

DOI:10.16781/j.0258-879x.2021.07.0783

• 综述 •

基于黄热病毒编码蛋白的靶向药物研发研究进展

吴兵安¹, 彭珂², 冯麒帆², 戚中田¹, 钱汐晶^{1*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系生物医学防护教研室, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院, 上海 200433

[摘要] 黄热病毒(YFV)属于黄病毒科黄病毒属,是一类有包膜的单正链RNA病毒。尽管疫苗能有效预防YFV感染,但普及率较低,加之缺乏有效抗病毒药物,YFV仍周期性暴发。YFV基因组编码的病毒蛋白在其感染的各个阶段均发挥重要作用,因此研发靶向YFV蛋白的治疗药物是提高黄热病治疗效果、降低病死率的有效措施。本文简要介绍了YFV基因组编码的病毒蛋白的结构和功能,并综述了针对这些靶点研发抗YFV药物的进展和发展前景,为防治YFV感染提供参考。

[关键词] 黄热病毒;病毒蛋白;抗病毒药;靶向药物

[中图分类号] R 978.7

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2021)07-0783-05

Antiviral drugs targeting yellow fever virus-encoded proteins: research progress

WU Bing-an¹, PENG Ke², FENG Qi-fan², QI Zhong-tian¹, QIAN Xi-jing^{1*}

1. Department of Biomedical Defense, Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] Yellow fever virus (YFV) is a member of the *Flavivirus* genus within the *Flaviviridae* family. It is an enveloped single-stranded positive-sense RNA virus. Although the vaccine can effectively prevent YFV infection, the low coverage of vaccination and lack of effective antiviral drugs result in frequent outbreaks of YFV. YFV genome encoded proteins play important roles in basically all steps of viral infection. Therefore, the development of therapeutic drugs targeting YFV proteins is an effective measure to improve the therapeutic effect and reduce the mortality of this infectious disease. In this review, we briefly introduce the structure and function of the YFV genome encoded proteins, and summarize the research progresses and prospects of anti-YFV drugs targeting these proteins, so as to provide references for prevention and treatment of YFV infection.

[Key words] yellow fever virus; viral protein; antiviral drugs; targeted drugs

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2021, 42(7): 783-787]

黄热病毒(yellow fever virus, YFV)属于黄病毒科黄病毒属,是首个被报道的出血热病毒^[1],其所引起的黄热病目前主要在非洲和南美洲等热带地区流行^[2-3]。在自然界中,YFV宿主范围较窄,主要通过非人灵长类动物和食血蚊子之间的周期性传播循环存在,被携带病毒的蚊子叮咬是人类患病的主要途径^[4]。尽管YFV疫苗在20世纪30年代就已研制成功,但在发展中国家的接种率非常有限。

例如巴西约有2300万人处于YFV流行地区,但接种人口仅占23%左右^[5]。此外,免疫力低下人群(如艾滋病患者和正使用免疫抑制剂的患者)、孕妇、1岁以下婴儿和老人注射活疫苗可能产生严重的不良反应,甚至死亡^[1]。由于流行区热带雨林存在大量YFV自然宿主,彻底阻断黄热病传播极其困难,2016年安哥拉和巴西相继暴发了黄热病疫情^[6]。近年来随着全球化进程的加快,YFV感染范围不断

[收稿日期] 2020-07-09 **[接受日期]** 2020-12-18

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(31700147),国家科技重大专项重大传染病防治课题(2017ZX10304403-003)。Supported by National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (31700147) and National Major Science and Technology Project for Prevention and Control of Major Infectious Diseases of China (2017ZX10304403-003).

[作者简介] 吴兵安,硕士生。E-mail: 2928986405@qq.com

*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81870988, E-mail: qianxijing@smmu.edu.cn

扩大,已有近60个国家和地区报道过黄热病输入病例,我国也相继报告了来自安哥拉的11例输入性病例^[7]。据统计,全球每年YFV感染人数高达20万,死亡人数超过6万^[8],严重威胁人类的生命健康。

黄热病患者临床表现主要为高热、黄疸、出血、肝功能衰竭等^[9]。由于尚无有效的抗YFV药物,目前临床上仅能对患者采取对症和支持治疗^[10-11]。不同病毒蛋白在YFV感染过程各个阶段都发挥着重要作用,其不仅影响YFV的感染性、致病性,也是决定病毒传播力、毒力的关键物质。因此,病毒蛋白是研发抗YFV药物的重要靶点。YFV是一类有包膜的单正链RNA病毒,其基因组编码3种结构蛋白和7种非结构蛋白(non-structural protein, NS),前者包括包膜(envelope, E)蛋白、前膜(precursor-membrane, prM)蛋白、衣壳(capsid, C)蛋白,后者由NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B和NS5组成^[12-13]。结构蛋白包裹病毒核酸、组装病毒颗粒,NS参与病毒复制并在免疫逃逸等过程中发挥作用^[14],它们均可作为抗病毒药物的靶向分子。本文将重点介绍YFV感染过程中发挥关键作用的病毒蛋白,并在明确它们的分子结构及功能特点的基础上,总结靶向病毒蛋白分子治疗药物的研究进展。

1 YFV的结构蛋白与靶向药物

YFV E蛋白介导病毒颗粒与细胞表面受体的相互作用,帮助病毒入侵靶细胞,其功能区域包含氨基端与羧基端结构域。氨基端由3个胞外域(ectodomain, ED)构成,其中ED1连接ED2和ED3,是E蛋白在病毒复制过程中构象得以改变的关键结构;ED2在病毒与靶细胞膜吸附、融合过程中发挥重要作用^[15];ED3参与病毒与受体的结合,并包含病毒特异性的中和表位^[16]。E蛋白羧基端包含2个跨膜结构域,将E蛋白锚定在病毒膜上,并在prM蛋白的作用下于病毒表面进行重排^[17]。

目前靶向YFV结构蛋白的药物主要是针对E蛋白表位制备的单克隆抗体及靶向E蛋白结构功能区的小分子药物,两者均可在病毒感染早期阶段阻断整个复制周期。研究表明,靶向E蛋白的单克隆抗体5A具有较强的中和活性和保护作用,5A可与E蛋白二聚体结合,占据YFV颗粒表面,阻断病毒吸附到靶细胞上;5A亦可通过干扰E蛋白重排来

影响其融合环的功能,从而抑制YFV的膜融合^[18]。5A的双重抑制效果使其具有较强的抗YFV作用,YFV-17D感染的BALB/c小鼠在给予腹腔注射5A治疗后,观察期内均无体重下降,且全部存活;而给予腹腔注射PBS的小鼠在接种病毒后的7d内全部死亡^[18]。单克隆抗体5A高效、特异的抗病毒作用,使其具有成为临床一线抗YFV治疗药物的良好前景。单克隆抗体2A10G6通过特异性结合E蛋白融合环上的⁹⁸DRXW¹⁰¹基序发挥抗病毒作用,空斑中和实验表明3.6 μg/mL的2A10G6就可使YFV滴度降低50%^[19]。然而,单克隆抗体制备成本昂贵、生产周期冗长复杂,极大阻碍了其在YFV感染地区尤其是低收入发展中国家的广泛运用。此外,有研究表明一些噻唑衍生物也可与E蛋白结合从而抑制病毒进入细胞^[20]。

YFV prM蛋白可与E蛋白形成异二聚体prME,介导病毒颗粒向胞外出芽^[21]。YFV C蛋白则主要参与病毒基因组的包装和感染性颗粒的形成^[22]。目前尚无靶向prM和C蛋白的药物分子。

2 YFV的NS与靶向药物

2.1 NS1与靶向药物 NS1是一类非常保守的糖蛋白,在YFV基因组复制过程中起着至关重要的作用。YFV感染细胞后可产生大量分泌型NS1,参与机体先天性和适应性免疫反应,促进YFV的免疫逃逸与致病^[23]。研究显示,利用针对YFV NS1的干扰RNA(RNA interference, RNAi)沉默NS1的表达,可帮助成年BALB/c小鼠抵抗YFV的感染;组织病理学分析结果提示,在感染YFV 10d后NS1 RNAi对小鼠的中枢神经系统仍具有显著的保护作用^[24]。

2.2 NS2A、NS2B、NS3与靶向药物 YFV NS2A是分子量约为22 000的小疏水蛋白,其氨基端的结构簇有助于感染性病毒颗粒的产生^[25]。目前尚无针对NS2A的治疗药物。NS3氨基端区域带有经典的催化三联体(Ser-His-Asp)结构,是典型的丝氨酸蛋白酶,它与NS2B组成的复合体参与YFV复制。由于蛋白酶是调控病毒复制过程的关键因素,NS3也成为抗病毒药物的重要靶点^[26]。

研究发现,伊维菌素可竞争性与NS3蛋白酶结合,抑制YFV的复制,对YFV感染的抑制作用尤其明显,3.1~6.3 nmol/L的伊维菌素可使YFV

感染的 Vero 细胞病变减少 50% 以上, 伊维菌素抑制 YFV 复制的半数有效浓度 (median effective concentration, EC_{50}) 也低于 0.5 nmol/L, 疗效显著^[27]。伊维菌素作为常用的口服抗蠕虫药, 安全性较高。研究结果显示, YFV 感染 Vero 细胞后 14 h 内使用伊维菌素的抑制效果最为明显, 而当细胞内 YFV RNA 合成开始后伊维菌素将逐渐失去其抗病毒能力。因此, 伊维菌素仅在黄病毒复制周期的特定阶段, 即病毒解旋酶具有功能活性的时期使用才有效^[27]。

2.3 NS4A、NS4B 与靶向药物 YFV NS4A 和 NS4B 都是膜相关蛋白^[28], 两者在病毒 RNA 复制过程中起重要的调节作用。此外, NS4B 还参与 YFV 的免疫逃逸, 通过抑制干扰素 (interferon, IFN) 诱导的信号转导因子和转录激活因子 (signal transducer and activator of transcription, STAT) 1 的磷酸化阻断 IFN- α/β 信号通路, 干扰细胞抗病毒状态的建立^[29]。研究发现, 新型苯二氮草类药物 BDAA 可与 YFV 的 NS4B 相互作用, 抑制 YFV 的复制。BDAA 处理的 YFV 感染细胞病毒产生量减少 2 个数量级以上, 病毒诱导的细胞病变也减少 50%。口服 BDAA 可使 YFV 感染仓鼠的死亡率下降 90%, 病毒负荷降低 2 个数量级以上, 并减轻病毒感染引起的肝损伤。BDAA 的安全性较高, 在小鼠模型上其最大安全有效剂量可达 100 mg/kg, 且用最大剂量治疗时, 未引起神经系统症状。因此, BDAA 及其衍生物可作为抗 YFV 的又一新的选择。但是, BDAA 的抗病毒作用具有明显的结构依赖性, BDAA 主要与 NS4B 第 5 个跨膜结构域的内质网腔侧第 219 位的脯氨酸 (P219) 反应, 若 P219 发生突变则 BDAA 失去抗 YFV 作用^[30]。

2.4 NS5 与靶向药物 YFV NS5 是病毒复制最为关键的 RNA 聚合酶, 包含 2 个关键结构域: 氨基端甲基转移酶结构域 (methyltransferase domain, Mtase) 和羧基端 RNA 依赖的 RNA 聚合酶结构域 (RNA dependent RNA polymerase domain, RdRp)^[31]。其中, Mtase 可催化病毒加帽过程中的鸟苷酰转移反应和甲基化反应, RdRp 在病毒 RNA 基因组复制过程中发挥主导作用。YFV NS5 氨基端区域的赖氨酸泛素化后, 可与 IFN 通路下游的人类 STAT2 结合, 抑制细胞内 I 型 IFN 信号通路, 逃避固有免

疫杀伤作用, 促进病毒的复制与扩散^[32]。因此, 靶向 NS5 的药物分子具有抑制 YFV 的复制并增强 I 型 IFN 介导的抗病毒作用。

目前研究较多的 NS5 靶向药物是索非布韦, 它是广谱的 RNA 聚合酶抑制剂, 2013 年获得美国 FDA 批准, 临床上主要用于治疗丙型肝炎患者。索非布韦通过保守的氨基酸残基与 YFV NS5 蛋白上 RdRp 结合而影响其功能, 抑制 YFV 的复制。体外实验结果显示, 索非布韦可阻止 YFV 野生株和疫苗株在人肝癌细胞 Huh-7 和 HepG2 中的复制, 并且这种抑制作用呈剂量依赖性。用索非布韦治疗 YFV 感染的 Swiss 小鼠和 A129 小鼠, 可降低小鼠的死亡率和血清中丙氨酸转氨酶水平^[33]。临床实践显示 2 例 YFV 感染患者在使用索非布韦治疗后病毒血症减轻^[34]。索非布韦的临床抗病毒疗效还需进一步评估, 此外, 因价格昂贵, 该药在发展中国家中普及性较差。

法匹拉韦是一种新型抗流感病毒药物, 它通过与 RdRp 结合抑制病毒复制, 也具有抗 YFV 作用, 但需要更高的浓度。在 YFV 感染的 Vero 细胞中加入 330 $\mu\text{mol/L}$ 法匹拉韦可使病毒感染率下降 90%^[35]。在 YFV 感染前后每天口服法匹拉韦 400 mg/kg, 可提高 YFV 感染仓鼠的生存率、降低血清中丙氨酸转氨酶水平; 未感染仓鼠每天口服 400 mg/kg 法匹拉韦未出现任何毒性反应, 表明法匹拉韦抗 YFV 作用有效且安全性好^[35]。

3 小结

YFV 的结构蛋白和非结构蛋白在病毒的入侵、复制、组装、释放及免疫逃逸等过程中发挥重要的作用, 针对其蛋白结构或功能研发具有靶向作用的抗 YFV 药物是控制黄热病病程发展和传播的重要手段。现有的靶向药物大多在体内外实验中表现出良好的抗 YFV 效果, 若要运用于临床治疗 YFV 患者仍需进一步的临床试验加以评估。近年来, 黄热病有流行和蔓延的趋势, 一旦疫情暴发将严重威胁人类生命健康。为了应对挑战, WHO 于 2017 年启动了消除黄热病战略 (Eliminate Yellow Fever Epidemics, EYE)。随着疫苗覆盖率的增高及有效药物的研发和使用, 黄热病的感染率和死亡率有望逐年降低, 进而在世界范围内消除黄热病。

[参 考 文 献]

- [1] GUARNER J, HALE G L. Four human diseases with significant public health impact caused by mosquito-borne flaviviruses: West Nile, Zika, dengue and yellow fever[J]. *Semin Diagn Pathol*, 2019, 36: 170-176.
- [2] BECK A, GUZMAN H, LI L, ELLIS B, TESH R B, BARRETT A D. Phylogeographic reconstruction of African yellow fever virus isolates indicates recent simultaneous dispersal into east and west Africa[J/OL]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2013, 7: e1910. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001910.
- [3] MONATH T P, VASCONCELOS P F C. Yellow fever[J]. *J Clin Virol*, 2015, 64: 160-173.
- [4] MONATH T P. Yellow fever: an update[J]. *Lancet Infect Dis*, 2001, 1: 11-20.
- [5] DOUAM F, PLOSS A. Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe[J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26: 913-928.
- [6] KLEINERT R D V, MONTOYA-DIAZ E, KHERA T, WELSCH K, TEGTMEYER B, HOEHL S, et al. Yellow fever: integrating current knowledge with technological innovations to identify strategies for controlling a re-emerging virus[J/OL]. *Viruses*, 2019, 11: 960. DOI: 10.3390/v11100960.
- [7] WANG Y L, WANG X, LIU X B, REN R Q, ZHOU L, LI C, et al. Epidemiology of imported infectious diseases, China, 2005-2016[J]. *Emerg Infect Dis*, 2018, 25: 33-41.
- [8] FARIA N R, KRAEMER M U G, HILL S C, GOES DE JESUS J, AGUIAR R S, IANI F C M, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential[J]. *Science*, 2018, 361: 894-899.
- [9] HOLANDA G M, CASSEB S M M, MELLO K F L, VASCONCELOS P F C, CRUZ A C R. Yellow fever virus modulates the expression of key proteins related to the microRNA pathway in the human hepatocarcinoma cell line HepG2[J]. *Viral Immunol*, 2017, 30: 336-341.
- [10] GARDNER C L, RYMAN K D. Yellow fever: a reemerging threat[J]. *Clin Lab Med*, 2010, 30: 237-260.
- [11] HEINZ F X, STIASNY K. Flaviviruses and flavivirus vaccines[J]. *Vaccine*, 2012, 30: 4301-4306.
- [12] FERNANDES-MONTEIRO A G, TRINDADE G F, YAMAMURA A M, MOREIRA O C, DE PAULA V S, DUARTE A C, et al. New approaches for the standardization and validation of a real-time qPCR assay using *TaqMan* probes for quantification of yellow fever virus on clinical samples with high quality parameters[J]. *Hum Vaccin Immunother*, 2015, 11: 1865-1871.
- [13] PATKAR C G, LARSEN M, OWSTON M, SMITH J L, KUHN R J. Identification of inhibitors of yellow fever virus replication using a replicon-based high-throughput assay[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 4103-4114.
- [14] LINDENBACH B D, THIEL H J, RICE C M. Flaviviridae: the virus and their replication[M]// KNIPE D M, HOWLEY P M. *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 1101-1152.
- [15] DAVIS E H, BARRETT A D T. Structure-function of the yellow fever virus envelope protein: analysis of antibody epitopes[J]. *Viral Immunol*, 2020, 33: 12-21.
- [16] VOLK D E, MAY F J, GANDHAM S H, ANDERSON A, VON LINDERN J J, BEASLEY D W, et al. Structure of yellow fever virus envelope protein domain III [J]. *Virology*, 2009, 394: 12-18.
- [17] OP DE BEECK A, MOLENKAMP R, CARON M, BEN YOUNES A, BREDENBEEK P, DUBUISSON J. Role of the transmembrane domains of prM and E proteins in the formation of yellow fever virus envelope[J]. *J Virol*, 2003, 77: 813-820.
- [18] LU X S, XIAO H X, LI S H, PANG X F, SONG J, LIU S, et al. Double lock of a human neutralizing and protective monoclonal antibody targeting the yellow fever virus envelope[J/OL]. *Cell Rep*, 2019, 26: 438-446.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.065.
- [19] DENG Y Q, DAI J X, JI G H, JIANG T, WANG H J, YANG H O, et al. A broadly flavivirus cross-neutralizing monoclonal antibody that recognizes a novel epitope within the fusion loop of E protein[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6: e16059. DOI: 10.1371/journal.pone.0016059.
- [20] MAYHOUB A S, KHALIQ M, KUHN R J, CUSHMAN M. Design, synthesis, and biological evaluation of thiazoles targeting flavivirus envelope proteins[J]. *J Med Chem*, 2011, 54: 1704-1714.
- [21] CICZORA Y, CALLENS N, SÉRON K, ROUILLÉ Y, DUBUISSON J. Identification of a dominant endoplasmic reticulum-retention signal in yellow fever virus pre-membrane protein[J]. *J Gen Virol*, 2010, 91(Pt 2): 404-414.
- [22] PATKAR C G, JONES C T, CHANG Y H, WARRIER R, KUHN R J. Functional requirements of the yellow fever virus capsid protein[J]. *J Virol*, 2007, 81: 6471-6481.
- [23] WANG H Y, HAN M, QI J X, HILGENFELD R, LUO T R, SHI Y, et al. Crystal structure of the C-terminal fragment of NS1 protein from yellow fever virus[J]. *Sci China Life Sci*, 2017, 60: 1403-1406.
- [24] PACCA C C, SEVERINO A A, MONDINI A, RAHAL P, D'AVILA S G, CORDEIRO J A, et al. RNA interference inhibits yellow fever virus replication *in vitro* and *in vivo*[J]. *Virus Genes*, 2009, 38: 224-231.
- [25] VOBMANN S, WIESELER J, KERBER R,

- KÜMMERER B M. A basic cluster in the N terminus of yellow fever virus NS2A contributes to infectious particle production[J]. *J Virol*, 2015, 89: 4951-4965.
- [26] NOSKE G D, GAWRILJUK V O, FERNANDES R S, FURTADO N D, BONALDO M C, OLIVA G, et al. Structural characterization and polymorphism analysis of the NS2B-NS3 protease from the 2017 Brazilian circulating strain of yellow fever virus[J/OL]. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2020, 1864: 129521. DOI: 10.1016/j.bbagen.2020.129521.
- [27] MASTRANGELO E, PEZZULLO M, DE BURGHGRAEVE T, KAPTEIN S, PASTORINO B, DALLMEIER K, et al. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67: 1884-1894.
- [28] ZHANG W J, LI X M, LIN Y, TIAN D H. Identification of three H-2K^d restricted CTL epitopes of NS4A and NS4B protein from yellow fever 17D vaccine[J]. *J Virol Methods*, 2013, 187: 304-313.
- [29] VIDOTTO A, MORAIS A T, RIBEIRO M R, PACCA C C, TERZIAN A C, GIL L H, et al. Systems biology reveals NS4B-cyclophilin A interaction: a new target to inhibit YFV replication[J]. *J Proteome Res*, 2017, 16: 1542-1555.
- [30] GUO F, WU S, JULANDER J, MA J L, ZHANG X X, KULP J, et al. A novel benzodiazepine compound inhibits yellow fever virus infection by specifically targeting NS4B protein[J]. *J Virol*, 2016, 90: 10774-10788.
- [31] DUBANKOVA A, BOURA E. Structure of the yellow fever NS5 protein reveals conserved drug targets shared among flaviviruses[J/OL]. *Antiviral Res*, 2019, 169: 104536. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104536.
- [32] LAURENT-ROLLE M, MORRISON J. The role of NS5 protein in determination of host cell range for yellow fever virus[J]. *DNA Cell Biol*, 2019, 38: 1414-1417.
- [33] DE FREITAS C S, HIGA L M, SACRAMENTO C Q, FERREIRA A C, REIS P A, DELVECCHIO R, et al. Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both *in vitro* and *in vivo*[J/OL]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2019, 13: e0007072. DOI: 10.1371/journal.pntd.0007072.
- [34] MENDES É A, PILGER D R B, SANTOS NASTRI A C S, MALTA F M, PASCOALINO B D S, CARNEIRO D'ALBUQUERQUE L A, et al. Sofosbuvir inhibits yellow fever virus *in vitro* and in patients with acute liver failure[J]. *Ann Hepatol*, 2019, 18: 816-824.
- [35] JULANDER J G, SHAFER K, SMEE D F, MORREY J D, FURUTA Y. Activity of T-705 in a hamster model of yellow fever virus infection in comparison with that of a chemically related compound, T-1106[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009, 53: 202-209.

[本文编辑] 尹 茶