

综述

埃博拉病毒的防治进展

武文姣, 刘叔文

南方医科大学药学院, 广东 广州 510515

摘要 2014年2月,埃博拉病毒在西非爆发,短短几个月内蔓延至多国,引起世界卫生组织的高度关注。目前还没有有效的针对埃博拉病毒感染的防治疫苗及药物。本文综述了埃博拉病毒的流行情况,生物学特性,可能的药物靶点以及研究中的疫苗和药物,期望对埃博拉病毒的防治研究进展有一个较全面的认识。

关键词:埃博拉病毒;致病机制;疫苗;药物

Research progress of prevention and treatment of Ebola virus infection

WU Wenjiao, LIU Shuwen

School of Pharmaceutical Sciences, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Starting from February 2014, the Ebola virus outbreak had spread across West African countries within a few months and caused great concerns of the World Health Organization. Currently no effective vaccines or drugs have been available for prevention and treatment of Ebola virus infection. This paper gives a brief review of the epidemics and pandemics, the biological characteristics of Ebola virus, the potential antiviral drug targets, and research progress of vaccine and drug development against the virus.

Keywords: Ebola virus; pathogenesis; vaccine; drugs

埃博拉病毒感染导致的病毒性出血热具有极高的致死率^[1]。人感染埃博拉病毒后,主要临床表现为急性发热、肌肉酸痛、头痛、呕吐,有出血趋势和皮肤丘疹、胃肠道呼吸道和器官瘀血出血^[2-4]。虽然是一种致命病毒,但埃博拉病毒较为罕见,仅在西非地区流行爆发,因而并未像研发艾滋病药物和疫苗一样存在迫切压力。另外,埃博拉疫情的暴发时间不规律,没有特定的季节性,无法预知和防范。抗病毒药物或疫苗的研发需要投入巨大的人力、物力、资金和时间,因此,针对埃博拉病毒药物的研发速度较慢,目前尚未研制出有效的抗埃博拉病毒的药物和疫苗。

1 埃博拉病毒的流行概况

埃博拉病毒可分为5种亚型:扎伊尔型(zaire ebolavirus, ZEBOV);科特迪瓦型(cotedivoire ebolavirus, CEBOV,也称塔伊森林埃博拉病毒,taï forest ebolavirus, TAFV);苏丹型(sudan ebolavirus, SUDV/SEBOV);雷斯顿型(reston Ebolavirus, REBOV)和本迪布焦型(bundibugyo ebolavirus, BEBOV)。五种亚型毒力各不相同,其中,扎伊尔型毒力最强,人感染

后致死率高达90%;苏丹型次之,致死率约为50%;科瓦迪特型对人的毒力较弱,而雷斯顿型埃博拉病毒对人无致病性,对人以外的灵长类动物有致死性,仅在菲律宾和美国有过猴子感染的报道^[5]。

埃博拉病毒最早于1976年在非洲中部的扎伊尔和苏丹几乎同时爆发^[6]。尽管分离的病原体都属埃博拉病毒,但不完全相同,根据首发地点不同分别命名为苏丹型和扎伊尔型^[7],其中扎伊尔行病毒共感染318人,284人死亡,致死率高达89%。1979年7~10月,苏丹型埃博拉病毒再次出现^[8],随后沉寂于非洲丛林,直至1994年6月,1名瑞士女兽医在科特迪瓦因解剖死亡的黑猩猩而感染了埃博拉病毒,在之后的3年里,埃博拉病毒再次肆虐非洲^[9-11]。2000~2004年,在刚果、加蓬、乌干达等地多次爆发埃博拉病毒疫情,主要为扎伊尔型和苏丹型埃博拉病毒^[12]。在埃博拉病毒发现的30多年里,共爆发24次埃博拉病毒疫情,综合死亡率约为67%^[6]。2014年3月24日,世界卫生组织发表声明,一场新的埃博拉病毒疫情在几内亚爆发,截至2014年8月28日,共报告埃博拉病毒病3069例,死亡1552人,死亡率达52%。病毒疫情的爆发不断加速,40%的感染病例是在过去的21 d报告的^[13]。

2 埃博拉病毒生物学特性

埃博拉病毒主要通过病毒携带者的血液、体液

收稿日期:2014-05-29

基金项目:国家自然科学基金-广东联合基金重点项目(U1301224)

Supported by National Natural Science Foundation of China (U1301224).

作者简介:武文姣,硕士研究生,E-mail: wj910103@126.com

通信作者:刘叔文,教授,博士生导师,E-mail: liusw@smu.edu.cn

及污染物接触传播^[14],尚无证据表明空气可以传播该病毒。通过对黑猩猩和猴子等灵长类动物以及蝙蝠体内病毒的研究,大致上可判断果蝠为其自然条件下的储存库,但需要进一步的研究与验证。病毒的结构特征及致病机制见文献^[15]。

3 埃博拉病毒的防治进展

3.1 埃博拉病毒疫苗

传统的疫苗来源于经高温、福尔马林及 γ -射线灭活的病毒,这类灭活病毒的埃博拉病毒疫苗在啮齿类动物和灵长类动物中没有明显保护作用。目前,大量的病毒或非病毒载体被用于埃博拉病毒疫苗的构建,如DNA质粒、具有复制或缺乏复制功能的活病毒载体等。带有埃博拉病毒抗原基因的疫苗在接种者体内表达大量的病毒抗原蛋白,刺激机体产生特异性抗体,从而预防病毒感染^[16]。

3.1.1 DNA疫苗 将经过筛选的埃博拉病毒基因如GP、NP等连接到DNA质粒载体中,构成表达病毒蛋白的质粒,用注射器、基因枪或电穿孔等方式将重组DNA质粒经肌肉注射输入患者体内,输入重组DNA在患者细胞中表达相应抗原,从而诱导机体的免疫反应,产生抗体和细胞毒性T细胞去清除病毒的感染^[16]。这种DNA疫苗制作工艺简单,经济且易于存储,同时不会诱发针对载体的免疫反应,但在体实验表明,埃博拉病毒感染后的灵长类动物注射此类疫苗后再接种埃博拉病毒,存活率没有明显提高。

3.1.2 活载体疫苗 活载体疫苗为将编码病毒蛋白的基因插入无致病性或减毒活病毒载体中构成的疫苗。此类疫苗主要有重组水泡性口炎病毒疫苗,重组副流感病毒疫苗和重组腺病毒^[17]。其中重组5型血清型腺病毒(rAD5)为首个对感染埃博拉病毒的非灵长类动物有保护作用的疫苗^[18]。用活病毒为载体表达EBOV GP蛋白的优点是疫苗接种人体,接近于自然感染,EBOV蛋白可在转染的细胞中表达,但人体血清中含有的rAD5抗体可能影响活载体疫苗的体内效价。

3.1.3 DNA配合腺病毒(DNA/Adv)增强疫苗 此类疫苗是继DNA疫苗和活病毒载体疫苗后研发的又一新型疫苗,如重组5型血清型腺病毒(rAD5)与DNA疫苗(SUDV GP, TAFV GP)重组疫苗。首先向动物体内接种DNA疫苗使机体产生免疫反应,随后用腺病毒载体疫苗加强免疫,结果发现小鼠抗体效价较单用DNA疫苗增长10~100倍。在恒河猴中进行进一步试验,结果显示,接种疫苗的猴子体内针对GP蛋白的特异性抗体及抗原特异性CD4⁺和CD8T⁺细胞水平明显升高,接种疫苗的4只猴子在感染埃博拉病毒2周内均存活,而接种安慰剂的4只猴子死亡^[19]。此疫苗目前已进入临床试验阶段。

3.2 抗病毒药物的研究

3.2.1 抑制病毒进入的活性化合物 病毒的细胞进入阶段是病毒复制周期中的重要时期,在病毒感染的早期抑制病毒的进入可以减少病毒感染的几率,同时也可降低药物耐药性的发生。因此,病毒的进入阶段成为筛选抗病毒药物的重要靶点。目前,病毒进入抑制剂的研究主要有:(1)靶向病毒包膜蛋白的进入抑制剂。病毒的包膜蛋白GP与病毒进入细胞密切相关。采用表达埃博拉病毒包膜蛋白构建的重组EBOV-GP假病毒体系,可高通量筛选抗病毒化合物库,发现新的小分子埃博拉病毒进入抑制剂。苯二氮杂卓类衍生物(化合物1,图1)对表达GP蛋白的HIV重组假病毒的感染具有抑制作用^[20]。计算机辅助分子模拟技术表明,化合物1通过与GP1及GP2蛋白连接处的疏水域结合,从而阻止了病毒的进入^[20]。Miller等^[21]发现,将来源于埃博拉病毒GP2蛋白的C-多肽与HIV的反式转录激活因子Tat(细胞渗透促进剂)共价结合得到的产物Tat-Ebo,较未经Tat修饰的C-多肽具有更好的抑制病毒进入的活性,这可能与通过Tat的作用穿过细胞膜在胞内体中形成较高的药物浓度有关;(2)靶向宿主细胞蛋白的进入抑制剂。与病毒相互作用的宿主细胞膜蛋白也成为进入抑制剂药物的重要靶点。NPC1蛋白(Niemann-Pick C1)是位于多种胞内体和溶酶体膜表面的胆固醇转移蛋白,被认为是埃博拉病毒的特异性受体。人类尼曼-匹克病就是因为NPC1蛋白基因发生突变引起的严重神经退行性疾病。研究发现,尼曼-匹克病人来源的神经母细胞可以抵抗埃博拉病毒的感染^[22]。胆固醇合成抑制剂U1866A,抗抑郁药丙咪嗪同样可以抑制埃博拉病毒的感染。经高通量筛选得到的苄基哌嗪金刚烷胺乙酰胺类化合物(化合物2、3,图1)通过与位于胞内体表面的胆固醇转移蛋白NPC1作用,抑制病毒的进入^[22]。雌激素受体调节剂克罗米芬、托瑞米芬、他莫昔芬等也可抑制埃博拉病毒进入细胞,其作用机制可能与NPC1蛋白相关^[23]。

组织蛋白酶抑制剂E64和CA074都有抑制埃博拉病毒感染的作用,尽管此类化合物对其他病毒也有抑制作用^[24-25]。囊泡膜蛋白相关蛋白A(VAPA)和氧甾酮结合蛋白相互作用能调节细胞内胆固醇的体内平衡,是许多病毒感染细胞所需要的,Amini-Bavil-Olyae等^[26]人发现,干扰素诱导的跨膜蛋白-3(IFITM3)可以与VAPA结合,阻止VAPA与氧甾酮结合蛋白相互作用,从而阻止病毒进入。胺碘酮、肾上腺素受体激动剂决奈达隆,以及L-型钙离子通道抑制剂维拉帕米,均可以抑制埃博拉病毒进入细胞,其作用机制有待进一步研究^[27]。

3.2.2 抑制病毒复制的活性化合物 Geisbert等^[28]用与病毒基因组序列互补的反式寡核苷酸(siRNA)干扰病毒基因组复制与转录的方法,合成并筛选得到了分别靶向埃博拉病毒基因RNA多聚酶L、VP24及VP35基因

的 siRNA, 即 EK-1, VP-24-1160 及 VP-35-855, 并将这三中 siRNAs 装配到稳定的核酸脂质体 (SNALPs) 中, 称为 TKM-Ebola。体内实验证明, TKM-Ebola 可以抑制灵长类动物感染埃博拉病毒, 但在人体中的药效学及药动学特点与毒性还需进一步研究。第三代合成的反式寡核苷酸—磷酸吗啉寡聚体 PMOs (AVI-6002, AVI-6003) 可以抑制丝状病毒的复制, 这类化合物通过空间位阻效应干扰病毒 mRNA 的转录和翻译, 从而影响病毒的复制。体内实验表明, 感染了埃博拉病毒的恒河猴在给予特异性靶向 EBOV 核蛋白 VP24 和 VP35 的 AVI-6002 后, 存活率明显提高, 且药物抑制了病毒感染引起的炎症因子的大量释放, 目前此类药物已进入 I 期临床阶段^[29]。通过高通量筛选得到的抑制埃博拉病毒复制的化合物还有 FGI-103^[30], FGI-104 和 FGI-106^[31-32] (图 1), 这些化合物的作用机制有待进一步研究。

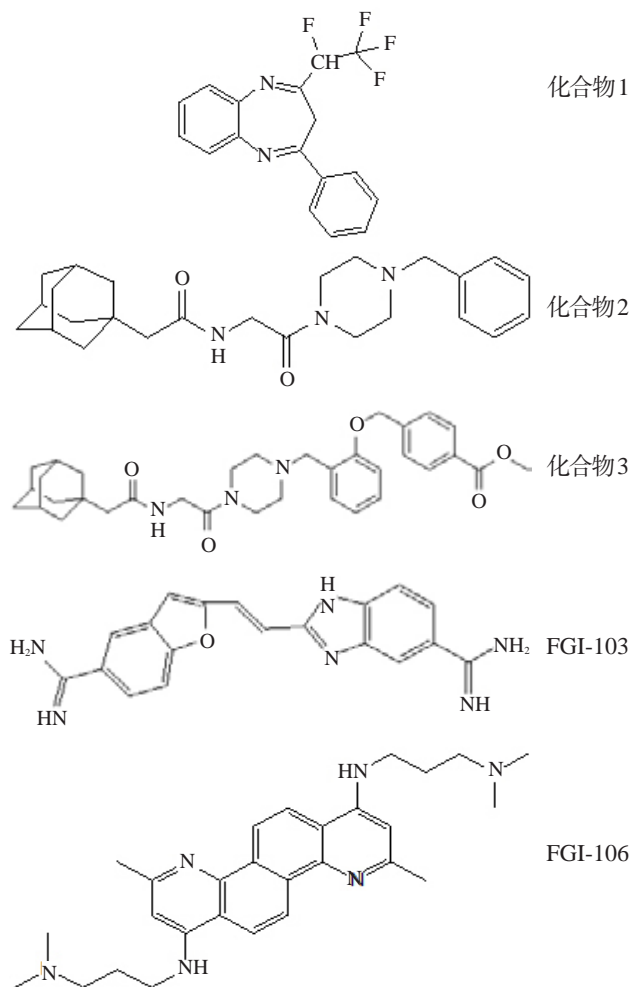


图 1 抗埃博拉病毒活性化合物结构图

Fig.1 Chemical structure of compound 1,2,3 FGI103 and FGI106.

3.3 单克隆抗体治疗

Pettitt 等^[33]研究发现, 将修饰后的抗体基因导入中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) 或者本氏烟草细胞中得到的 3

种单克隆抗体 13C6, h-13F6 和 6D8 混合物 MB-003, 对于埃博拉病毒感染的灵长类动物有保护作用。实验者对感染 1~2 d 的灵长类动物给予 MB-003 单克隆抗体鸡尾酒疗法, 其治病率和死亡率明显降低^[34]。目前, 这种抗体鸡尾酒疗法为埃博拉病毒的治疗带来了希望, 可能成为目前对抗埃博拉病毒最为有效的方法。单克隆抗体的植物生产也取得突破, Huang 等^[35]建立了一种多复制子单载体的表达系统, 可在烟草中大量表达靶向埃博拉病毒 GP 蛋白的单抗 6D8, 1 g 新鲜烟叶叶片 4 d 表达量达到 0.5 mg 单抗。

4 结论与展望

迄今为止没有 FDA 许可的疫苗和药物来预防和治疗埃博拉病毒, 发现新的抗病毒药物和疫苗对埃博拉病毒的疫情控制至关重要。目前已开发出多种可以保护灵长类动物针对埃博拉病毒的致死性感染的疫苗, 部分疫苗已进入临床试验阶段。由于埃博拉病毒抗原表位的多样性及疫情爆发的不可预测性, 开发可以预防多种埃博拉病毒亚型的多价疫苗可能能够更好防止疫情的发生。相比于疫苗生产周期长、价格高、活性不稳定及病毒抗原的多样性等缺点, 小分子药物有其生产迅速、性质稳定等独特优势。由于埃博拉病毒的高致病性和致死率, 其研究只能在生物安全级别最高的实验室 BSL-4 级实验室中进行, 具备这种安全防护措施的实验室在全球范围内数量有限, 从而限制了抗病毒小分子药物的开发与研究。随着高通量筛选体系的迅速发展, 利用 VSV、MLV 及 HIV 等病毒的复制机制, 构建的包裹埃博拉病毒包膜蛋白 GP 的有复制缺陷的假病毒筛药模型, 使抗病毒小分子化合物的快速筛选得以在生物安全 2 级实验室中进行, 这大大促进了抗病毒小分子药物研究的发展。同时, 利用 RNA 干扰技术发现的具有抗病毒作用的 siRNAs 为抗病毒药物研发开辟了新的道路。随着基因工程技术的发展, 单克隆抗体药物为病毒的防治带来了新的希望, 和传统的从血清来源的抗体相比较, 利用基因工程和细胞工程技术获得的 CHO 细胞、烟草细胞培养来源的抗体更为经济, 迅速, 便于质量控制和实现大规模生产。2014 年 8 月 21 日, 据英国路透社报道, 美国两位医生在感染了埃博拉病毒后, 采用了位于圣地亚哥的马普 (Mapp) 生物技术公司研发的实验性药物 ZMapp 后完全康复, 引起了全世界的关注。ZMapp 即是从转基因烟草叶中提取出来的三种埃博拉病毒单克隆抗体的混合物, 这种未经 FDA 批准的 ZMapp 为对抗埃博拉病毒带来了希望, 同时也引起了各界的争论, ZMapp 能否成为埃博拉病毒的第一支“解药”, 还需要进一步研究。埃博拉病毒已蔓延到几内亚、尼日利亚、利比里亚及塞拉利昂四个国家, 并有走出非洲蔓延全世界的可能性。面临病毒极高的致死率与有

效治疗药物和疫苗的缺乏的严峻形势,埃博拉病毒的防治迫在眉睫。

参考文献:

- [1] Wong G, Kobinger GP, Qiu X. Characterization of host immune responses in Ebola virus infections[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2014, 10(6): 781-90.
- [2] Geisbert TW, Hensley LE, Larsen T, et al. Pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever in cynomolgus macaques: evidence that dendritic cells are early and sustained targets of infection[J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6): 2347-70.
- [3] Hoenen T, Groseth A, Falzarano D, et al. Ebola virus: unravelling pathogenesis to combat a deadly disease[J]. *Trends Mol Med*, 2006, 12(5): 206-15.
- [4] Geisbert TW, Hensley LE. Ebola virus: new insights into disease aetiopathology and possible therapeutic interventions [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2004, 6(20): 1-24.
- [5] Feldmann H, Klenk HD, Sanchez A. Molecular biology and evolution of filoviruses[J]. *Arch Virol Suppl*, 1993, 7: 81-100.
- [6] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, et al. The natural history of Ebola virus in Africa[J]. *Microbes Infect*, 2005, 7(7/8): 1005-14.
- [7] Anon. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976 [J]. *Bull World Health Organ*, 1978, 56(2): 271-93.
- [8] Brès P. The epidemic of Ebola haemorrhagic fever in Sudan and Zaire, 1976: introductory note[J]. *Bull World Health Organ*, 1978, 56(2): 245.
- [9] Le Guenno B, Formenty P, Formenty P, et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus[J]. *Lancet*, 1995, 345 (8960): 1271-4.
- [10] Le Guenno B, Formenty P, Boesch C. Ebola virus outbreaks in the Ivory Coast and Liberia, 1994-1995 [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1999, 235: 77-84.
- [11] Georges AJ, Leroy EM, Renaut AA, et al. Ebola hemorrhagic fever outbreaks in Gabon, 1994-1997: epidemiologic and health control issues [J]. *J Infect Dis*, 1999, 179(Suppl1): S65-75
- [12] Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of Central African wildlife[J]. *Science*, 2004, 303(5656): 387-90.
- [13] [Http://www.who.int/csr/don/2014_08_28_ebola/en/](http://www.who.int/csr/don/2014_08_28_ebola/en/).
- [14] Bray M, Murphy FA. Filovirus research: knowledge expands to meet a growing threat[J]. *J Infect Dis*, 2007, 196(Suppl2): S438-43.
- [15] 盛子洋, 范东瀛, 安静. 埃博拉病毒, 何去何从[J]. *微生物学免疫学进展*. 2014, 5.
- [16] Marzi A, Feldmann H. Ebola virus vaccines: an overview of current approaches[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2014, 13(4): 521-31.
- [17] Richardson JS, Dekker JD, Croyle MA, et al. Recent advances in Ebolavirus vaccine development [J]. *Hum Vaccin*, 2010, 6(6): 439-49.
- [18] Sullivan NJ, Sanchez A, Rollin PE, et al. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates[J]. *Nature*, 2000, 408(6812): 605-9.
- [19] Richardson JS, Yao MK, Tran KN, et al. Enhanced protection against Ebola virus mediated by an improved adenovirus-based vaccine[J]. *PLoS One*, 2009, 4(4): e5308.
- [20] Basu A, Li B, Mills DM, et al. Identification of a small-molecule entry inhibitor for filoviruses[J]. *J Virol*, 2011, 85(7): 3106-19.
- [21] Miller EH, Harrison JS, Radoshitzky SR, et al. Inhibition of Ebola virus entry by a C-peptide targeted to endosomes[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(18): 15854-61.
- [22] Côté M, Misasi J, Ren T, et al. Small molecule inhibitors reveal Niemann-Pick C1 is essential for Ebola virus infection[J]. *Nature*, 2011, 477(7364): 344-8.
- [23] Johansen LM, Brannan JM, Delos SE, et al. FDA-approved selective estrogen receptor modulators inhibit Ebola virus infection [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5(190): 190ra79.
- [24] Barrientos LG, Rollin PE. Release of cellular proteases into the acidic extracellular milieu exacerbates Ebola virus-induced cell damage[J]. *Virology*, 2007, 358(1): 1-9.
- [25] Schornberg K, Matsuyama S, Kabsch K, et al. Role of endosomal cathepsins in entry mediated by the Ebola virus glycoprotein[J]. *J Virol*, 2006, 80(8): 4174-8.
- [26] Amini-Bavil-Olyae S, Choi YJ, Lee JH, et al. The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 13(4): 452-64.
- [27] Gehring G, Rohrmann K, Atenchong N, et al. The clinically approved drugs amiodarone, dronedarone and verapamil inhibit filovirus cell entry [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69(8): 2123-31.
- [28] Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study[J]. *Lancet*, 2010, 375 (9729): 1896-905.
- [29] Warren TK, Warfield KL, Wells J, et al. Advanced antisense therapies for postexposure protection against lethal filovirus infections[J]. *Nat Med*, 2010, 16(9): 991-4.
- [30] Warren TK, Warfield KL, Wells J, et al. Antiviral activity of a small-molecule inhibitor of filovirus infection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(5): 2152-9.
- [31] Fau-Yunus MA, Fau-Lear AC, Fau-Mao CH, et al. FGI-104: a broad-spectrum small molecule inhibitor of viral infection[J]. *Am J Transl Res*, 2009, 1(1): 87-98.
- [32] Aman MJ, Kinch MS, Warfield K, et al. Development of a broad-spectrum antiviral with activity against Ebola virus [J]. *Antiviral Res*, 2009, 83(3): 245-51.
- [33] Pettitt J, Zeitlin L, Kim do H, et al. Therapeutic intervention of Ebola virus infection in rhesus macaques with the MB-003 monoclonal antibody cocktail [J]. *Sci Transl Med*, 2013, 5 (199): 199ra113.
- [34] Olinger GG, Pettitt J, Kim D, et al. Delayed treatment of Ebola virus infection with plant-derived monoclonal antibodies provides protection in rhesus macaques[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(44): 18030-5.
- [35] Huang Z, Phoolcharoen W, Lai H, et al. High-level rapid production of full-size monoclonal antibodies in plants by a single-vector DNA replicon system[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2010, 106(1): 9-17.

(编辑:陈望忠)