小分子化合物苏拉明 (suramin) 通过结合到该口袋靶向 HIV-1 CA, 其抑制 CA CTD-CAI 相互作用的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 值为  $2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。生物膜干涉法 (bio-layer interferometry, BLI) 实验表明, 苏拉明直接与 CA 蛋白结合, 且与 CA 蛋白六聚体的结合亲和力 ( $K_D = 248 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 高于与 CA 单体的结合亲和力 ( $K_D = 227 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。此外, CA 蛋白体外组装实验表明苏拉明促进了 CA 蛋白的无序多聚化。分子模拟结合模式分析结果显示, 苏拉明通过 N57、Q63、Q67 和 Y169 残基结合到 CA 六聚体中相邻 CA 单体之间的界面上, 起到增强 CA 蛋白多聚化的作用。综上所述, 苏拉明是一种靶向 CA 六聚体的 CA 蛋白抑制剂, 可作为发现新型 CA 抑制剂的起点。

**关键词:** 苏拉明; 衣壳装配; 生物膜干涉; 人类免疫缺陷病毒 1 型; 均相时间分辨荧光技术

中图分类号: R943 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2025)03-0817-08

## Suramin modulates CA protein assembly by interacting with the NTD/CTD interface in the HIV-1 capsid hexamer

XU Xiao-shuang, ZHANG Da-wei\*

(Institute of Bioinformatics and Medical Engineering, School of Electrical and Information Engineering, Jiangsu University of Technology, Changzhou 213001, China)

**Abstract:** The HIV-1 capsid protein (CA) is an effective target for antiviral drug discovery. Targeting the capsid assembly inhibitor peptide (CAI) binding pocket in the C-terminal domain of HIV-1 CA (CA CTD) can be used to screen for CA protein inhibitors. In this study, we found that the small molecule suramin targets HIV-1 CA by binding to this pocket, with an  $IC_{50}$  value of  $2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  for inhibiting the CA CTD-CAI interaction, based on homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) technology. Bio-layer interferometry (BLI) experiments demonstrated that suramin binds directly to CA, with a binding affinity to CA hexamer ( $K_D = 248 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) higher than to CA monomer ( $K_D = 227 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ). In addition, *in vitro* CA protein assembly assays showed that suramin promotes disordered multimerization of CA protein. Binding model analysis revealed that suramin binds to the interface between adjacent CA monomers in the CA hexamer through the N57, Q63, Q67 and Y169 residues, thereby enhancing CA multimerization. In summary, suramin is a CA protein inhibitor that targets the CA hexamer and can serve as a starting point for the discovery of new CA inhibitors.

**Key words:** suramin; capsid assembly; bio-layer interferometry; human immunodeficiency virus 1; homogeneous time-resolved fluorescence

收稿日期: 2024-08-04; 修回日期: 2024-10-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31700297).

\*通讯作者 Tel: 18761162199, E-mail: zdw@jsut.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0749

艾滋病 (acquired immunodeficiency syndrome, AIDS) 的病原体为人类免疫缺陷病毒 1 型 (human immunodeficiency virus 1, HIV-1)<sup>[1]</sup>。尽管全人类已经为阻断 AIDS 的传播做出巨大努力, 但 AIDS 相关的死亡和新感染仍然是一个全球公共卫生问题<sup>[2]</sup>。高效抗逆转录病毒治疗 (highly active anti-retroviral therapy, cART) 可以有效地抑制 HIV-1 的复制并限制疾病进展到 AIDS。然而, cART 不能根除 HIV-1, 患者需要终生治疗, 这可能会导致不良反应和 HIV 药物耐药性<sup>[3,4]</sup>。因此, 开发新的抗逆转录病毒治疗策略以控制 AIDS 流行甚至治愈该疾病是必要的。

成熟的 HIV-1 粒子具有 1 个圆锥形的外壳, 并被富含脂质的膜包裹<sup>[5-7]</sup>。在 HIV-1 感染过程中, 病毒核心粒子的正确形成和完整性至关重要<sup>[8]</sup>。病毒核心由大约 1 500 个衣壳蛋白 (HIV-1 capsid protein, CA, p24) 构成。这些 CA 蛋白单体形成了 250 个六聚体和 12 个 CA 五聚体, 并重新排列成一个富勒烯形状的病毒核心<sup>[9]</sup>。CA 蛋白及其组装的病毒核心在 HIV-1 复制的不同步骤中起着重要作用, 包括逆转录、整合、核入、病毒组装和通过 CA-CA 或 CA-宿主因子相互作用介导的病毒粒子成熟<sup>[9,10]</sup>。CA 的这些功能对于 HIV-1 致病性至关重要, 使其成为抗病毒治疗的一个有吸引力的靶点<sup>[11,12]</sup>。在过去的 20 年间, 针对 CA 设计 HIV-1 抑制剂已得到广泛关注<sup>[13-16]</sup>。目前已有许多 CA 抑制剂见诸报道, 比如: PF-3450074 (PF74)、GS-6207、MKN-1A、I-XW-053、BD-1、capsid assembly inhibitor peptide (CAI)、BM-1、HCB 和 ACAi-028 等。在上述 CA 抑制剂中, GS-6207 已于 2022 年 12 月经 FDA 批准上市, 正式名为来那卡帕韦 (lenacapavir)<sup>[17,18]</sup>, 来那卡帕韦的上市证明 CA 蛋白是一个有效的抗病毒靶点。

CA 蛋白单体由 N 端结构域 (N-terminal domain of HIV-1 CA, CA NTD) 和 C 端结构域 (C-terminal domain of HIV-1 CA, CA CTD) 组成, 两者中间存在 1 个柔性的 linker<sup>[19]</sup>。大多已知的 CA 抑制剂的结合位点位于 CA NTD, 只有少数化合物, 如 CAI、Ebselen 和 MKN-1A, 结合于 CA CTD。CAI 是一种 12 肽, 在体外可阻止未成熟和已成熟 HIV-1 病毒组粒子的组装<sup>[20]</sup>。CAI-CA CTD 复合物的结构显示, CAI 通过结合到由 CA CTD 的 3 条  $\alpha$  螺旋 ( $\alpha 8$ 、 $\alpha 9$  和  $\alpha 11$ ) 形成的保守腔体, 变构地改变了 CA CTD 二聚体界面<sup>[21,22]</sup>。随后的研究发现包括订书肽和小分子在内的几种化合物也能与这个保守口袋结合, 并在细胞实验中显示出对 HIV-1 复制的强效抑制<sup>[23-26]</sup>。上述化合物的发现表明, CAI 结合口袋可以作为抗病毒开发的靶点。

苏拉明 (suramin) 是一种对称的六磺化萘啶化合

物, 1961 年由拜耳公司、美国国立癌症研究所及华纳-兰伯特公司联合研制, 主要用于治疗非洲锥虫病和盘尾丝虫病。苏拉明的抗肿瘤效果已得到证实, 其广泛的抗病毒活性已在与人类 T 细胞嗜淋巴细胞病毒 (HTLV III)、HIV-1、HSV-1、HBV、HCV、登革病毒、脑炎 B 病毒、SFTSV、诺如病毒、EV71 和裂谷热病毒相关的研究中得到验证<sup>[27-37]</sup>。本文以 CA CTD-CAI 相互作用, 即以 CAI 的结合口袋为靶点, 采用已经建立的基于均相时间分辨荧光 (homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF) 技术的活性评价方法, 结合生物膜干涉法 (bio-layer interferometry, BLI) 及分子模拟来评估苏拉明抑制该相互作用的活性, 旨在寻找更多的 CA 抑制剂, 为开发新的抗 HIV-1 药物奠定基础。

## 材料与方法

**实验材料与菌株** 苏拉明钠 (D2121, 美国 Santa Cruz 公司); C 端生物素化的 CAI 肽 (ITFEDLLDYYP-GGGSK-biotin)、无修饰的 CAI 肽 (P170906-SL350206) (上海吉尔生化有限公司); HTRF 检测试剂 Streptavidin-XL665 受体微珠 (164A)、Anti-GST-Eu 供体微珠 (104A)、白色 384 孔板 (OptiPlate-384)、黑色 96 孔板 (美国 PerkinElmer 公司); 链霉亲和素 (Streptavidin, SA) 包被的生物传感器 (2011217, 德国 Sartorius 公司); 生物素化试剂盒 (2106M, 苏州博美达生命科学有限公司); Amicon™ 超滤管 (196101, 德国 Merck 公司); 阴离子交换层析柱 (HiTrap Q FF, 10284517)、阳离子交换层析柱 (HiTrap SP HP, 10287180) (美国 Cytiva 公司); Protease Inhibitor Cocktail (HY-K0011, 上海 MedChemExpress 生物技术有限公司); 其他常规分析纯试剂购自美国 Amresco 公司。大肠杆菌 BL21 (DE3, EC1002M, 上海唯地生物技术有限公司); 表达载体 pET11a-WT CA (用于表达野生型 HIV-1 衣壳蛋白)、pET11a-4Mu CA (用于表达带有四个点突变 A14C/E45C/W184A/M185A 的 HIV-1 衣壳蛋白) 和 pGEX-4T-CA CTD [用于表达 N 端融合谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 标签的 CA 蛋白的 C 端结构域] 由本实验室保存。

**实验仪器** 多功能酶标仪 (EnVision 2000, 美国 PerkinElmer); 分子相互作用分析系统 (Octet RED96, 德国 Sartorius); NGC Quest 10 Plus 快速蛋白纯化系统、mini-蛋白电泳仪 (美国 Bio-Rad); 高速冷冻离心机 (LYNX6000, 美国 ThermoFisher); 超净工作台 (SW-CJ-2D, 苏州净化设备有限公司); 微孔板恒温振荡器 (TS200, 海门其林贝尔仪器制造有限公司); 恒温振荡器 (ZQZY-78C, 上海知楚仪器有限公司); 细胞超声破

碎仪 (JY92-IIDN, 宁波新芝生物科技股份有限公司)。

**蛋白表达和纯化** N端融合 GST 标签的 CA CTD 的表达纯化采用文献<sup>[38]</sup>的方法进行。将质粒 pGEX-4T-CA CTD 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 化学感受态中, 涂布在含有氨苄青霉素钠的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。将转化子在含有 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  氨苄青霉素钠的 LB 液体培养基中 37 °C 培养,  $\text{OD}_{600}$  至 0.6~0.8 之间时, 加入 1  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG, 继续诱导蛋白表达 3 h, 8 000  $\times\text{g}$ 、10 min 离心收集菌体。利用 GSTrap HP 亲和层析柱和 NGC Quest 10 Plus 快速蛋白纯化系统纯化蛋白。

重组野生型 CA 蛋白的表达纯化采用文献<sup>[39]</sup>的方法进行。将质粒 pET11a-WT CA 转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 化学感受态中, 涂布在含有氨苄青霉素钠的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养。将转化子在含有 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  氨苄青霉素钠的 LB 液体培养基中 37 °C 培养,  $\text{OD}_{600}$  至 0.6~0.8 之间时, 加入 0.4  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  IPTG, 继续诱导蛋白表达 4 h, 8 000  $\times\text{g}$ 、10 min 离心收集菌体。采用硫酸铵 (浓度为 25%) 沉淀 CA 蛋白。HEPES (25  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 6.8) 重悬蛋白, 之后依次采用 HiTrap SP HP 和 HiTrap Q FF 纯化得到 WT CA 蛋白。采用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度。带有四重突变 (A14C/E45C/W184A/M185A) 的 CA 蛋白 (4Mu CA) 的表达纯化按照与野生型 CA 蛋白相同的步骤进行。

将纯化的 HIV-1 4Mu CA 置于分子截留量为 10 kU 的透析袋中, 依次在缓冲液 1 (50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0, 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\beta$ -ME)、缓冲液 2 (50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0, 2.5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\beta$ -ME) 和缓冲液 3 (20  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 8.0) 中透析。每一步透析在 4 °C 进行 8 h。透析结束后即得到 CA 蛋白六聚体。所有纯化后的蛋白采用 SDS-PAGE 检测纯度, 定量后分装, 液氮速冻后储存于 -80 °C 备用。

**CA CTD-CAI 相互作用检测** 基于课题组已经建立的 HTRF 方法检测苏拉明抑制 CA CTD-CAI 相互作用的活性<sup>[38]</sup>。反应在白色 384 孔板中进行, 总体积为 10  $\mu\text{L}$ 。以 CAI 作为阳性对照, 缓冲液为含有 0.05% Tween 20 和 2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT 的 PBS。首先, 将稀释好的苏拉明 (1.0  $\mu\text{L}$ )、Bio-CAI (2  $\mu\text{L}$ ) 和 CA CTD (2  $\mu\text{L}$ ) 依次加入板孔中, 混匀后在微孔板振荡器中 25 °C 反应 30 min; 然后, 加入 5  $\mu\text{L}$  的 HTRF 试剂 (供体微珠 Anti-GST-Eu 和受体微珠 Streptavidin-XL665 的混合液), 继续反应 1 h; 最后, 使用 Envision 2000 多功能酶标仪, 以 320 nm 为激发光, 读取 665 和 620 nm 处的发射光, 并计算抑制率。数据导出后使用 GraphPad Prism 5.0 重新作图, 每个样品重复 3 次, 取平均值  $\pm$  标准差进行曲

线拟合。

**苏拉明与 HIV-1 衣壳蛋白 (单体及六聚体) 的结合验证** 采用 BLI 技术验证苏拉明与靶标的结合。实验在 Octet Red96 上完成, 采用黑色 96 孔板, 缓冲液为含有 0.02% Tween 20 和 1% DMSO 的 PBS (pH 7.4), 反应体积为 200  $\mu\text{L}$ 。首先, 使用生物素化 CA 单体和 CA 六聚体, 脱盐去除游离的生物素; 然后, 使用缓冲液将生物素化的蛋白稀释为 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , 将生物素化的蛋白固定至 SA 传感器 (传感器在缓冲液中预先湿润 20 min) 的末端, 检测蛋白和小分子的相互作用。为了消除非特异性作用, 采用“双扣除”法, 即同时使用两列传感器, 一列为生物素化蛋白固定的 SA 传感器, 另一列为空白的 SA 传感器。实验依次按照基线平衡 60 s, 结合 120 s 和解离 120 s 的顺序进行。使用 Data analysis 9.0 软件中的 global 1:1 模型拟合数据, 计算解离常数  $K_D$  值。使用 GraphPad Prism 5.0 作图, 结果展示了 3 个独立实验中获得的代表图片。

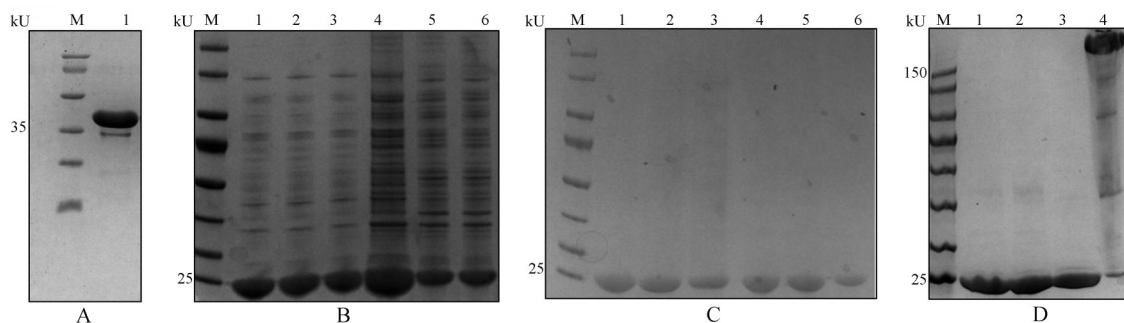
**化合物对 HIV-1 衣壳蛋白体外组装的影响** 在体外, 高盐离子浓度可引发 CA 蛋白自发组装。该组装过程的发生引起溶液吸光度的变化, 在波长 350 nm 处通过监控体系浊度的改变来检测苏拉明对 CA 体外装配的影响<sup>[39]</sup>。将 CA 蛋白在缓冲液 (50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0) 中透析 16~18 h 后浓缩至 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  备用。以 2:1 的比例将 5  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl 溶液与磷酸盐溶液 (200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 8.0) 混合即得到组装缓冲液。阴性对照和阳性对照分别为 DMSO 和 CAI。将 74  $\mu\text{L}$  组装缓冲液和 1  $\mu\text{L}$  苏拉明加到板孔中混匀, 加入 25  $\mu\text{L}$  120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CA 蛋白引发反应。立即将板子用酶标仪 350 nm 处读取吸光度值, 每隔 1 min 读取 1 次, 持续 39 min。数据导出后使用 GraphPad Prism 5 拟合曲线, 结果展示了 3 个独立实验获得的代表图片。

**分子模拟** 从 PDB 数据库下载 CA CTD 的晶体复合物结构 (PDB ID: 2BUO) 和 CA 六聚体的晶体复合物 (PDB ID: 4XRO)。分子对接前, 首先删除 CA CTD 口袋内和 CA 六聚体中的配体及水分子。提取 CA CTD 单链和 CA 六聚体, 分别保存为 pdb 格式。下载苏拉明的 SDF 格式, 使用 OpenBabel 3.1.1 转换为 mol2 格式。接着先使用在线工具 Swiss Dock 进行小分子和 CA CTD 的对接, 所有设置均为默认值。然后使用 PyMol 的 align 模块将小分子/CA CTD 复合物与 CA 六聚体的晶体结构进行叠合, 得到小分子与 CA 六聚体及与 CA CTD 和 CA NTD 界面的结合模式<sup>[40,41]</sup>。所有的模拟结果使用 PyMol (<http://www.pymol.org/pymol>) 进行可视化<sup>[42]</sup>。

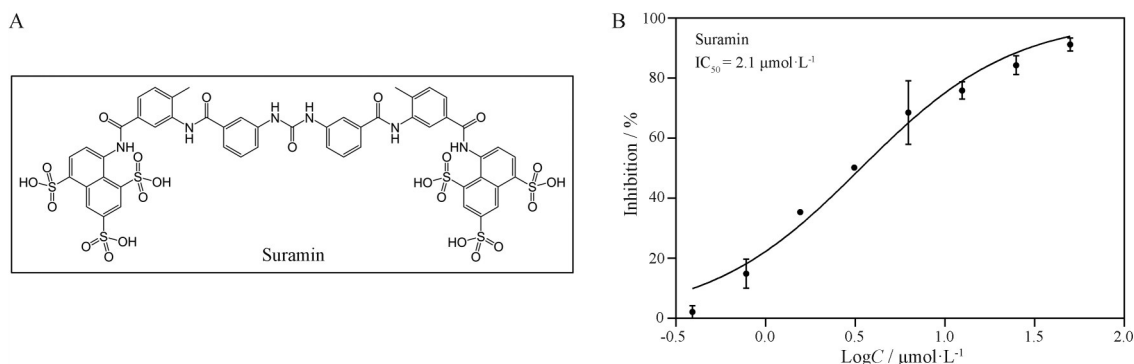
## 结果

### 1 蛋白表达纯化

将重组质粒 pGEX-4T-CA CTD 转化宿主菌 BL21 (DE3), 以 IPTG 诱导蛋白表达。使用 Glutathione 亲和层析柱纯化带有 GST 标签的 CA CTD 蛋白。SDS-PAGE 检测纯化结果。图 1A 结果显示, 在 35 kU 上方出现了目的条带, 与预期的分子质量接近, 纯度达到 90% 以上。图 1B 为 CA 蛋白 (单体和 4Mu 突变体) 经过 HiTrap SP HP 阳离子交换柱纯化后的结果, 泳道 1~3 是 CA 蛋白单体经过阳离子交换柱后的洗脱结果, 泳道 4~6 是 4Mu CA 经过阳离子交换柱后的洗脱结果, 在预期的分子质量 24 kU 处有明显的蛋白条带。图 1C 为 CA 蛋白 (单体和 4Mu 突变体) 经过 HiTrap Q FF 阴离子交换柱纯化后的结果, 泳道 1~3 是 CA 单体流穿 Q 柱的结果, 泳道 4~6 是 4Mu CA 流穿 Q 柱的结果, 在预期的分子质量 24 kU 处均呈现单一条带, 说明纯化的 CA 蛋白具有很高的纯度。图 1D 结果显示, 在变性条件下, CA 蛋白 (泳道 1) 和 4Mu CA 蛋白 (泳道 3) 均以单体形式存在; 在非变性条件下, CA 蛋白 (泳道 2) 仍然为单体形式, 4Mu CA 蛋白 (泳道 4) 则绝大部分以六聚体形式存在。



**Figure 1** Purification results of HIV-1 CA analyzed by SDS-PAGE. A: Purification result of CA CTD protein with GST tag; B: Purification result of CA protein (monomer and 4Mu) through HiTrap SP HP cation exchange column (1-3: Elution results of CA protein monomer; 4-6: Elution results of CA 4Mu); C: HiTrap Q FF anion exchange column; D: Comparison results of CA protein (monomer and 4Mu) denaturation (1, 3) and nondenaturation (2, 4); M: Protein marker



**Figure 2** Dose-response curves of suramin for CA CTD-CAI interaction. A: The chemical structure of suramin; B: The inhibition result of suramin on CA CTD-CAI by HTRF

### 2 苏拉明抑制 CA CTD-CAI 相互作用活性检测

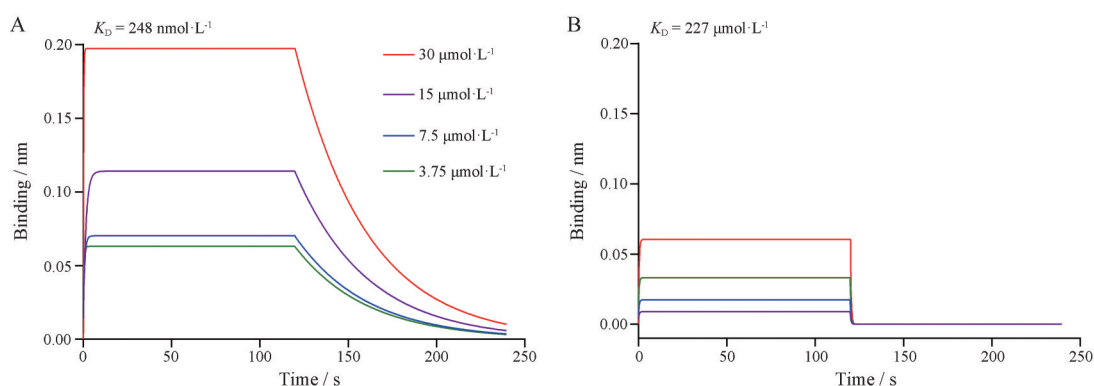
苏拉明的化学结构如图 2A 所示。在反应体系中, 苏拉明以  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  作为起始浓度进行倍比稀释, 测定其对 CA CTD-CAI 的半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。图 2B 结果表明, 苏拉明对 CA CTD-CAI 相互作用的抑制作用呈现浓度依赖性,  $\text{IC}_{50}$  值为  $2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 3 苏拉明与 CA 蛋白的亲和力测定

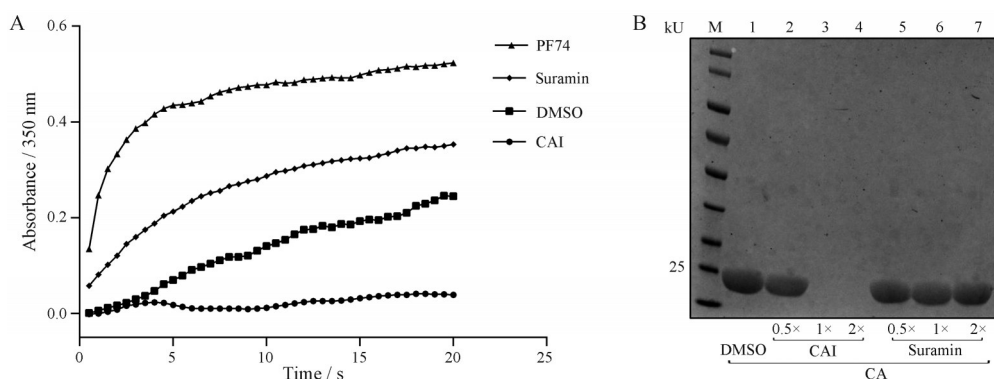
为了验证苏拉明与其作用靶点 CA 蛋白的结合亲和力, 运用 BLI 测定与 HIV-1 CA 单体和六聚体的结合能力, 检测结果表明, 苏拉明与 CA 六聚体的亲和力较高 ( $K_D = 248 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 图 3A), 与 CA 单体的亲和力非常弱 ( $K_D = 227 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 图 3B)。苏拉明与 CA 六聚体的结合方式属于快结合慢解离, 而与 CA 单体的结合属于快结合快解离。

### 4 苏拉明对体外衣壳蛋白装配的影响

苏拉明能够结合 CA 六聚体, 推测其可能会影响 CA 蛋白在体外的装配。通过基于体系浊度的 CA 体外组装检测评估了苏拉明破坏 CA 组装的能力。如图 4A 所示, DMSO 阴性对照, PF74 与 CAI 为阳性对照, 加入 PF74 显著增加了 CA 蛋白多聚化, 加入 CAI 几乎完全抑制了 CA 蛋白的组装。苏拉明的加入也显著加



**Figure 3** Results of affinity test of suramin with different forms of CA by BLI. A: Hexamer; B: Monomer



**Figure 4** Impact of suramin on *in vitro* CA assembly. A: The effect of suramin on CA *in vitro* assembly was detected by monitoring the change in turbidity of the system at 350 nm; B: The amount of protein in the precipitate was analyzed by SDS-PAGE. The ratio of DMSO (1) to CA protein was 1:1. The ratio of CAI (2-4) and suramin (5-7) to CA protein was 0.5:1, 1:1, 1:2, respectively. M: Protein marker

快了 CA 蛋白的组装, 证明苏拉明的结合破坏了体外 CA 蛋白的组装。为了进一步验证苏拉明对 CA 蛋白体外组装的影响, 将 CAI 或者苏拉明与 CA 蛋白分别以不同的比例进行混合, 离心后, 采用 SDS-PAGE 分析沉淀中的蛋白量。图 4B 结果显示, 当 CAI 与 CA 蛋白的比例为 1:1 时, CA 蛋白的体外组装完全被阻断, 而苏拉明的加入却加速了 CA 蛋白的组装。

### 5 苏拉明与 CA 蛋白结合模式的研究

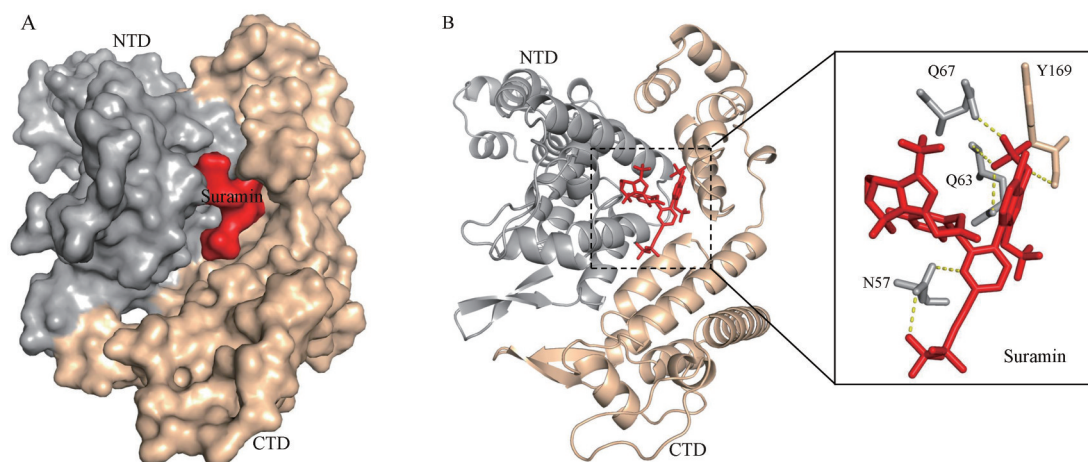
使用分子对接模拟苏拉明与 CA NTD/CA CTD 的结合模式。从 PDB 数据库下载 CA CTD 三维结晶图 (PDB code: 2BUO), 使用在线对接工具 Swiss Dock 将苏拉明与作用靶点 CA CTD 进行对接, 将苏拉明与 CA CTD 形成的复合物结构与 CA 六聚体 (PDB code: 4XRO) 叠合。结果显示 (图 5A), 苏拉明的结合位点位于 CA 六聚体相邻亚基 N 末端-C 末端 (NTD-CTD) 之间形成的结合腔, 分别与 CA CTD 的 Y169 残基, CA NTD 的 Q63、Q67 和 N57 残基形成了氢键 (图 5B)。

### 讨论

十二肽 CAI 结合到 CA CTD 的疏水腔中, 变构地

将 CA CTD 锁定为非功能性构象, 进而阻止 HIV-1 病毒组装<sup>[17]</sup>。该区域高度保守, 是寻找新的衣壳蛋白抑制剂的理想靶点。本课题组前期基于 HTRF 技术构建了靶向该变构位点的抑制剂筛选方法, 得到了 3 个能够有效抑制 HIV-1 复制的小分子抑制剂<sup>[38,43]</sup>。本文继续采用该方法, 并结合生物膜干涉技术、生物化学实验和分子模拟, 发现老药苏拉明能在体外扰乱 CA 蛋白的装配, 其主要靶向 CA 蛋白六聚体中相邻 CA 蛋白之间的结合界面。

衣壳蛋白是病毒的重要结构蛋白, 由其组装而成的外壳包裹着病毒的遗传物质和多种蛋白质, 在病毒的生命周期中发挥重要作用<sup>[44]</sup>。2022 年, 第一个 HIV-1 衣壳抑制剂 lenacapavir (sunlenca, GS-6207) 上市, 证明了 CA 是开发抗 HIV-1 药物的有效靶点<sup>[45]</sup>。靶向衣壳蛋白的 HIV-1 抑制剂通过稳定衣壳或破坏病毒衣壳的稳定性来阻断病毒的复制。以 CAI 和 BI64 为代表的抑制剂在体外抑制 CA 的装配, 而以 PF-74 和 lenacapavir 为代表的抑制剂则在体外促进 CA 的无序装配<sup>[13]</sup>。研究发现, 抑制剂对 CA 装配的不同作用, 源于他们与 CA 单体或 CA 六聚体的亲和力差异<sup>[44]</sup>。PF-74 和



**Figure 5** Suramin binds to the CA NTD/CA CTD interfaces in hexameric CA. A: Compound structure mapping using molecular docking to simulate the binding model of suramin with CA NTD/CA CTD; B: The superposition result of the complex structure of suramin with CA NTD/CA CTD and CA hexamer

lenacapavir对CA六聚体亲和力要强于对CA单体的亲和力, CAI和BI64则只结合CA单体。本研究发现苏拉明对CA六聚体的亲和力远高于CA单体,且苏拉明在体外促进CA蛋白,符合文献报道的小分子抑制剂与CA蛋白的亲和力与其作用机制有关的推论。苏拉明与CA六聚体的亲和力远高于CA单体,一方面暗示其抗HIV-1活性的发挥可能与CA六聚体有关<sup>[46]</sup>,另一方面说明苏拉明的作用位点在CA-CA相互作用的界面上<sup>[47]</sup>,而CA单体则因缺乏这种界面,导致其与苏拉明的亲和力降低。

苏拉明是一种多磺酸盐合成聚阴离子化合物,1904年由Paul Ehrlich合成,可谓百年老药<sup>[48]</sup>。起初苏拉明主要用于治疗非洲锥虫病和盘尾丝虫病,目前苏拉明作为一种抗肿瘤药物广泛应用于前列腺癌、肺癌、结肠癌、骨肉瘤等恶性肿瘤的治疗。研究发现,苏拉明可与病毒的CA蛋白发生相互作用。Ren等<sup>[49]</sup>发现,苏拉明可与肠道病毒A71型(EV-A71)的CA蛋白正电荷区域相互作用,阻断病毒的吸附和进入,从而抑制病毒的复制。Albulescu等<sup>[50]</sup>发现,苏拉明可与寨卡病毒的CA蛋白结合阻止病毒组装,导致病毒的吸附和释放被阻断,起到抑制病毒复制的作用。Ho等<sup>[51]</sup>发现,苏拉明会减少基孔肯雅病毒中衣壳蛋白的表达,抑制病毒的进入与传递,进而抑制病毒复制。至今尚未见苏拉明与HIV-1衣壳蛋白相互作用的报道。作者发现苏拉明可以影响HIV-1衣壳蛋白在体外的装配,将为CA抑制剂的开发提供新的骨架,未来需要在苏拉明的结构基础上,利用合理药物设计并结合抗HIV-1活性测试,开发出更为有效的CA蛋白抑制剂和抗HIV-1药物。

早在1987年,De Clercq<sup>[52,53]</sup>就发现苏拉明是逆转录酶(reverse transcriptase, RT)抑制剂。近几十年的研究表明,HIV-1的衣壳在病毒复制的整个过程中发挥了重要作用,而不是仅仅作为结构蛋白存在<sup>[8-10]</sup>。HIV-1依赖衣壳完成其逆转录过程,机制可能如下:封闭的病毒衣壳可能作为逆转录的分子反应容器,在逆转录的几个小时过程中,有助于维持反转录酶及其他核心成分的足够浓度<sup>[54]</sup>。研究发现,衣壳能够引发病毒开始转录,衣壳形态异常会影响HIV-1的感染性和反转录,小分子抗病毒化合物诱导的HIV-1的衣壳早熟导致逆转录受到抑制<sup>[55-58]</sup>。本研究中,作者发现苏拉明能够影响CA蛋白组装成衣壳,因此推测苏拉明与CA蛋白结合间接影响了RT的活性,导致病毒的复制受到抑制。另外,还有研究报道,苏拉明通过结合到HIV-1胞膜蛋白GP120的V3区阻断病毒吸附至细胞表面<sup>[28]</sup>。因此,苏拉明影响HIV-1复制的机制是多样的,需要在未来不断挖掘。

**作者贡献:** 张大为负责实验设计、实验指导和论文审阅修改;许晓双负责实验研究过程、数据分析、论文撰写。

**利益冲突:** 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

## References

- [1] Hel Z, McGhee JR, Mestecky J. HIV infection: first battle decides the war [J]. *Trends Immunol*, 2006, 27: 274-281.
- [2] Fauci AS, Lane HC. Four decades of HIV/AIDS-much accomplished, much to do [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1-4.
- [3] Hawkins T. Understanding and managing the adverse effects of antiretroviral therapy [J]. *Antiviral Res*, 2010, 85: 201-209.
- [4] Ndung'u T, McCune JM, Deeks SG. Why and where an HIV cure is needed and how it might be achieved [J]. *Nature*, 2019,

- 576: 397-405.
- [5] Ganser BK, Li S, Klishko VY, et al. Assembly and analysis of conical models for the HIV-1 core [J]. *Science*, 1999, 283: 80-83.
- [6] Li S, Hill CP, Sundquist WI, et al. Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein [J]. *Nature*, 2000, 407: 409-413.
- [7] Briggs JA, Wilk T, Welker R, et al. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores [J]. *EMBO J*, 2003, 22: 1707-1715.
- [8] Freed EO. HIV-1 assembly, release and maturation [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 484-496.
- [9] Campbell EM, Hope TJ. HIV-1 capsid: the multifaceted key player in HIV-1 infection [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 471-483.
- [10] Novikova M, Zhang YL, Freed EO, et al. Multiple roles of HIV-1 capsid during the virus replication cycle [J]. *Virology*, 2019, 541: 119-134.
- [11] Thenin-Houssier S, Valente ST. HIV-1 capsid inhibitors as anti-retroviral agents [J]. *Curr HIV Res*, 2016, 14: 270-282.
- [12] Carnes SK, Sheehan JH, Aiken C. Inhibitors of the HIV-1 capsid, a target of opportunity [J]. *Curr Opin HIV AIDS*, 2018, 13: 359-365.
- [13] McFadden WM, Snyder AA, Kirby KA, et al. Rotten to the core: antivirals targeting the HIV-1 capsid core [J]. *Retrovirology*, 2021, 18: 41.
- [14] Zhang XJ, Sun L, Meuser ME, et al. Design, synthesis, and mechanism study of dimerized phenylalanine derivatives as novel HIV-1 capsid inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 226: 113848.
- [15] Huo ZP, Zuo XF, Kang DW, et al. Progress on AIDS drug targets and small molecule inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2018, 39: 356-374.
- [16] Li J, Wang W. Progress in the study of HIV capsid structure and drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 36: 1088-1095.
- [17] Wang L, You QD. First-in-class small molecule drugs in 2021 [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 43: 854-862.
- [18] Patel PC, Beasley HK, Hinton A, et al. Lenacapavir (Sunlenca®) for the treatment of HIV-1 [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44: 553-554.
- [19] Momany C, Kovari LC, Prongay AJ, et al. Crystal structure of dimeric HIV-1 capsid protein [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 1996, 3: 763-770.
- [20] Sticht J, Humbert M, Findlow S, et al. A peptide inhibitor of HIV-1 assembly *in vitro* [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 671-677.
- [21] Ternois F, Sticht J, Duquerroy S, et al. The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12: 678-682.
- [22] Bartonova V, Igonet S, Sticht J, et al. Residues in the HIV-1 capsid assembly inhibitor binding site are essential for maintaining the assembly-competent quaternary structure of the capsid protein [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283: 32024-32033.
- [23] Machara A, Lux V, Kožisek M, et al. Specific inhibitors of HIV capsid assembly binding to the C-terminal domain of the capsid protein: evaluation of 2-arylquinazolines as potential antiviral compounds [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 545-558.
- [24] Zhang HT, Zhao Q, Bhattacharya S, et al. A cell-penetrating helical peptide as a potential HIV-1 inhibitor [J]. *J Mol Biol*, 2008, 378: 565-580.
- [25] Zhang HT, Curreli F, Zhang XH, et al. Antiviral activity of  $\alpha$ -helical stapled peptides designed from the HIV-1 capsid dimerization domain [J]. *Retrovirology*, 2011, 8: 28.
- [26] Zhang HT, Curreli F, Waheed AA, et al. Dual-acting stapled peptides target both HIV-1 entry and assembly [J]. *Retrovirology*, 2013, 10: 136.
- [27] Mitsuya H, Popovic M, Yarchoan R, et al. Suramin protection of T cells *in vitro* against infectivity and cytopathic effect of HTLV-III [J]. *Science*, 1984, 226: 172-174.
- [28] Yahi N, Sabatier JM, Nickel P, et al. Suramin inhibits binding of the V3 region of HIV-1 envelope glycoprotein gp120 to galactosylceramide, the receptor for HIV-1 gp120 on human colon epithelial cells [J]. *J Biol Chem*, 1994, 269: 24349-24353.
- [29] Aguilar JS, Rice M, Wagner EK. The polysulfonated compound suramin blocks adsorption and lateral diffusion of herpes simplex virus type-1 in Vero cells [J]. *Virology*, 1999, 258: 141-151.
- [30] Kessler HA, Pottage JC Jr, Trenholme GM, et al. Effects of suramin on *in vitro* HBsAg production by PLC/PRF/5 cells and hepatitis B virus DNA polymerase activity [J]. *AIDS Res*, 1986, 2: 63-72.
- [31] Garson JA, Lubach D, Passas J, et al. Suramin blocks hepatitis C binding to human hepatoma cells *in vitro* [J]. *J Med Virol*, 1999, 57: 238-242.
- [32] Basavannacharya C, Vasudevan SG. Suramin inhibits helicase activity of NS3 protein of dengue virus in a fluorescence-based high throughput assay format [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 453: 539-544.
- [33] Xu KS, Ren HY, Zhu JW, et al. Suramin inhibits the *in vitro* expression of encephalitis B virus proteins NS3 and E [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2003, 23: 375-379.
- [34] Jiao LY, Ouyang S, Liang MF, et al. Structure of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus nucleocapsid protein in complex with suramin reveals therapeutic potential [J]. *J Virol*, 2013, 87: 6829-6839.
- [35] Croci R, Pezzullo M, Tarantino D, et al. Structural bases of norovirus RNA dependent RNA polymerase inhibition by novel suramin-related compounds [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e91765.
- [36] Wang YX, Qing J, Sun YN, et al. Suramin inhibits EV71 infection [J]. *Antiviral Res*, 2014, 103: 1-6.
- [37] Ellenbecker M, Lanchy JM, Lodmell JS. Inhibition of Rift

- Valley fever virus replication and perturbation of nucleocapsid-RNA interactions by suramin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 7405-7415.
- [38] Zhang DW, Luo RH, Xu L, et al. A HTRF based competitive binding assay for screening specific inhibitors of HIV-1 capsid assembly targeting the C-terminal domain of capsid [J]. *Antiviral Res*, 2019, 169: 104544.
- [39] Lanman J, Sexton J, Sakalian M, et al. Kinetic analysis of the role of intersubunit interactions in human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly *in vitro* [J]. *J Virol*, 2002, 76: 6900-6908.
- [40] Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. SwissDock, a protein-small molecule docking web service based on EADock DSS [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: W270-W277.
- [41] Grosdidier A, Zoete V, Michielin O. Fast docking using the CHARMM force field with EADock DSS [J]. *J Comput Chem*, 2011, 32: 2149-2159.
- [42] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis [J]. *J Comput Chem*, 2004, 25: 1605-1612.
- [43] Zhang DW, Luo RH, Xu L, et al. Natural-product-library-based screening for discovery of capsid C-terminal domain targeted HIV-1 inhibitors [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 55: 105926.
- [44] Zhang XJ, Xu SJ, Sun L, et al. Research progress on antiviral drugs targeting capsid proteins [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2021, 31: 705-720.
- [45] Hung M, Niedziela-Majka A, Jin DB, et al. Large-scale functional purification of recombinant HIV-1 capsid [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e58035.
- [46] Sun L, Huang TG, Dick A, et al. Design, synthesis and structure-activity relationships of 4-phenyl-1*H*-1,2,3-triazole phenylalanine derivatives as novel HIV-1 capsid inhibitors with promising antiviral activities [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 190: 112085.
- [47] Price AJ, Jacques DA, McEwan WA, et al. Host cofactors and pharmacologic ligands share an essential interface in HIV-1 capsid that is lost upon disassembly [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004459.
- [48] Wiedemar N, Hauser DA, Mäser P. 100 years of suramin [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e01168-19.
- [49] Ren PJ, Zheng YM, Wang WQ, et al. Suramin interacts with the positively charged region surrounding the 5-fold axis of the EV-A71 capsid and inhibits multiple enterovirus A [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 42902.
- [50] Albulescu IC, Kovacicova K, Tas A, et al. Suramin inhibits Zika virus replication by interfering with virus attachment and release of infectious particles [J]. *Antiviral Res*, 2017, 143: 230-236.
- [51] Ho YJ, Wang YM, Lu JW, et al. Suramin inhibits Chikungunya virus entry and transmission [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0133511.
- [52] De Clercq E. Suramin: a potent inhibitor of the reverse transcriptase of RNA tumor viruses [J]. *Cancer Lett*, 1979, 8: 9-22.
- [53] De Clercq E. 1984-discovery of the first anti-HIV drug, suramin [J]. *Viruses*, 2021, 13: 1646.
- [54] Hu WS, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription [J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2012, 2: a006882.
- [55] Shi J, Zhou J, Shah VB, et al. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization [J]. *J Virol*, 2011, 85: 542-549.
- [56] StremLau M, Perron M, Lee M, et al. Specific recognition and accelerated uncoating of retroviral capsids by the TRIM5 $\alpha$  restriction factor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 5514-5519.
- [57] Wu XL, Anderson JL, Campbell EM, et al. Proteasome inhibitors uncouple rhesus TRIM5 $\alpha$  restriction of HIV-1 reverse transcription and infection [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 7465-7470.
- [58] Blair WS, Pickford C, Irving SL, et al. HIV capsid is a tractable target for small molecule therapeutic intervention [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1001220.