

广谱抗病毒抑制剂研究进展*

王程玉 王晓佳**

(中国农业大学动物医学院, 农业部人畜共患病重点实验室, 北京 100193)

摘要 研制广谱抗病毒制剂是病毒学前瞻性方向, 也是国际医药界倍受瞩目的热点之一. 近年来, 广谱抗病毒制剂相关研究获得长足进展, 突破了抗病毒制剂单一宿主的瓶颈与限制, 以及广谱类制剂活性相对较弱的原有思维, 部分成果已面向临床应用. 本文基于病毒侵染以及宿主细胞防御两个层面, 全面综述新型广谱抗病毒抑制剂的研究进展与应用潜力, 讨论现存的挑战, 并展望了未来研究趋势.

关键词 广谱, 抗病毒制剂, 病毒入侵, 感染, 细胞防御

学科分类号 Q6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00611

病毒按其外壳是否包裹着富含脂质的膜可简单地分为无囊膜病毒与有囊膜病毒两类. 无囊膜病毒主要是通过吞饮作用在网格蛋白介导下进入被感染细胞; 有囊膜病毒的入侵主要是病毒囊膜与宿主细胞膜的融合过程. 根据病毒入侵过程中囊膜表面糖蛋白的构象变化, 囊膜病毒可被分为 3 类: 其中正黏病毒科、反转录病毒科、纤丝病毒科、副黏病毒科与冠状病毒科被归为 I 类囊膜病毒, 其代表病毒为流感病毒、人免疫缺陷病毒、埃博拉病毒与严重急性呼吸综合征病毒^[1]; 黄病毒科与披膜病毒科被归为 II 类囊膜病毒^[2], 其代表病毒为登革热病毒与日本脑炎病毒; 疱疹病毒科、弹状病毒科与杆状病毒科被归为 III 类囊膜病毒^[3], 其代表病毒为单纯疱疹病毒与水痘性口炎病毒. 目前广谱抗病毒制剂研究基于两方面设计, 一是从病毒侵染层面, 二是从宿主细胞防御层面, 相关研究已取得很多突破性成果, 包括通过高通量方法筛选活性分子、表达重组蛋白, 以及发现具有广谱抗病毒效果的生物提取物等, 其中部分制剂或药品业已面向临床试验或商品化. 本文综述了这些广谱抗病毒制剂的设计与研究进展.

1 基于病毒侵染层面设计的抗病毒制剂

从病毒侵染层面研究抗病毒制剂, 即基于抑制

病毒与宿主细胞吸附、融合或胞吞、脱壳、复制、病毒粒子的装配与出芽等一个或者几个过程而设计, 从而终止病毒的生命周期, 例如抑制病毒融合糖蛋白的某一变构过程, 可使病毒囊膜无法与宿主细胞膜融合. 此研究策略的优势在于抗病毒制剂的作用位点明确、且不影响细胞结构, 因此不易产生细胞毒性. 不足之处在于, 针对病毒特殊结构而设计的抗病毒制剂, 通常广谱性不明显, 易产生耐药性, 甚至抗病毒治疗本身可选择性促进突变病毒的生长. 相关综述详见本节下文, 以及图 1 与表 1.

1.1 病毒与受体吸附

病毒与宿主细胞的膜融合是囊膜病毒入侵宿主细胞的第一步, 此过程涉及到病毒囊膜表面蛋白与宿主细胞表面受体蛋白(或唾液酸)之间的相互作用与构象变化. 流感病毒通过与含唾液酸的结合受体(血凝素与神经氨酸酶)相互作用而入侵细胞, 唾液酸酶则可通过水解唾液酸, 使病毒无法结合到细胞膜表面, 从而对抗病毒入侵. 抗流感药物扎那米韦

* 国家自然科学基金(31101819)及新世纪人才基金(NCET-11-0486)资助项目.

** 通讯联系人.

Tel: 010-62734377, E-mail: wangxj@cau.edu.cn

收稿日期: 2012-12-16, 接受日期: 2013-01-23

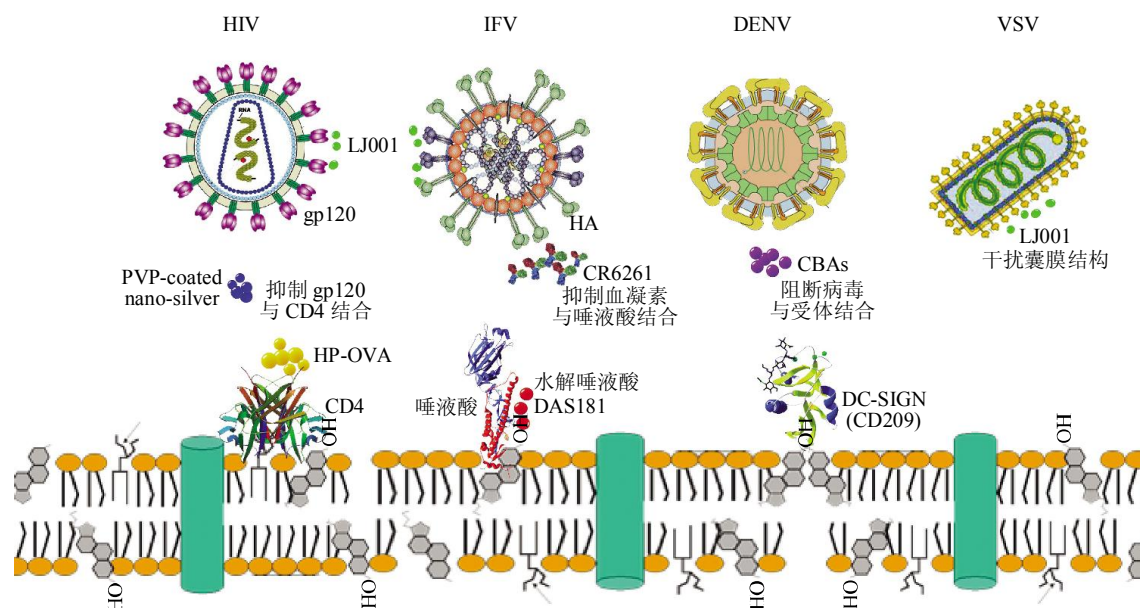


Fig. 1 Broad-spectrum antiviral agents designed based on virus entry mechanism

图 1 基于病毒入侵机制设计的广谱抗病毒抑制剂

HIV: 人免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus); IFV: 流感病毒(influenza virus); DENV: 登革热病毒(Dengue virus); VSV: 水泡性口炎病毒(vesicular stomatitis virus).

和奥司他韦, 以及新近报道的帕拉米韦均属于神经氨酸酶阻断剂范畴, 前两者在临床应用过程中效果显著, 但是近年来, 随着流感病毒的不断变异与耐药毒株的产生, 这些药物疗效下降甚至失效等问题日益严峻, 研制新型抗病毒制剂迫在眉睫^[4]. 重组唾液酸酶(编号为 DAS181, 商品名为流感酶)的出现象征着广谱意义上的抗流感蛋白类药物的研制取得重大进展, 其可有效地保护小鼠免受现阶段已呈现耐药性的各种流感与副流感病毒侵染, 亦可防控继发肺炎球菌感染的威胁^[5]. 最近, 有学者基于血凝素高度保守的抗原表位, 研发了一种单克隆抗体 CR6261, 其可阻断病毒与靶细胞膜融合时的构象重排, 从而抑制高致病性流感病毒的侵染, 无论是攻毒前或者之后 1 天内注射 CR6261(30 mg/kg 体重剂量), 均可使感染小鼠获得有效保护, 对于其他 10 种血清型流感病毒也有显著抑制作用, 表明其具备开发为广谱抗流感制剂的潜力^[6].

近年来, 基于人免疫缺陷病毒与受体相互作用机理而设计的抗病毒制剂也取得很大进展, 免疫缺陷病毒只有一种囊膜糖蛋白 gp160, 可被宿主细胞蛋白酶作用后裂解成以共价键相结合的糖蛋白 gp120 与 gp41, 其中 gp120 负责与细胞受体 CD4

及其辅助受体(CCR5、CXCR4)结合. 银离子本身即具有抗病毒与杀菌能力, 聚乙烯吡咯烷酮包被的纳米银颗粒(PVP-coated nano-silver)可通过竞争性地与 gp120 结合, 使之失去与 CD4 受体结合的能力, 致使病毒无法入侵细胞, 从而可在无细胞环境下起到抗病毒效果, 因此具备研制成外用软膏剂型的潜质^[7]. 与此相似, 食物蛋白中普遍存在的卵清蛋白具有一定的微生物杀伤作用, 而经过 3- 羟基邻苯二甲酸酐修饰的卵清蛋白(HP-OVA)则具有广谱抗病毒作用, 不仅可阻止 gp120 蛋白与受体互动, 还可影响 gp41 蛋白核心六螺旋束结构(1.2 节有详述)的形成, 以阻断病毒-宿主细胞膜融合发生^[8], 卵清蛋白来源广泛且造价低廉, 因此被开发为预防性抗病毒制剂有明显的市场竞争优势. 此外, DC-SIGN(CD209)是登革热病毒入侵树突状细胞表面的主要受体与靶位, 植物凝集素提取物 CBAs 则被报道可阻断病毒粒子与 DC-SIGN 结合, 从而抑制病毒入侵^[9]. 当然, 由于存在其他入侵途径与受体(如 CD206 与热休克蛋白 70), 这种抑制是不完全的.

1.2 病毒膜融合

人免疫缺陷病毒囊膜表面糖蛋白 gp120 与细胞

受体结合后, 可促使跨膜亚单位 gp41 发生变构, 其两段七肽重复区域(heptad repeat, HR)相互作用形成六螺旋束结构, 以拉近病毒囊膜与细胞膜距离并最终引发膜融合发生。值得关注的是, I 类囊膜病毒膜融合过程中融合糖蛋白 HRs 区域均可互作形成相似的六螺旋束结构, 可见此融合核心结构是设计广谱抗病毒制剂的理想靶位。P20 是通过双酵母杂交技术从人类骨髓细胞 DNA 信息库中筛选出的一类 gp41 蛋白结合分子, 可直接影响 HR 及六聚螺旋束的功能以阻断病毒与宿主细胞膜融合。P20 与已上市的 HR 同源物恩夫韦地(T-20)并没有交叉耐药性, 且对其他囊膜病毒无效。更值得关注的是, 含片段 WGRLEGRRT 的 4 种突变体相对于其他 7 种 P20 突变体分子, 显示出更强的抗病毒活性, 且对其他病毒存在潜在的膜融合抑制活性, 这为设计广谱抗病毒药物提供了参考靶位^[10]。本课题组根据 I 类与 III 类囊膜病毒糖蛋白 HR 区域及六螺旋束结构的固有特征, 将各个氨基酸位点进行功能性突变与重组整合——即根据 a 位点高度保守的特点(为亮氨酸 L 或异亮氨酸 I), 不予改动, 非重要螺旋形成单位(b, c, f 及 g 位氨基酸, 亲水位点)交叉置换为赖氨酸(K)或谷氨酸(E), 以促进螺旋结构形成盐桥的趋势, 此突变不影响蛋白质的电荷平衡, 重点考虑不同病毒 HR 区域在 d, e 位(蛋白质结合位点)氨基酸的性质, 如疏水性及极性等, 进行突变与重组设计, 最终研制出对三科病毒膜融合均有高效阻遏作用的多肽^[11]。鉴于多肽类制剂的半衰期较短, 课题组对该多肽进行修饰, 结果表明胆固醇修饰物以 1.6 mg/kg 体重肌注 4 次即可获得 75% 以上的保护率(待发表), 相对未修饰多肽需每日注射(一般为 9~12 次), 该项研究无疑可为多肽类抗病毒制剂的临床应用提供重要的现实可行性。此外, 胆固醇修饰物可穿过动物的血脑屏障, 这为保护中枢神经系统免受病毒侵染提供新的策略。

1.3 病毒复制

流感病毒囊膜与细胞内质网膜融合后, 释放出单股负链 RNA, 其编码 RNA 多聚酶、核蛋白、膜蛋白与非结构蛋白等构件(后者在内质网或高尔基体上组装 M 蛋白和包膜), 同时在细胞核内, 病毒的遗传物质不断复制并与 RNA 多聚酶、核蛋白等组建病毒核心, 这就是病毒的复制过程。1993 年, 在俄罗斯药物化学研究中心研制出一种新型抗流感病毒药物阿比多尔(arbidol), 这是一种白色粉末状吡啶衍生物, 其抗病毒机理与大多数抗病毒药物不

同, 不仅可干扰病毒与细胞膜融合, 还可通过激活 2, 5- 寡腺苷酸合成酶(其催化合成的寡腺苷酸可激活细胞中的核糖核酸酶 L, 降解病毒的 mRNA 及细胞的 RNA, 以抑制蛋白质的合成), 从而阻断病毒早期复制。阿比多尔还拥有独特的药理作用与良好的安全性能, 临床上对甲乙型流感、呼吸道综合症, 以及其他呼吸道病毒均有一定抑制效果, 被认为是值得进一步开发的广谱抗病毒制剂^[12]。二氢乳酸脱氢酶(DHODH)可将二氢乳清酸脱氢生成乳清乳酸, 这是嘧啶生物合成的关键步骤, 而最终产物尿嘧啶核苷酸是 DNA 与 RNA 合成的必需原料。化合物 A3 可通过与 DHODH 结合以中断嘧啶的生物合成, 从而阻止多种病毒的复制, 包括负链 RNA 病毒(如甲乙型流感病毒)、正链 RNA 病毒(丙型肝炎病毒与登革热病毒)与 DNA 病毒(牛痘病毒与腺病毒)等^[13]。有趣的是, A3 化合物的结构不同于已知的 DHODH 抑制剂来氟米特(leflunomide)或布喹那(brequinar), 可见其作用模式也有所不同, 相关机理尚待进一步阐明。与此相似, 新近发现的 JMN3-003 分子可通过阻止病毒的 RNA 多聚酶活性, 使病毒无法复制, 但不会影响未感染细胞中信使 RNA 与蛋白质的合成, 研究同时证明, JMN3-003 既不会迅速引发病毒的耐药性突变, 也没有明显的副作用^[14]。

基因沉默系统是生物体抵抗病原体侵染的防卫体系, 而在长期的协同进化过程中, 一些病原体编码蛋白可抵消基因沉默作用。基因转录与翻译水平小干扰 RNA(siRNA)介导的抑制或沉默现象, 在抗病毒研究中具有重要意义, 为临床病毒感染性疾病的防治提供了新的对策。日本脑炎病毒基因的高变异性, 使作用于单一机制的抗病毒药物往往难以起效。科研人员近期根据该病毒 4 个主要血清型的 7 个主要基因序列, 设计出 9 种 siRNA, 进而采用新型 RNA 多聚酶将这 9 种 siRNA 高度保守区重新组合, 最终设计出新型 siRNA 类似物, 其同时表达以上 9 种 siRNA, 可有效阻止不同血清型脑炎病毒的复制^[15], 当然这种设计也只限于“相对广谱”的概念范畴。

1.4 病毒出芽

流感病毒在感染细胞中成功复制后, 新合成的核糖核蛋白复合体(即病毒核糖核酸与 RNA 多聚酶以及核蛋白等组建的病毒核心)可通过 CRM1 等一系列复杂的出核途径, 进入细胞质内装配成病毒核衣壳, 成熟的子代病毒继而被释放到细胞外, 这就

是病毒的出芽过程. 病毒核衣壳蛋白表面有许多富含 α 螺旋结构的区域, 抑制这些“热点区域”与其他核衣壳蛋白的结合, 即可有效阻断病毒出芽. 进一步研究表明, 在不同病毒之间该热点区域的基因序列相似性并不很高, 然而含有氨基酸序列“GDFNALS N”的区域却是多种病毒的作用靶位, 尤其包括一些无囊膜病毒(如腺病毒与呼肠病毒), 同时此区域也是病毒蛋白质-细胞蛋白质互作的关键结合域^[6], 相关研究为发现与设计广谱抗病毒制剂提供了新视角.

2 基于宿主细胞防御层面设计的抗病毒制剂

从宿主细胞防御层面研究抗病毒制剂, 即通过

改变或者消除为病毒复制所需但是对细胞本身生长并不重要的蛋白质或分子, 以影响病毒的生命周期, 从而达到抗病毒效果. 针对宿主细胞的抗病毒制剂, 可以在真正意义上达到广谱抗病毒的目的, 且可最小化耐药性产生的可能性. 但问题在于, 如何确定抗病毒制剂靶向的蛋白质或分子仅为病毒所需而不为细胞所必需, 以及如何将抗病毒制剂的细胞毒性控制在机体能够承受的范围之内, 这些论题的解析需要开展细胞信号途径方面的系统化研究. 相关综述详见本节下文, 以及图 2 与表 1.

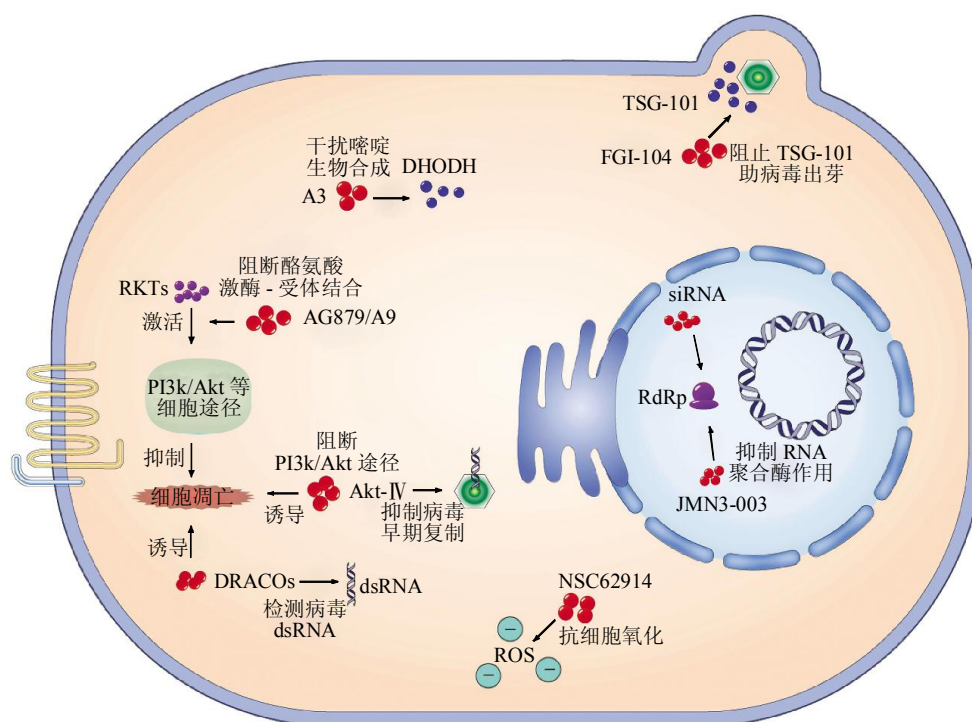


Fig. 2 Broad-spectrum antiviral agents designed based on cell defense mechanism

图 2 基于宿主细胞防御机制设计的广谱抗病毒抑制剂

2.1 细胞膜

病毒囊膜本质上是出芽时所带离宿主的部分细胞膜, 尽管如此, 病毒囊膜与细胞膜却有明显不同. 研究表明, 当细胞膜受到大于 $0.2 \mu\text{m}$ 而小于 $10 \mu\text{m}$ 的损伤后, 几秒钟内就会被胞浆内膜修复, 而病毒囊膜不具备这些修复功能(如新陈代谢). 与抗菌肽作用机理相似, 芳香甲基二烯罗丹宁衍生物(LJ001)的设计也是利用细胞膜与病毒囊膜的结构学差异, 通过改变病毒囊膜双分子层结构, 从而不

可逆地阻止病毒与细胞膜融合过程. 基于此机理, 不难解释 LJ001 为何无法阻止修复后受感染细胞与邻近细胞发生膜融合, 以及为何 LJ001 对多种不同科的囊膜病毒效果显著, 但是对非囊膜病毒无效的原因^[7]. 与 LJ001 破坏病毒囊膜以干扰病毒入侵的机理不同, 下述化合物是名副其实地靶向于细胞膜——在对海洋生物抗病毒活性物质研究中, 科学家们发现, 角鲨体内没有任何反转录病毒的核酸序列, 而此序列在其他鱼类中却大量存在, 表明角鲨

的病毒防御机制非常有效而独特。奇怪的是, 角鲨基因组既无干扰素基因也无干扰素受体基因, 说明角鲨抵御病毒入侵与干扰素抗病毒途径无关。从角鲨与八目鳗组织中提取的角鲨胺(squalamin)被认为在抗病毒过程中起着重要作用。很多病毒都利用肌动蛋白细胞骨架入侵宿主细胞, 细胞膜的向细胞质面有一些由于静电力作用(这为病毒复制所需)而被锚定的蛋白质(即膜锚定蛋白), 其突变或者缺失可能干扰病毒入侵、复制、装配与出芽等多个过程。在与带负电荷的磷脂双分子层融合后, 携带正电荷的角鲨胺可干扰并促使膜锚定蛋白异位。此外, 角鲨胺还可通过替换细胞膜内表面阳离子的抑制成分以激活离子通道并抑制钠质子交换, 使细胞不再支持病毒复制, 由此可见角鲨胺至少可在病毒入侵与复制两个阶段对抗病毒侵染。据报道, 角鲨胺在肝脏中的半衰期为 12~24 h, 以每日 10~15 mg/kg 体重的剂量腹腔注射, 并持续 6~9 天使用, 可保护 85%以上受感染动物免受多种囊膜病毒感染^[18]。

2.2 细胞自噬与凋亡

细胞程序性死亡(包括细胞自噬与凋亡)是宿主对抗病原体侵染的第一道防御线, 对维持细胞内环境稳定也具有重要作用。然而病原体在长期进化过程中往往可以调控甚至成功逃避自噬与凋亡的抗感染作用, 如疱疹病毒可通过其编码的蛋白抑制细胞程序性死亡的发生, 从而逃避宿主自清除, 而登革热与人类免疫缺陷症病毒则可利用细胞程序性死亡, 以促进自身增殖。解析病毒如何调控细胞程序性死亡以利于自身的生长与复制, 可为研制抗病毒制剂提供新对策。双链 RNA 激活切冬酶寡聚体(DRACOs)的设计与研究被认为是 2011 年病毒学领域最重要的发明与科学成果之一, 其选择性地激活含有特异双链 RNA(dsRNA)的细胞发生凋亡, 使受感染细胞迅速凋亡, 促使宿主在与病原体感染的对抗中占据优势地位。由于正常细胞中并不含有 dsRNA(这也是区别感染与未感染细胞的一项决定性依据), 理论上讲, DRACOs 对未感染细胞并无毒性作用。DRACOs 可对抗 15 种病毒的侵染, 在不同细胞中均可发挥强抗病毒活性, 同时 DRACOs 突破了病毒是否有囊膜的限制, 这为研制广谱抗病毒制剂开拓了全新的研究方向^[19]。当然, 该项研究仅证明其对实验小鼠没有明显副作用, 并未过多考虑可能引致的机体反应过度等潜在问题, 相信进一步研究将提供全面阐释。

2.3 细胞生长与信号途径

近期发现一些针对宿主细胞生长与信号途径而设计的抗病毒蛋白质或分子, 其具备广谱学意义, 值得关注的是, 由于选择性压力并不直接作用于病毒本身, 因此机体对这些蛋白质或分子的耐药性相对不易出现。基因组中有一类维持细胞基本生命活动所必须的基因, 其表达物——管家蛋白是一些病毒试图发现并加以利用的靶位, 病毒通过改变其表达水平与功能以利于自身入侵, 这个过程被形容为“劫持”模式。被劫持分子 TSG-101 可辅助性排除细胞内衰老的蛋白质, 病毒则利用 TSG-101 从细胞内部逆行迁移到外膜(在出芽阶段), FGI-104 分子可通过阻断这一被劫持过程以有效抑制多种血源性病毒(如肝炎与免疫缺陷病毒)以及生物威胁病毒(如埃博拉与牛痘病毒)的复制, 对呼吸道病毒(如流感病毒)与性传播病毒(如疱疹病毒)的相关研究正在进行中^[20]。相似地, FGI-106 也是可以防治病毒性出血热的小分子, 据报道, 即使机体感染埃博拉病毒 1 天后使用也有望治愈, 同时 FGI-106 对于乙型肝炎病毒与人类免疫缺陷病毒等也有一定的抑制作用, 其抗病毒机制目前尚不完全清楚^[21]。酪氨酸激酶受体 RTK 可自动磷酸化酪氨酸残基, 并激活细胞内诸如 ERK/MAPK 与 PI3K/Akt 等途径, 这些细胞信号传导途径不仅在细胞癌变中起到关键作用, 在病毒复制过程中的作用也同样重要。作为 RTK 的受体阻断剂, AG879 与 A9 分子可抑制病毒蛋白出核、RNA 合成以及病毒释放, 且对多种病毒均有效^[22]。此外, 包括水泡性口炎病毒在内的许多病毒均可激活 PI3K/Akt 内源信号途径, 通过诱导细胞增殖分化以避免细胞发生凋亡, 从而促其自身复制, 苏氨酸激酶抑制剂 Akt-IV 则可阻断 PI3K/Akt 通路, 使被感染细胞启动凋亡机制^[23], 另有报道表明 PI3K/Akt 途径抑制剂可能干扰病毒早期复制, 但作用机理尚不完全清楚。

2.4 抗氧化剂

需氧细胞在代谢过程中会产生一系列活性氧簇(reactive oxygen species, ROS), 低浓度 ROS 环境可以起到抗微生物及抗肿瘤效果, 当然过量产生 ROS 也会导致细胞损伤。抗氧化剂治疗方法在临床应用并不成功, 因为氧化反应并不是病毒入侵的主要反应, 此外, 抗氧化剂药物的生物学可利用性较低, 所针对的目标较少, 而且安全性越高的药物药效越低。近期发现抗氧化剂 NSC62914 可清

除 ROS, 并且激活抗氧化基因 Nrf2, 据报道, 以 2 mg/kg 体重剂量注射 NSC62914, 可有效对抗出血热类的病毒性传染病(如拉沙热与脑炎等), 使 80% 以上的感染动物多存活 5~6 天, 其作用机理尚待进一步研究^[24].

3 已商品化抗病毒制剂的新发展

3.1 重组蛋白

2003 年, 在严重急性呼吸综合征病毒大爆发时并没有高效的疫苗或者专一性抗病毒制剂, 高免疫血清与干扰素曾被用来治疗, 其中干扰素表现出良好的临床效果, 与皮质激素类药物共用可在更短时间内发挥功效(时间缩短 50%). 干扰素可影响病毒复制周期的各个阶段, 还可促进先天免疫反应并激活免疫细胞, 因此成为理想的广谱抗病毒候选药物, 但是普遍存在的耐药性等问题也不容忽视. 新型四氢呋唑 GSK983 既可阻止非病毒感染因素引起的细胞癌变, 也可以阻断多种不相关病毒的复制, 包括腺病毒 -5 与人类多乳头瘤病毒等, 据报道 GSK983 就是通过介导某个干扰素激活基因亚单位从而发挥抗病毒功效的^[25]. 近年来, 更多研究聚焦于干扰素介导的信号途径及其抗病毒效应机理, 如细胞固有的“2-5A/ Rnase L 核糖核酸酶”经典途径——病毒感染细胞之后产生的双链 dsRNA 会激活干扰素, 干扰素随之产生 2-5A 以激活 Rnase L, 从而终止病毒复制^[26]. 其实 2-5A 本身不能穿膜, 而且在体内会很快降解并引起细胞凋亡, 因此不具备成为抗病毒药物的潜质. 目前科学家们正尝试通过高通量筛选, 以期在性质稳定的候选者中发现具有相似性质的蛋白质或化合物. 此外, 鉴于干扰素作用起始阶段最易发生病毒耐药性突变, 如果某种蛋白质能跳过干扰素激活过程而直接促使 2-5A 激活 Rnase L, 即既可达到广谱抗病毒作用, 又不易产生耐药性, 相信这是一个有前景的研究思路.

某些 I 类囊膜病毒的核衣壳蛋白与囊膜表面糖蛋白最初以蛋白质前体形式存在, 其被蛋白酶裂解后才可形成有感染力的病毒粒子. 人免疫缺陷病毒天冬氨酸蛋白酶与冠状病毒主蛋白酶(3C 蛋白酶)是病毒剪切多聚蛋白过程中最重要的蛋白酶, 也是广谱抗病毒制剂研究的重要参考靶位. 蛋白酶抑制剂研究在经历十多年的发展后, 已获得令人鼓舞的结果, 目前科学家们还建议, 在经典的“鸡尾酒”疗法中要多考虑选用蛋白酶抑制剂以达到更好的抗艾滋病效果, 因为相对于逆转录酶抑制剂, 蛋白酶

抑制剂的耐药性较少见. 然而长期使用这些化学合成的蛋白酶抑制剂所产生的毒副作用和耐药性问题日益显现, 寻找新型制剂并扩大其抗病毒谱则成为新的挑战. 目前一些蛋白酶研究者仍在积极探索与研究, 如基于蛋白酶介导的细胞凋亡途径筛选蛋白酶结合蛋白, 以发现潜在的蛋白酶抑制子^[27], 希望不久的将来会有所突破.

3.2 化学合成物

流感至今仍为流行最广的传染病, 金刚烷胺和金刚烷乙胺是病毒 M2 离子通道阻断剂, 也是美国最初用于流感临床治疗的抗病毒制剂. 但是从 2003 年开始, 一系列的耐药毒株产生, 造成了金刚烷胺的普遍耐药性. 已商品化的吡嗪衍生物——法匹拉韦(T-705)对几乎所有的 RNA 病毒均有一定的抑制作用, 同时不影响细胞 DNA 或 RNA 的合成, 近期研究表明, T-705 对各种流感病毒耐药突变株亦有良好的治疗效果^[28], 遗憾的是, T-705 的抗病毒机制仍不完全清楚, 推测其直接靶向于病毒 RNA 依赖的 RNA 多聚酶, 或可能优先并入病毒的 RNA 以引起高突变. 另一种已商品化的核苷类似物——利巴韦林(ribavirin, 三氮唑核苷, 又名病毒唑), 可以治疗多种 RNA 和 DNA 病毒感染, 其可采用多种机制抑制同一种病毒, 如抑制 GTP 形成、抑制病毒 RNA 多聚酶以干扰病毒核酸复制、形成 GTP 类似物 RTP 以导致病毒蛋白翻译错误、调节 Th2 向 Th1 反应转变等^[29], T-705 与利巴韦林的抗病毒机制研究仍在继续. 临床应用方面, 一般常将利巴韦林与干扰素联合使用以治疗多种病毒性传染病(如丙型肝炎病毒、腮腺炎病毒以及轮状病毒), 其中聚乙二醇化干扰素与利巴韦林的联合治疗是全球公认的丙肝标准治疗方案, 而对于这种治疗无应答或复发病例, 则可考虑加入 2011 年被美国 FDA 批准后的肝炎病毒蛋白酶抑制剂波西普韦(boceprevir), 据报道这三者联用效果显著, 当然其安全性与有效性值得进一步关注.

3.3 生物提取物

有机体分泌的黏液可以阻滞比矩阵孔径还要小的病毒, 这就是“黏膜吸附”现象, 黏液中的某些成分还可通过多种途径水解与杀灭入侵的病原微生物, 如某些鱼类(如鲶鱼、章鱼)体表分泌大量黏液, 发挥重要的屏障功能. 覆盖于肠黏膜上皮细胞的黏液素聚合物——一种多孔的生物聚合物基质, 是先天免疫系统对抗病原体入侵的第一道关卡. 科学家们近期发现, 黏液提取物(如胃黏液中的黏蛋

白)可以对抗多种病毒感染^[30], 在此基础上有望研制成抗病毒漱口剂或伤口处理添加剂, 以保护机体腔外表面免受病毒侵染, 当然其作用机理尚待进一步明确. 近年来, 传统中草药在广谱抗病毒研究领域日益显示出重要性, 如板蓝根与黄芪对抗呼吸道感染、黄连与连翘对抗消化道与呼吸道病毒感染的效果都很显著, 且不易产生耐药性. 如今板

蓝根已开始按照现代药理学理论与方法进行临床试验, 一旦作用机理全部搞清楚, 将为板蓝根走出国门扫除最后一丝障碍, 这个新进展带给国人很多希望与期冀. 其实广谱抗病毒制剂的研究思路仍不限于此, 相信我国的原创性研究成果可为推进广谱抗病毒制剂的研制进程填上重要的一笔.

Table 1 Summary of broad-spectrum antiviral agents

表 1 广谱抗病毒抑制剂汇总

	中文名	英文名	机理 / 靶位	来源	应用对象	试验进展	参考文献
病毒层面	新型单抗	CR6261	作用于血凝素	高通量筛选	流感病毒 / I 类	体内试验	[6]
	邻苯二甲酸酐修饰卵清蛋白	HP-OVA	阻断糖蛋白结合受体	卵清蛋白修饰物	反转录病毒 / I 类	细胞试验	[8]
	碳水化合物结合物	CBAs	阻断病毒结合受体	植物凝集素提取物	登革热病毒 / II 类	细胞试验	[9]
	罗丹宁衍生物	LJ001	病毒囊膜结构	高通量筛选	流感病毒等 / 广谱 ¹⁾	细胞试验	[17]
	聚乙烯吡咯烷酮包被纳米银	PVP-coated nano-silver	抑制糖蛋白结合受体	纳米银修饰物	反转录病毒等 / I 类	细胞试验	[7]
	P20 蛋白	P20	六螺旋束形成	酵母双杂交	反转录病毒 / I 类	细胞试验	[10]
	新肽 N2	CAU	六螺旋束形成	突变重组	新城疫病毒 / I 类	体内试验	[11]
	RNA 多聚酶抑制剂	JMN-003	病毒 RNA 多聚酶	高通量筛选	正副黏病毒 / I 类	细胞试验	[14]
	二氢乳酸脱氢酶交联物	Compound A3	嘧啶生物合成	高通量筛选	流感病毒等 / 广谱 ¹⁾	细胞试验	[13]
	细胞表面唾液酸水解酶	DAS181(Fludase®)	水解细胞表面唾液酸	重组唾液酸酶	流感病毒等 / I 类	临床试验	[5]
细胞层面	络氨酸激酶受体阻断剂	AG879 & A9	络氨酸激酶受体	高通量筛选	流感病毒 / I 类	细胞试验	[22]
	双链 RNA 激活切冬酶寡聚体	DRACOs	诱导感染细胞凋亡	双链 RNA- 蛋白重组复合物	广谱 ¹⁾	细胞试验	[19]
	角鲨胺	Squalamine	宿主细胞膜表面电位	生物提取物	广谱 ¹⁾	体内试验	[18]
	FGI-104 分子	FGI-104	细胞信号途径	高通量筛选	血源病毒等 / I 类 II 类	体内试验	[20]
	FGI-106 分子	FGI-106	细胞信号途径	高通量筛选	出血热病毒 / I 类 II 类	体内试验	[21]
	小干扰 RNA	siRNA	RNA 多聚酶	生物合成	脑炎病毒 / II 类	细胞试验	[15]
	NSC62914	NSC62914	抗细胞氧化	化学合成	出血热病毒等 / II 类	体内试验	[24]
	苏氨酸激酶抑制剂	Akt-IV	PI3k/Akt 途径	化学合成	弹状病毒等 / I 类 III 类	细胞试验	[23]
	法匹拉韦	Favipiravir (T-705)	机理不明	吡嗪化学合成	出血热病毒等 / I 类 II 类	商品化	[28]
	阿比多尔	Arbidol	2, 5- 寡腺苷酸合成酶	吡啶衍生物	流感病毒等 / I 类	商品化	[12]
其他	利巴韦林	Ribavirin	次黄嘌呤单磷酸腺苷	化学酶促合成	广谱 ¹⁾	商品化	[29]

¹⁾ 对超过 10 种不同科类病毒均有效.

4 展 望

目前针对病毒感染, 尤其当病原体属于突发或未知时, 没有大量类似于抗生素一样广谱、高效、安全的药物治疗手段, 加之病毒生化武器日益成为全人类的巨大潜在威胁, 这些事实都强调新型广谱抗病毒制剂研制的必要性与紧迫性。疫苗是一种公认可行的治疗手段, 曾为人类健康做出积极贡献, 但是也面临一些棘手问题与缺憾, 比如窄谱——疫苗只针对特定血清型的病毒有效, 同时由于无法预测病毒的变异, 以至于只有在传染病发作之后才能开展疫苗的研制, 此外, 还有一些病毒性传染病(如艾滋病)的疫苗研制还属于空窗期。广谱抗病毒制剂的研制, 可以与疫苗的使用互为补充, 相得益彰。事实上广谱抗病毒制剂研究已获得令人瞩目的进展, 相信也终将为人类在与各类病毒性传染病的对抗中占据优势地位做出难以替代的贡献。当然, 以病毒靶为基础设计的抗病毒制剂易产生耐药性, 而基于细胞靶所设计抗病毒制剂的作用靶位很难确定, 需要进一步的改良设计与系统化考虑。

参 考 文 献

- [1] 王晓佳, 张卫红, 汪 明, 等. 囊膜病毒膜融合分子机制. 生物化学与生物物理进展, 2004, **31**(6): 482-491
Wang X J, Zhang W H, Wang M, *et al.* Prog Biochem Biophys, 2004, **31**(6): 482-491
- [2] 王晓佳, 汪 明. II类囊膜病毒膜融合分子机制. 生物化学与生物物理进展, 2007, **34**(7): 682-686
Wang X J, Wang M. Prog Biochem Biophys, 2007, **34**(7): 682-686
- [3] 王晓佳. 疱疹病毒膜融合分子机制. 生物化学与生物物理进展, 2010, **37** (6): 583-588
Wang X J. Prog Biochem Biophys, 2010, **37** (6): 583-588
- [4] Burke J D, Fish E N. Antiviral strategies: the present and beyond. Curr Mol Pharmacol, 2009, **2**(1): 32-39
- [5] Hedlund M, Aschenbrenner L M, Jensen K, *et al.* Sialidase-based anti-influenza virus therapy protects against secondary pneumococcal infection. J Infect Dis. 2010, **201**(7): 1007-1015
- [6] Friesen R H E, Koudstaal W, Koldijk M H, *et al.* New class of monoclonal antibodies against severe influenza: prophylactic and therapeutic efficacy in ferrets. PLoS One, 2010, **5**(2): e9106
- [7] Lara H H, Lxtepan-T L, Garza-T E N, *et al.* PVP-coated silver nanoparticles block the transmission of cell-free and cell-associated HIV-1 in human cervical culture. J Nanobiotech, 2010, **13**(8): 15
- [8] Li L, He L, Tan S Y, *et al.* 3-Hydroxyphthalic anhydride-modified chicken ovalbumin exhibits potent and broad anti-HIV-1 activity: a potential microbicide for preventing sexual transmission of HIV-1. Antimicro Agents and Chemo, 2010, **54**(5): 1700-1711
- [9] Alen M M F, Burghgraeve T D, Kaptein S J F, *et al.* Broad antiviral activity of carbohydrate-binding agents against the four serotypes of dengue virus in monocyte-derived dendritic Cells. PLoS One, 2011, **6**(6): e21658
- [10] Zhu Y, Lu L, Chen Y H, *et al.* Identification of a gp41 core-binding molecule with homologous sequence of human TNNI3K-like protein as a novel human immunodeficiency virus type 1 entry inhibitor. J Virol, 2010, **84**(18): 9359-9368
- [11] Wang X J, Li C G, Chi X J, *et al.* Characterization and evaluation of antiviral recombinant peptides based on the heptad repeat regions of NDV and IBV fusion glycoproteins. Virology, 2011, **416** (1-2): 65-74
- [12] Teissier E, Zandomenighi G, Loquet A, *et al.* Mechanism of inhibition of enveloped virus membrane fusion by the antiviral drug arbidol. PLoS One, 2011, **6**(1): e15874
- [13] Hoffman H, Kunz A, Simon V, *et al.* Broad-spectrum antiviral that interferes with de novo pyrimidine biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(14): 5777-5782
- [14] Krumm S A, Ndungu J M, Yoon J J, *et al.* Potent host-directed small-molecule inhibitors of myxovirus RNA-dependent RNA-polymerases. PLoS One. 2011, **6**(5): e20069
- [15] Wu Z Q, Xue Y, Wang B, *et al.* Broad-spectrum antiviral activity of RNA interference against four genotypes of Japanese encephalitis virus based on single microRNA polycistrons. PLoS One, 2011, **6**(10): e26304
- [16] ElSawy K M, Twarock R, Verma C S, *et al.* Peptide inhibitors of viral assembly: a novel route to broad-spectrum antivirals. J Chem Inf Model, 2012, **52**(3): 770-776
- [17] Wolf M C, Freiberg A N, Zhang T H, *et al.* A broad-spectrum antiviral targeting entry of enveloped viruses. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, **107**(7): 3157-3162
- [18] Zasloff M, Adams A P, Beckerman B, *et al.* Squalamine as a broad-spectrum systemic antiviral agent with therapeutic potential. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(38): 15978-15983
- [19] Rider T H, Zook C E, Boettcher T L, *et al.* Broad-spectrum antiviral therapeutics. PLoS One, 2011, **6**(7): e22572
- [20] Kinch M S, Yunus A S, Lear C, *et al.* FGI-104: A broad-spectrum small molecule inhibitor of viral infection. Am J Transl Res, 2009, **1**(1): 87-98
- [21] Aman M J, Kinch M S, Bavari S, *et al.* Development of a broad-spectrum antiviral with activity against Ebola virus. Antiviral Res, 2009, **83**(3): 245-251
- [22] Kumar N, Liang Y H, Liang Y Y, *et al.* Receptor tyrosine kinase inhibitors block multiple steps of influenza A virus replication. J Virol, 2011, **85**(6): e2818-2827
- [23] Dunn E F, Fearn R, Connor J H. Akt inhibitor Akt-IV blocks virus replication through an Akt-independent mechanism. J Virol, 2009, **83**(22): 11665-11672
- [24] Panchal R G, Reid St.P, Tran J P, *et al.* Identification of an antioxidant small-molecule with broad-spectrum antiviral activity. Antiviral Res, 2012, **93**(1): 23-29
- [25] Harvey R, Brown K, Zhang Q, *et al.* GSK983: a novel compound

- with broad-spectrum antiviral activity. *Antiviral Res*, 2009, **82**(1): 1–11
- [26] Thakur C S, Jha B K, Dong B, *et al.* Small-molecule activators of RNase L with broad-spectrum antiviral activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, **104**(23): 9585–9590
- [27] Kim P, Lovell S, Tiew K, *et al.* Broad-spectrum antiviral against 3C or 3C-like proteases of picornaviruses, noroviruses and coronaviruses. *J Virol*, 2012, **86**(21): 11754–11762
- [28] Mendenhall M, Russell A, Smee D F, *et al.* Effective oral Favipiravir (T-705) therapy initiated after the onset of clinical disease in a model of arenavirus hemorrhagic fever. *PLoS One*, 2011, **5**(10): e1342
- [29] Shah N R, Sunerland A, Grdzlishvili V Z. Cell type mediated resistance of vesicular stomatitis virus and sendai virus to ribavirin. *PLoS One*, 2010, **5**(6): e11265
- [30] Lieleg O, Lieleg C, Bloom J, *et al.* Mucin biopolymers as broad-spectrum antiviral agents. *Biomacromolecules*, 2012, **13**(6): 1724–1732

Advances in Development of Broad-spectrum Antiviral Agents*

WANG Cheng-Yu, WANG Xiao-Jia**

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract The development of broad-spectrum antiviral agents has recently become a major thrust area in the field of virology, and received enormous attention in the pharmaceutical industry worldwide. Much progress has been made to substantially extend the limitations of current antiviral therapy drugs, which are mostly pathogen-specific. Breakthroughs were made in establishing fundamental understanding of the underlying biochemical mechanisms. Part of the research results have been implemented for practical applications. The present review addresses the state-of-the-art knowledge, prospective applications, and challenges for the development of broad-spectrum antiviral agents. Detailed models of agent targets to virus entry and infection, and host cell defense are given. Finally, future research needs and opportunities are discussed.

Key words broad-spectrum, antiviral agent, virus entry, infection, cell defense

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00611

* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China(31101819) and The Program for New Century Excellent Talents in University(NCET-11-0486).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-62734377, E-mail: wangxj@cau.edu.cn

Received: December 16, 2012 Accepted: January 23, 2013