

抗呼吸道合胞病毒候选药物的研究进展

马东杰, 张彩乔, 张红霞, 张卫婷*

华北制药金坦生物技术股份有限公司, 河北 石家庄 050000

摘要: 呼吸道合胞病毒(RSV)感染是引发婴幼儿细支气管炎、肺炎的主要病因之一, 会导致严重的呼吸系统疾病, 会增加罹患哮喘的风险。帕利珠单抗和利巴韦林可用于预防和治疗 RSV 感染, 两者均推荐用于 RSV 感染风险最高的患者, 但其有益作用尚有争议。抗 RSV 药物的研究主要集中于不同的作用机制如抑制病毒融合、靶向非融合靶点和靶向病毒宿主的抑制剂。因此, 预防或治疗呼吸道合胞病毒感染, 深入研究抗病毒策略, 指导候选药物筛选尤显突出, 但是至今仍未有抗病毒药物或疫苗被批准用于 RSV 感染的治疗或预防。随着病毒学的深入研究, 研究者将开发针对病毒靶点蛋白或宿主细胞因子的一系列的抗病毒药物, 这些药物研发将为抗病毒提供新的途径。

关键词: 呼吸道合胞病毒; 抗病毒; 抑制剂; 抗体

中图分类号: R974

文献标志码: A

文章编号: 1674-5515(2020)05-1049-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2020.05.046

Research progress on drug candidates of anti-respiratory syncytial virus

MA Dong-jie, ZHANG Cai-qiao, ZHANG Hong-xia, ZHANG Wei-ting

NCPC Genetech Biotechnology Co., Ltd., Shijiazhuang 050000, China

Abstract: Respiratory syncytial virus (RSV) infection is one of the main causes of bronchiolitis and pneumonia in infants and young children. RSV causes severe respiratory diseases and increases the risk of asthma. Palivizumab and ribavirin can be used to prevent and treat RSV infection, and both are recommended for patients with the highest risk of RSV infection, but their beneficial effects are controversial. Research on antiviral drugs has focused on different mechanisms of action, such as inhibiting viral fusion, targeting non-fused targets, and inhibitors targeting viral hosts. Therefore, prevention or treatment of respiratory syncytial virus infection, in-depth study of antiviral strategies, and guidance of drug candidate screening are particularly prominent. Although researchers have made great efforts to prevent this virus, no antiviral drugs or vaccines have been approved for the treatment or prevention of RSV infection. With the in-depth study of virology, researchers will develop a series of antiviral drugs targeting viral target proteins or host cytokines. The development of these drugs will provide new ways for antiviral.

Key words: respiratory syncytial virus; antiviral; inhibitor; antibody

呼吸道合胞病毒(RSV)是一种肺炎病毒, 属于副粘病毒科, 这种病毒感染几乎所有3周岁以下儿童^[1], 将导致婴幼儿急性呼吸道感染。RSV感染可能引发儿童, 侵染免疫力低下、老年人及器官移植患者等, 严重肺炎, 甚至导致早产儿死亡。RSV通过接触口腔或鼻腔分泌物进行传播, 可能导致患者反复感染。RSV感染具有明显季节性, 春初秋末是感染高发期。RSV感染可引起机体的免疫应答, RSV的F蛋白和粘附表面糖蛋白(G)将诱导机体

产生中和抗体^[2]。感染患者一般接受支气管扩张剂和黏液溶解剂的对症治疗, 对于高危早产儿(孕周<29周, 无慢性肺部疾病)应同时接受单克隆抗体治疗^[3]。利巴韦林是目前唯一被批准用于治疗严重呼吸道合胞病毒感染的小分子药物。但因其副作用大、疗效不确切、给药途径困难等原因, 使用也受到限制^[4-5]。

RSV是一种RNA病毒, 基因组大小约为15.2 kb, 编码NS1、NS2、N、P、M、SH、G、F、M2-1、

收稿日期: 2020-01-21

作者简介: 马东杰, 男, 研究方向为医药工程。E-mail: malab123@163.com

*通信作者 张卫婷 E-mail: weeting98@163.com

M2-2 和 L 的 G 蛋白基因分别为 629、724~762 bp。目前已确定的 RSV-A 病毒亚型有 BE/A1、GA1、GA2、GA4、GA5, RSV-A 病毒亚型有 13 种 (GB1~GB13)。根据 G 蛋白胞外结构域的不同, 将 RSV 病毒分为 RSV-A 和 RSV-B 两种亚型。研究显示 RSV-A 和 RSV-B 的 G 蛋白进化速率分别为 1.83×10^{-3} 、 1.95×10^{-3} /(点·年)^[5]。而 RSV-A 和 RSV-B 全基因组的进化速率为 6.47×10^{-4} 、 7.76×10^{-7} /(点·年)^[6]。

越来越多 RSV 抗病毒药物和疫苗进入临床试验, 随着 RSV 疫苗和抗病毒药物的开发和使用, 很可能会出现 RSV 逃逸突变体。对于 RSV 感染的防治, 抗病毒药物和疫苗的备受关注。但是, 针对处于 RSV 感染风险的不同人群的 RSV 疫苗候选物开发越来越多。RSV 的细胞及动物模型在候选 RSV 疫苗的临床前测试中起着重要作用, 尽管许多药物在临床前研究中已显示出功效, 但很少有进展到临床试验。这至少部分是由于缺乏能够评估 RSV 感染发病机理的细胞及动物模型。抗病毒药物的研究促进新型 RSV 药物抑制剂的发现。这些抑制剂可以基于不同的作用机制如抑制病毒融合、靶向非融合靶点以及靶向病毒宿主的抑制剂。这些抗病毒药物处于不同的临床阶段。

1 抑制病毒融合的候选药物

通常使用的靶向病毒抗原, 并依照其与宿主细胞融合分子, 依照其生物属性分为抗体药物和小分子融合抑制剂。

1.1 抗体药物

Palivizumab (Synagis®) 是一种人源化单克隆抗体, 与 F 蛋白抗原性位点 II 上的保守表位相互作用。建议在高危幼儿中预防性使用该抗体, 需要反复注射并且价格昂贵。2014 年, Palivizumab 给药指导原则发生了变化, 取消了对妊娠 29~35 周而无慢性肺病儿童的常规 Palivizumab 给药, 并且在 RSV 感染后停止对任何儿童进行预防注射, 从而导致使用量大大减少。阿斯利康开发了一种亲和力成熟的人源化单克隆抗体, 命名为 Motavizumab (MEDI-524/Numax®), 与 Palivizumab 有 13 个氨基酸不同; 它具有更大的亲和力和更高的体外效力。尽管小鼠实验中取得了令人鼓舞的结果, 但是当治疗 RSV 感染婴儿治疗时, 并未降低病毒载量或减轻病情, 该研究终止。其他开发抗 RSV 抗体的公司包括 Ablynx 和 Regeneron。Ablynx 完成了通过肺吸入给药的纳米抗体的 I 期研究 (NCT01483911 和

NCT01875926), 而 Regeneron 在开发也靶向 F 蛋白的全人单克隆抗体 (REGN2222) 方面更先进, 并通过肌肉注射给药^[7]。一项正在进行的 III 期、随机、双盲的临床研究 (NCT02325791) 中, 正在评估其预防早产儿 RSV 感染的药效以及其安全性^[8]。

1.2 小分子融合抑制剂

RSV 进入宿主细胞涉及两个膜蛋白, 一个三聚体融合糖蛋白 (F) 和一个附着糖蛋白 (G)。RSV 进入细胞是由病毒 F 蛋白介导, 并激活宿主受体与附着蛋白的结合, 触发了 F 蛋白从融合前的亚稳态, 急剧转变为融合后的 6 螺旋束 (6HB) 稳定构象, 完成宿主细胞膜和病毒包膜的融合, 从而使病毒核糖蛋白复合物融合和进入宿主细胞^[9]。与副粘病毒科的其他病毒相比, RSV 的 G 蛋白对于病毒进入宿主不是必需的, 尽管它确实有助于提高感染效率。有一种靶向 RSV 的 G 蛋白的化合物 (MBX-300、Microbiotix 或 NMSO3), 可以通过阻断病毒包膜和细胞膜之间的静电结合来抑制病毒黏附。这种唾液酸脂质化合物的安全性和有效性已在动物模型中得到证实^[10]。与 G 蛋白相反, F 蛋白对于病毒的侵袭至关重要, 并且是目前正在开发的抗病毒药物的主要靶点^[11]。

1.2.1 抑制病毒融合的化合物 抑制病毒融合的化合物有 GS-5806、MDT-637 (VP-14637)、JNJ-2408068 (R-170591)、TMC353121、BMS-433771、BTA-C585、P13 和 C15。最初, Douglas 及其同事^[12]进行的一项研究表明, MDT-637 (VP-14637) 和 JNJ-2408068 (R-170591) 通过类似的机制抑制 RSV 融合。体外研究表明抗药性选择的变体对两种抑制剂均表现出明显的交叉耐药性, 并在病毒 F 蛋白的两个不同区域, HR2 (D486N、E487D 和 F488Y 点突变), 以及 HR1 和 HR2 之间的插入域 (K399I 和 T400A 点突变) 出现突变。在融合前, 这些不同“逃逸热点”彼此非常接近。另有研究表明 VP-14637、JNJ-2408068、GS-5806、BMS-433771、P13、C15 和 BTA-C585 干扰 RSV 的融合机制非常相似。研究发现 HRA 结构域的 α 螺旋 Y198 是这些化合物的关键结合位点, 也是 F 蛋白正确功能的必需氨基酸。最近, 除了这种直接逃逸机制外, 有人提出间接逃逸, 因为 RSV 的 F 蛋白中不稳定的突变降低了 F 蛋白的融合触发, 从而降低了抑制剂结合的机会。然而, 这种稳定性降低和融合性增强并不是耐药病毒株的一般特性。

(1) GS-5806 GS-5806 (Presatovir, Gilead Sciences

公司研发)是一种F蛋白变构抑制剂,可以阻止病毒进入,已经完成II期临床试验。GS-5806在体外对多种RSV临床分离株有广泛的活性,但是发现了RSV-A的F蛋白L138F和F140L/N571I突变,和RSV-B的F蛋白F488L或F488S的耐药毒株。在IIa期试验(NCT01756482)中,志愿者被分为7个组,感染RSV病毒5d后(但在症状发作之前)首先使用该化合物。GS-5806治疗将降低鼻腔冲洗液中的病毒载量(均值分别为250.7 vs. 757.7,根据lg10噬菌斑形成单位当量[PFUe]×mL/h进行计算; $P<0.001$),感染严重程度(用症状评分变化,根据曲线下面积,20.2 vs. 204.9×h; $P=0.005$)。在所有的小分子RSV抑制剂中,这小分子的疗效是最好的。在临床研究中,耐GS-5806的RSV变异毒株,其中以F140L和T400I变异最为常见。另外,D401E突变株在小鼠模型中仍具有致病性,即使该化合物用于临床,400位氨基酸残基突变热点的突变毒株仍然不能被有效控制。Gilead Sciences公司也在RSV感染住院并出现急性呼吸道症状的患者中进行,进行GS-5806的安全性和有效性(NCT02135614)的临床研究,如接受RSV感染肺移植的患者(NCT02534350)以及接受造血细胞移植,供血方患有上呼吸道和下呼吸道感染的临床研究(分别为NCT02254408和NCT02254421)。

(2) MDT-637 VP-14637(ViroPharma/Gilead)是MDT-637的改进型气雾剂。VP-14637表现出针对RSV-A菌株A2毒株的抗病毒活性,半最大效应浓度(EC_{50})值为1.4 nmol/L。它可以直接与F蛋白结合,并干扰RSV病毒与宿主细胞的融合。该化合物还具有针对75种RSV临床分离株(RSV-A和RSV-B)的体外抗病毒活性($EC_{50}=1.72$ nmol/L)。在这项研究中,发现了F基因突变的耐药毒株,RSV-A2(F488I、T400I、N517I)和RSV-B 18537(L141V)。使用RSV-A或RSV-B感染棉鼠,并在第2天使用分剂量气雾剂(126 μ g/kg),结果显示与对照组动物相比,其平均肺RSV滴度明显降低,组织病理学评分降低。临床前研究表明该化合物可以有效分布在上呼吸道和下呼吸道中。2012年,完成I期临床试验。2012年,进行IIa期试验,在健康受试者中进行VP-14637试验(EUDRACT编号2012-001107-20),但由于未知原因而中止。

(3) JNJ-2408068报道了一种苯并咪唑衍生物JNJ-2408068(R-170591),其对RSV-A的 EC_{50}

为0.16 nm。长毒株的活性大约是利巴韦林的10万倍。对人RSV A、B亚群临床分离株和牛RSV分离株均有抗病毒活性。该化合物不抑制其他副粘病毒属代表性病毒的生长。提出了一个耐药病毒分离物,显示F基因(D486N)的单点突变。JNJ-2408068还能抑制RSV感染的A549细胞释放促炎性细胞因子IL-6、IL-8和RANTES。这种化合物在几种动物(老鼠、狗和猴子)中有很长的组织保存时间。因为它的氨基乙基哌啶部分,这引起了人们的关注,并阻止了进一步的发展。

(4) TMC353121 TMC353121(Johnson & Johnson)是JNJ-2408068的优化衍生物,在组织中滞留的时间更短。它可以在体外阻止病毒细胞和宿主细胞融合。TMC353121通过干扰6HB融合后结构来抑制病毒融合,6HB融合后结构是由三聚体HR1与3个反向平行的HR2的分子内相互作用形成的。HR1和HR2通过疏水腔相互结合,被认为是潜在的药物结合位点^[62-63]。TMC353121被证明可以直接与HR1和HR2相互作用,从而形成与天然6HB构象不同的稳定结构。在一些实验动物中进行了TMC353121的实验,包括小鼠、大鼠和非人类灵长类动物。BALB/C小鼠鼻腔感染RSV A2后2d,开始使用TMC353121(剂量范围为0.25~10 mg/kg)进行治疗,动物肺中的病毒载量明显下降。TMC353121在RSV感染的棉鼠和非洲绿猴动物模型中效力测试表明,病毒载量随剂量的增加而减少。

(5) BMS-43377 BMS-433771是一种小分子抑制剂,对RSV-A和RSV-B实验室菌株和临床分离株的平均体外 EC_{50} 为20 nmol/L^[66-67]。BMS-433771的耐药病毒在F蛋白的F1域中,发现有单氨基酸突变(F140I、V144A、D392G、K394R、D489Y)。在两种啮齿动物RSV感染模型(BALB/c小鼠和棉鼠模型)研究中,在感染前口服给药时,该化合物也显示抗病毒活性,表明该化合物是有效预防疾病而不是治疗。直接亲和标记研究结果表明,该化合物结合6HB融合后结构的疏水腔,并干扰七肽重复序列的结合功能。BMS-433771有效阻止RSV病毒F三聚体的形成,对于开发其他RSV进入抑制剂提供了新策略。

(6) BTA-C585 BTA-C585(Biota/Aviragen)抑制RSV-A和RSV-B(包括临床分离株)毒株的体外复制, EC_{50} 值低于100 nmol/L。该化合物靶向F蛋白,耐药突变病毒F蛋白中携带S404C和

F488L, 这些突变毒株也对其他融合抑制剂, 如MDT-637和BMS-433771有耐药性。使用104 PFU/mL的RSV-A感染棉鼠前2 h, 口服25、50、100、250 mg/kg BTA-C585, 结果显示RSV-A感染后5 d, 肺中病毒mRNA降低了3.0 lg10。正在进行健康志愿者中完成了两项研究(NCT02558413、NCT02668367)和一项RSV病毒感染用药安全性、药效和药动学的研究(NCT02718937)。

(7) P13和C15 P13和C15可以有效抑制RSV-A亚型A2毒株复制, EC_{50} 值为0.11 $\mu\text{mol/L}$ (P13)和0.13 $\mu\text{mol/L}$ (C15)^[71]。研究中发现耐药毒株、突变F蛋白氨基酸突变、D489G (C15耐药毒株)、T400I和N197T (P13耐药毒株)。这3个突变位于HR1区(N197T), HR-2区(D489G)和F1亚基区(T400I)的富含半胱氨酸的结构域中。在这些区域中, 还检测到了与化合物BMS-433771、VP-14637和TMC353121的耐药性相关突变, 表明这些化合物的抗病毒机制可能相似。

1.2.2 JNJ-53718678 JNJ-53718678 (Johnson & Johnson)是处于临床开发的RSV抑制剂。迄今为止, 尚无关于该化合物的生物学, 结构或其他特征的数据报道。在健康人群中进行了安全性、耐受性和药动学特征(NCT02398591)以及不同的口服液体制剂的研究(NCT02426632)。在一项的随机、双盲、安慰剂对照的IIa期临床试验(NCT02387606)中, 在RSV感染的健康人群中, 研究反复口服JNJ-53718678的抗病毒活性、安全性和药动学。

1.2.3 AK-0529 AK-0529 (Ark Biosciences)是一种RSV抑制剂, 迄今为止尚未公开其结构或研究结果。在一项口服AK-0529的随机、双盲、安慰剂对照的I期临床研究中, 评估了单次上升剂量和多次上升剂量的安全性, 耐受性和药动学。该化合物具有良好的耐受性, 具有出色的安全性。目前, 已经在澳大利亚进行了另外两项临床研究(NCT02460016和NCT02654171)。第一项试验是Ib期研究, 其中还将对接受RSV感染住院的婴儿进行单剂量AK0529的抗病毒研究, 第二项试验是一项II期研究。

1.2.4 RFI-641 RFI-641 (Pfizer)是一种同CL-309623相似的联苯类似物, 对RSV-A和RSV-B实验室菌株和临床分离株均有很强的体外活性(EC_{50} 值约为20 nmol/L)。该化合物可以抑制RSV与宿主细胞的结合及融合, F蛋白446位突变毒株对该化

合物表现为耐药。鼻内给药时, 在不同的动物模型中有效, 在病毒攻击小鼠前2 h, 使用1.3 mg/kg的RFI-641可使肺病毒滴度降低1.5 lg10。在棉鼠实验中, 使用相同的预防剂量给药, 剂量为10 mg/kg可使肺病毒滴度降低2.6~3.2 lg10。在非洲绿猴感染RSV前2 h, 使用雾化器以15 mg/mL, 2 h剂量吸入RFI-641, 会导致病毒载量减少3.4 lg10。除了预防性给药外, 该化合物在猴模型中也显示出治疗活性(在猴模型中, 感染后24 h首次给药, 每天持续8 d, 1次/d)。

2 靶向病毒非融合靶点的候选药物

根据化合物靶向不同的病毒靶点, 依照作用的靶点将这些化合物分为L-蛋白抑制、靶向RSV-N蛋白的抑制剂、针对N-P蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂、针对SH蛋白的抑制剂和针对M2-1蛋白的抑制剂等。

2.1 L-蛋白抑制剂

负链RNA病毒都编码, 一个具有多种生物学活性的L (Large)蛋白, 该蛋白具有RNA聚合酶活性, 复制病毒基因组并转录mRNA。L蛋白也是一种封端酶, 可将病毒mRNA转录物的5'端进行鸟苷酸化和甲基化。此外, 它具有多聚腺苷化活性, 可以保护病毒mRNA的3'端。病毒聚合酶仍然是治疗病毒感染的主要治疗靶标。已经批准了各种聚合酶抑制剂用于疱疹、乙型肝炎、丙型肝炎病毒和艾滋病(HIV)感染, 这对于改善患者生活质量至关重要。

2.1.1 利巴韦林 利巴韦林是唯一获得许可的治疗RSV的药物, 由于其毒性(包括骨髓抑制和潜在的致癌性和致畸性)和边际效应, 在RSV感染住院的婴儿中不常使用, 而且给药困难(需要配合气雾剂使用), 用药成本高。

利巴韦林的抗病毒作用机制是抑制酶5磷酸肌苷脱氢酶(IMP DH)活性、免疫调节抗病毒天然和细胞反应、终止病毒RNA的合成过程、抑制病毒mRNA的封端反应、增加病毒基因组中的突变积累等。

2.1.2 ALS-008176 ALS-008176是新型RSV聚合酶抑制剂ALS-008112 (Alios Janssen)的前体, 是胞苷核苷类似物。口服给药后, ALS-008176在血浆中代谢为ALS-008112, 被呼吸道细胞吸收。细胞内ALS-008112被细胞酶进一步代谢为活性代谢物ALS-008112-5'-三磷酸酯, 后者是RSV聚合酶的抑制剂(K_i 为0.09 $\mu\text{mol/L}$)。体内研究表明这种活性代

谢产物在猴子的肺中具有较长的半衰期(~29 h)。体外实验发现了耐药毒株,其中L蛋白中的4个突变(M628L、A789V、L795I和I796V)比较常见。后3个突变位点与催化序列C_{(810)GDNQ₍₈₁₃₎}非常接近,这个区域和RNA聚合时核苷酸的加入相关。实验还表明ALS-008112是一种广谱副粘病毒属的抑制剂,甚至它对副流感病毒和水疱性口炎病毒(Rhabdovirus 弹状病毒科)具有抗病毒活性。上述病毒具有共同的保守催化序列C相关,ALS-008176对副粘病毒和弹状病毒科以外的负链RNA病毒和正链RNA病毒都没有抗病毒活性。

在一项ALS-008176临床试验中,健康成年人志愿者接受4 lg₁₀ PFU的RSV-A Memphis 37b病毒,每天两次通过鼻洗液RT-PCR检测RSV感染情况。在此研究中,ALS-008176的治疗中未发现任何严重的不良事件或任何参与者的研究中止。在开始治疗后的12 h内,治疗组的病毒载量绝对减少,并且RSV RNA检不出的平均时间为1.3~2.3 d(安慰剂组为7.2 d)。为此,目前涉及RSV感染婴儿的临床试验(NCT02202356)正在进行中^[13]。

2.1.3 BI-D BI-D (Boehringer Ingelheim)是通过在生化筛选得到的化合物,最初认为该化合物具有RSV聚合酶抑制活性^[85]。进一步的分析表明该分子不抑制病毒RNA转录的起始或延长,但会导致转录的提前终止,使得短RNA(<50 nt)增加。对BI-D有抗性毒株在L蛋白的1269、1381和1421位有突变,1269位周边序列基序对核苷酸结合,RNA合成是必不可少的。加上在感染细胞中出现短RNA的存在,这使得研究人员推测BI-D阻止了病毒mRNA的转录使得转录提前中止。对于水泡性口炎病毒的研究发现,BI-D是在5'末端加帽和转录延伸时发挥作用的,在BI-D促使病毒mRNA转录形成5' pppGp末端部分,而在没有抑制剂情况下,这是一个完全封端的5'末端部分(^{7m}GpppG^(m)p)。RSV-L蛋白结构分析显示,这些区域具有GDP-多核糖核苷酸转移酶(GDP-PRNTase)活性。PRNTase负责病毒mRNA的封闭,RSV-L蛋白的3D结构还提供了有关封端和mRNA延伸可能过程。在转录早期,封端结构域的PRNTase活性位点指向RNA聚合酶活性位点,当转录物达到一定长度时,其5'末端到达封端结构域。当PRNTase发挥作用时,封端结构域才被置换,释放出病毒mRNA的5'端,从而使病毒mRNA进一步延伸,并进一步使帽结构甲基

化。如果加帽反应被抑制并且加帽结构域没有被置换,那么短的mRNA将无法进一步延长,只能产生短的、无帽的mRNA^[14]。

经RSV感染的小鼠体内功效研究表明,BI-D化合物以0.4 mg/(kg·d)鼻内给药后,小鼠肺部的感染性病毒载量降低了0.6 lg。由于病毒mRNA的加帽是独特的生化机制,不同于宿主细胞的加帽机制,因此该过程仍然是抗病毒药物发现的很有希望的途径。

2.1.4 AZ-27 AZ-27是一种非核苷的L蛋白抑制剂。AZ-27 (Astra Zeneca)是YM-53403的后续产品,它是在基于CPE的筛选工作中发现的,可抑制RSV-A复制(实验室菌株和临床分离株),其EC₅₀值在10~40 nmol/L,抗RSV-B的活性不那么明显(EC₅₀~1 μmol/L)。体外实验表明AZ-27抑制细胞病毒的复制,耐药毒株的鉴定发现,在L基因出现Y1631H突变。该抑制剂与BI-D、利巴韦林或RSV604不具有交叉抗性。RSV和RSV-L蛋白的序列比对发现,Y1631位于连接封端结构域和甲基转移酶结构域之间,在RSV-A和RSV-B蛋白附近氨基酸序列100%保守,与其他副粘病毒的序列不同。随后的研究表明,AZ-27对于不同RSV聚合酶抑制活性不同,即AZ-27对于基因组3'端转录抑制要强对于5'端基因转录^[15]。该化合物在启动子处抑制了RNA的从头合成,从而阻止了RNA转录和复制。推测,AZ-27可以影响了RSV的RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)RNA合成所需的特定结构,进而影响了其合成功能。Y1631位置被视为铰链区的一部分,这对于RdRp的柔韧性和RNA合成的起始状态与延伸状态之间的动态过渡非常重要。迄今为止,尚无研究报道AZ-27是否影响RdRp的PRNTase或MTase功能。

2.2 靶向RSV-N蛋白的抑制剂

病毒核蛋白N与RSV基因组RNA紧密结合,形成左旋螺旋N-RNA核糖核蛋白复合物(RNP)。该RNP是RdRP(L蛋白)转录和复制的模板,病毒RNA的合成是由病毒磷酸体(P)介导的。蛋白质是一种与L和N相互作用的多功能蛋白质。它允许通过RDRP和随后的RNA聚合对RNP模板进行高效和特异性识别。这样,随着RdRP的进展,p允许RdRP和RNP之间的持续接触。氮、磷的详细动力学,在病毒RNA合成过程中,L和病毒RNA的相互作用还没有被完全理解,但是不同的观察结果指向了下面的模型。N蛋白由N端和C端结构域

(NTD、CTD)和铰链区组成。不同N蛋白与病毒RNA的分子间相互作用,位于CTD和NTD的铰链区。足以形成螺旋RNP复合体。P蛋白是多聚体,在N-NTD的疏水口袋中与其C端肽相互作用。这导致N-蛋白铰链区开放,并允许L蛋白进入病毒RNA。由于P蛋白是多聚体,该复合物将同时与更多的N-蛋白相互作用,并以这种方式沿着多聚体释放RNA模板。E序列N蛋白在RNA合成过程中,由于L-蛋白的易位,原有的N-P相互作用将不断消失,而形成新的N-P相互作用。这样,病毒多聚酶复合物就可以沿着模板进一步爬行。除病毒蛋白外,一些宿主因子也被认为参与了病毒RNA合成的复杂机制^[16]。

病毒核蛋白N与RSV基因组RNA紧密结合,形成左旋螺旋N-RNA核糖核蛋白复合体(RNP)。该RNP是RdRp(L蛋白)转录和复制的模板。病毒RNA合成是由病毒磷酸(P)蛋白介导的,该蛋白是一种与L和N发生相互作用的多功能蛋白,它是通过RdRp和RNA聚合有效而特异性地识别RNP模板。针对病毒RNA合成过程中,N、P、L和病毒RNA相互作用的详细动力学尚不完全清楚。N蛋白由N和C端(CTD、NTD)结构域组成,之间被铰链区相连。铰链区与病毒RNA之间形成螺旋RNP复合物。P蛋白是多聚体,其C端肽与NTD疏水区域相互作用,这会导致N蛋白铰链区打开,并允许L蛋白进入病毒RNA中,同时与更多N蛋白相互作用,并以此方式释放RNA模板。随着L蛋白在RNA合成过程中重新定位,现有的N-P相互作用将不断消失,同时形成新的相互作用。这样,病毒聚合酶复合物可以沿着其模板进一步完成复制。除病毒蛋白外,还有一些宿主因子参与病毒RNA合成的这种复杂机制。

RSV604(Astra Zeneca)是RSV-A和B复制的小分子抑制剂,对两种病毒的 $EC_{50} \sim 0.8 \mu\text{mol/L}$ 。该化合物是通过基于CPE筛选工作中获得的。该化合物可以有效抑制病毒复制。体外选择的耐药突变体(抗病毒活性损失>10倍)在N蛋白中带有突变I129L和L139I。

RSV604抑制病毒RNA合成及病毒传染。其对于RNA合成抑制是细胞依赖性的(HeLa中观察到了这种作用)。利用表面离子共振实验证实,N蛋白确实是该分子的药物靶点。细胞类型依赖性抗病毒活性,表明宿主因子可能也参与了抗病毒作用机理^[15]。

在一项I期研究中,口服RSV604在健康志愿者被证明是安全和耐受性良好的。在整个研究中,600 mg的剂量和随后的450 mg/d的剂量导致谷浓度($C_{\min}$)高于 EC_{90} 。在造血干细胞移植患者中组织也进行同样的研究,因为RSV感染对于造血干细胞移植患者存在重大风险。由于患者人数有限,病情复杂以及病毒的季节性,试验具有很大挑战^[17]。在试验期间,大多数患者的RSV604药物水平低于预期水平,与安慰剂相比,病毒载量没有显著差异。只有在RSV604血药水平高于 EC_{90} ,病毒载量才会下降。

2.3 针对N-P蛋白质-蛋白质相互作用的抑制剂

最近,随着N-NTD与P-CTD的X晶体结构研究开展,对于研究N-NTD和P-CTD相互作用,以及P蛋白末端残基如何深入渗透到N蛋白口袋中的机制具有重要意义。由于这种N-P相互作用对于病毒RNA合成至关重要,因此该口袋被认为是干扰病毒复制的新靶点。计算机模型筛选及结构研究确定了一系列化学物质,这些化合物具有与该口袋P-CTD结合的1-苄基-1*H*-吡唑-3,5-二羧酸酯(BPdC)支架。使用表面等离子共振的实验表明,P-CTD与BPdC分子之间存在相互作用。使用具有最高亲和力的化合物M76,进行初步细胞实验证实未显示出明显的抗病毒活性。因为该分子具有两个带负电的羧酸盐,很可能会阻止细胞的摄取。制备一种前体药,其中羧酸盐被pH敏感部分屏蔽,该部分在细胞质中水解而被释放,显示出一定的抗病毒活性,但活性有限($EC_{50} \sim 122 \mu\text{mol/L}$, $SI \sim 2$)^[18]。

2.4 针对SH蛋白的抑制剂

同F和G蛋白一样,SH蛋白(小疏水蛋白)是RSV的包膜蛋白之一。尽管F和G在病毒入侵宿主细胞的作用研究的比较深入,但SH的作用尚不清楚。该SH蛋白是一种病毒孔蛋白,由几种动物病毒编码的小疏水蛋白家族,在病毒感染的细胞内形成亲水孔,对于病毒具有广泛功能,通常与免疫调节活性有关^[19]。

早期研究SH在RSV致病中没有作用,因为SH敲除毒株在细胞培养中行为相似(复制动力学,瘟疫形成),但感染黑猩猩后表现出严重的毒性衰减。在小鼠试验中,这些毒株肺部复制与野生RSV相同,但在上呼吸道复制明显较少。这种衰减可能是由于体内对SH敲除毒株的IL-1b应答增加,SH蛋白的孔结构通过离子变化抵消了NLRP3炎性小

体的激活^[19]。

由于这种减毒作用, SH 敲除毒株正在用于疫苗研发。此外, 靶向 SH 蛋白可能会开辟新的抗病毒治疗方法。最近, 利用生物化学筛选得到, 派洛宁 B 被确定为 SH 蛋白孔的功能抑制剂。详细的生物物理特征表明, 派洛宁 B 螺旋面和 SH 脂质一侧结合, 而不进入孔腔。这表明与其他维罗帕林抑制剂(金刚烷胺, M2 型流感抑制剂)相似的抑制机制。人 RSV 毒株 SH 同派洛宁 B 的结合位点是高度保守的, 该分子抗病毒活性为($EC_{50} \sim 100 \text{ nmol/L}$)。

2.5 针对 M2-1 蛋白的抑制剂

RSV 的 M2-1 蛋白(194 个氨基酸)是同源四聚体, 转录过程中的活性因子, 通过其核心结构域以竞争性方式与 RNA 和 P 蛋白结合。它可以防止转录的提前终止, 因此, 使 M2-1 蛋白对于在病毒生命周期中病毒 RNA 精准转录至关重要。体外实验表明 M2-1 优先结合病毒基因正义链末端和 poly-A 序列, 但是 M2-1 改善转录效率的确切机制尚不清楚^[20]。

最近的一项研究表明环巴胺(CPM)在体外和体内都是 RSV 感染的有效抑制剂。CPM 是平滑蛋白(SMO)的拮抗剂, 在胚胎发育、细胞分化和肿瘤发生中起重要作用。然而 CPM 对于 RSV 的抑制是通过特异性抑制 M2-1 介导的 RSV 转录而实现的, 其作用不依赖于 SMO 受体^[21]。

3 靶向病毒宿主的抑制剂

由于人类基因组比病毒基因组稳定得多, 针对病毒复制周期中的一个重要宿主因子已被提出作为 RSV 感染预防或治疗的替代策略, 这种方法的一个主要挑战是避免不希望的脱靶效应或其他毒性。

由于人类基因组比病毒稳定得多, 因此可以以宿主因子作为开发预防或治疗 RSV 感染的靶点, 这种策略可能给机体带来脱靶效应或其他毒性。

用于治疗或预防的潜在宿主因子靶点包括一些暂定的 RSV 受体、辅助受体或辅助因子。如 Fractalkine 受体 CX3CR1 108、109, 糖蛋白/肝素 110, 细胞间黏附分子(ICAM-1)膜联蛋白 II、Toll 样受体 4、Akt、核仁素。已在探索后者作为抑制 RSV 复制的靶点的潜力方面做出了大量努力。它是一种存在于所有细胞中的必需蛋白, 已被不同的技术(包括病毒覆盖蛋白结合试验)鉴定。质谱和免疫沉淀作为 RSV 115 的潜在细胞受体。基于抗体结合表位的研究, RSV-F 蛋白-核仁素相互作用位点

可能发生在 429-437 位氨基酸附近(抗原位点 IV)。位于 F 蛋白 116-118 的顶端。RSV 受体拮抗剂 AS-1411 是一种富含鸟嘌呤的寡核苷酸, 最初用于癌症治疗, 作用于细胞表面的核仁素。AS-1411 经鼻腔给药(50 mg/kg)对小鼠体内呼吸道合胞病毒(RSV)有抑制作用。RSV 攻击前 4 h, 感染后第 4 天, 病毒水平降低 50%^[22]。

治疗或预防的潜在宿主靶点, 包括 RSV 受体, 辅助受体或辅助因子, 如 fractalkine 的受体 CX3CR1、糖蛋白/肝素、ICAM-1、膜联蛋白 II、toll 样受体 4、Akt 和核仁素。核仁素作为抑制 RSV 复制的潜在靶点, 它是在所有细胞中发现的必需蛋白, 通过病毒覆盖蛋白结合测定, 质谱法和免疫沉淀法等方法研究, 认为核仁素是 RSV 在细胞中的潜在受体^[3]。抗体结合表位研究证实 RSV-F 蛋白和核仁素相互作用的位点可能位于 F 蛋白顶点的 429-437 位氨基酸周围。AS-1411 是富含鸟嘌呤的寡核苷酸, 最初是为治疗癌症而开发的, 并且靶向细胞表面的核仁素。已在小鼠中证明了 AS-1411 体内抑制 RSV 的能力, RSV 攻击前 4 h 鼻内给予 AS-1411 (50 mg/kg), 在感染后第 4 天肺病毒水平降低了 50%。

4 结语

RSV 引起的急性呼吸道感染在婴儿和儿童中最普遍。RSV 感染的死亡率通常较低, 而在心脏或肺衰竭的婴儿中死亡率增加至 37%~73%, 在骨髓移植的患者中增加至 36%~45%。利巴韦林是被允许用于治疗 RSV 感染的药物, 通常以雾化剂的形式给儿童使用。但该药物药效缓慢且不良反应较多, 通常会抑制谷胱甘肽, 从而损伤红细胞的细胞膜, 使红细胞逐渐减少, 进而导致贫血。另外, 利巴韦林也会有致畸作用。目前, 对持续 RSV 感染尚无稳定可靠的治疗方法, 研究出可以用于预防的疫苗以及治疗抗病毒药上市是当务之急。综述了一系列的基于不同化学机制的抑制剂, 如基于病毒入侵途径和合成酶开发抑制剂, 有一些候选药物已经进入 II 临床研究阶段。包括儿童用于抗 RSV 药物也有望在几年内获批。针对不同耐药毒株的第 2 代 RSV 抑制剂, 也处于研发的不同阶段。这些药物的研发及上市将对于抵抗 RSV 引起的急性呼吸道感染。

参考文献

- [1] Lozano R, Naghavi M, Foreman K, *et al.* Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the

- Global Burden of Disease Study 2010 [J]. *Lancet*, 2012, 380(9859): 2095-2128.
- [2] Walsh E E. Respiratory syncytial virus infection: an illness for all ages [J]. *Clin Chest Med*, 2017, 38(1): 29-36.
- [3] Wong S K, Li A, Lanctôt K L, *et al.* Adherence and outcomes: a systematic review of palivizumab utilization [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 12(1): 27-42.
- [4] Jartti T, Gern J E. Role of viral infections in the development and exacerbation of asthma in children [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, 140(4): 895-906.
- [5] Ruckwardt T J, Morabito K M, Graham B S. Immunological lessons from respiratory syncytial virus vaccine development [J]. *Immunity*, 2019, 51(3): 429-442.
- [6] Zlateva K T, Lemey P, Moes E, *et al.* Genetic variability and molecular evolution of the human respiratory syncytial virus subgroup B attachment G protein [J]. *J Virol*, 2005, 79(14): 9157-9167.
- [7] Mas V, Nair H, Campbell H, *et al.* Antigenic and sequence variability of the human respiratory syncytial virus F glycoprotein compared to related viruses in a comprehensive dataset [J]. *Vaccine*, 2018, 36(45): 6660-6673.
- [8] Van Heeke G, Allosery K, De Brabandere V, *et al.* Nanobodies Nanobody is a registered trademark of Ablynx NV. as inhaled biotherapeutics for lung diseases [J]. *Pharmacol Therapeut*, 2017, 169: 47-56.
- [9] Liu X, Liang B, Ngwuta J, *et al.* Attenuated human parainfluenza virus type 1 expressing the respiratory syncytial virus (RSV) fusion (F) glycoprotein from an added gene: effects of prefusion stabilization and packaging of RSV F [J]. *J Virol*, 2017, 91(22): e01101-e01117.
- [10] Mesquita F D S, Oliveira D B L, Crema D, *et al.* Rapid antigen detection test for respiratory syncytial virus diagnosis as a diagnostic tool [J]. *J Pediatr (Rio J)*, 2017, 93(3): 246-252.
- [11] Tripp R A, Power U F, Openshaw P J M, *et al.* Respiratory syncytial virus (RSV): targeting the G protein provides a new approach for an old problem [J]. *J Virol*, 2018, 92(3): e01302-e01317.
- [12] Douglas J L, Panis M L, Ho E, *et al.* Small molecules VP-14637 and JNJ-2408068 inhibit respiratory syncytial virus fusion by similar mechanisms [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49(6): 2460.
- [13] Kawaguchi A, Bates A, Lee B E, *et al.* Virus detection in critically ill children with acute respiratory disease: a new profile in view of new technology [J]. *Acta Paediatr*, 2018, 107(3): 504-510.
- [14] Jorquera P A, Tripp R A. Respiratory syncytial virus: prospects for new and emerging therapeutics [J]. *Expert Rev Respir Med*, 2017, 11(8): 609-615.
- [15] Kabego L, Balol'ebwami S, Kasengi J B, *et al.* Human respiratory syncytial virus: prevalence, viral co-infections and risk factors for lower respiratory tract infections in children under 5 years of age at a general hospital in the Democratic Republic of Congo [J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(4): 514-522.
- [16] Smith T R F, Schultheis K, Broderick K E. Nucleic acid-based vaccines targeting respiratory syncytial virus: delivering the goods [J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2017, 13(11): 2626-2629.
- [17] Shook B C, Lin K. Recent advances in developing antiviral therapies for respiratory syncytial virus [J]. *Top Curr Chem (Cham)*, 2017, 375(2):40.
- [18] Graham B S. Vaccine development for respiratory syncytial virus [J]. *Curr Opin Virol*, 2017, 23: 107-112.
- [19] Ellis J A. How efficacious are vaccines against bovine respiratory syncytial virus in cattle? [J]. *Vet Microbiol*, 2017, 206: 59-68.
- [20] Brealey J C, Chappell K J, Galbraith S, *et al.* Streptococcus pneumoniae colonization of the nasopharynx is associated with increased severity during respiratory syncytial virus infection in young children [J]. *Respirology*, 2018, 23(2): 220-227.
- [21] Zheng Y, Liu L, Wang S, *et al.* Prevailing genotype distribution and characteristics of human respiratory syncytial virus in northeastern China [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(2): 222-233.
- [22] Schmidt M E, Varga S M. Modulation of the host immune response by respiratory syncytial virus proteins [J]. *J Microbiol*, 2017, 55(3): 161-171.