

基于 HIV 融合抑制剂的艾滋病潜伏感染恒河猴模型

一、艾滋病概述

艾滋病(Acquired Immunodeficiency Syndrome, AIDS), 是由人免疫缺陷病毒(Human Immunodeficiency Virus, HIV)引起, 以全身免疫系统严重损害为特征的传染性疾病, 是 20 世纪危害人类健康和生命最严重的病毒性疾病之一。自美国 CDC 报道首例艾滋病后, 到 20 世纪 80 年代中期艾滋病发展成为一个全球性的流行病。截止 2014 年底, HIV 已感染 3690 万人, 2014 年新增感染者 200 万, 2014 年因艾滋病死亡 120 万人。艾滋病在 1985 年传入我国, 截至 2015 年 5 月 31 日, 全国历年累计报告艾滋病 530628 例, 其中艾滋病病人 217457 例, 死亡 167159 例。艾滋病早已成为全球关注的公共卫生和社会热点问题, 艾滋病的预防与治疗也成为当代生物医学研究的前沿热点之一。

二、艾滋病动物模型简介

HIV 融合抑制剂在病毒侵入宿主细胞前拦截病毒。T-20 是目前唯一临床应用的病毒膜融合抑制剂, 用于 HIV-1 感染的联合治疗。T-20 的临床治疗作用虽然已被证明, 但该药的抗病毒活性相对较低, 半衰期短, 需要每天注射两次(180 mg); 更为重要的是, T-20 在体内外均容易诱导 HIV 耐药毒株的产生, 极大地限制了它的临床应用。我们的前期结果表明, T-20 在猴子体内的抗病毒效果欠佳。利用 SHIV 急性感染和慢性感染模型, 我们发现 LP-19、LP-50 或 LP-51 通过低剂量和短期的单药治疗, 均可以降低病毒载量至检测线水平。更为重要的是, 单次低剂量的 LP-80 治疗(3 mg/kg)可将病毒载量快速下降至检测线, 且每周两次的单药治疗可长期抑制病毒(6 个月)。基于此, 我们拟建立基于 HIV 融合抑制剂的艾滋病潜伏感染动物模型。

基于 HIV 融合抑制剂的艾滋病潜伏感染动物模型的成功建立, 可以深入研究该类药物在动物体内潜伏病毒的变化情况, 有助于了解病毒储存库的形成、组织分布及定量情况, 为潜伏库清除策略的研究奠定基础。该模型与基于 HAART 治疗的潜伏模型相比, 具有单药治疗的优势, 能更好地用于功能性治愈相关治疗策略的效果评价。

三、基于 HIV 融合抑制剂的艾滋病潜伏感染恒河猴模型制作方法

1、实验材料: SHIV_{SF162P3} 病毒; 选用体重 4-6 kg 的 SPF 恒河猴。实验前体检无异常, 必须排除猴免疫缺陷病毒(SIV)、猴逆转录 D 型病毒(SRV-1, 2, 5)和猴 T 淋巴细胞性 I 型病毒(STLV-1)的感染。猴免疫缺陷病毒(SIV)易感性密切相关的 4 种基因(Mamu-A*01、Mamu-A*02、Mamu-B*08、Mamu-B*17)筛查结果为阴性。所有感染动物必须在 ABSL-3 室中进行。

2、静脉途径 SHIV 恒河猴感染模型制作方法:

先用宠物用电推剪推去猴上肢采血部位的猴毛，左手抓住一侧后肢肘关节部位，使后肢皮下静脉怒张。用 75%酒精酒精棉球消毒。右手拿吸取病毒液的注射器，针头沿静脉平行方向向向心端刺入血管，见回血后，左手放松，不再紧压，右手缓慢将病毒液推入。完毕后用干棉球压迫止血，将注射器拔出，弃在利器专用桶内。

- 3、给药方法：将建立稳定的 SHIV_{SF162P3} 慢性感染的恒河猴，经肌肉注射 3mg/kg 的 HIV 融合抑制剂，每周给药一次，连续给药 6 个月。
- 4、样本收集和检测：定期收集外周血样本，提取病毒 RNA 和病毒 DNA，测定血浆病毒载量和总病毒 DNA。

四、基于 HIV 融合抑制剂的艾滋病潜伏感染恒河猴模型指标检测

1、血浆病毒载量变化情况：

我们检测了 LP-19、LP-50/LP-51 和 LP-80 等 HIV 融合抑制剂在恒河猴感染模型的治疗情况。如图 1 所示，基于 M-T 钩子设计的短肽 LP-19 抑制剂可以将猴子体内 SHIV 病毒载量降到不可检测水平，而停药后在 10 天左右出现病毒反弹^[1]。

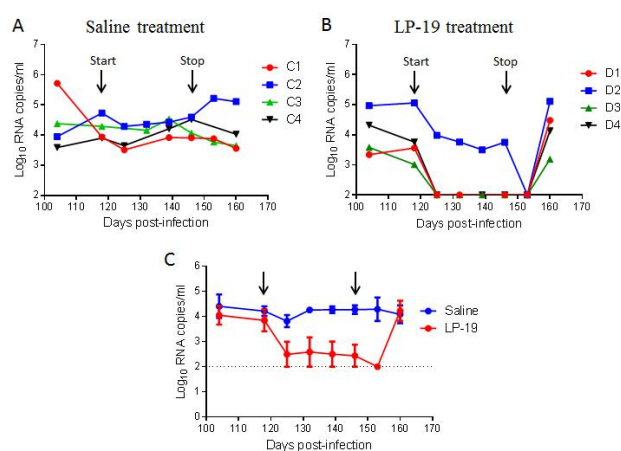


图 1 LP-19 在恒河猴 SHIV 感染模型的治疗效果

与 LP-19 相比，LP-50 和 LP-51 抑制剂的抗病毒活性得到极大的提高，达到极低的皮克摩尔 (pM) 水平。在恒河猴 SHIV 慢性感染模型，LP-51 低剂量治疗可以迅速将病毒载量降到检测线以下，停药后两周左右出现病毒反弹^[2]。值得关注的是，J0 猴子经过反复的三次治疗仍然有效 (图 2)。

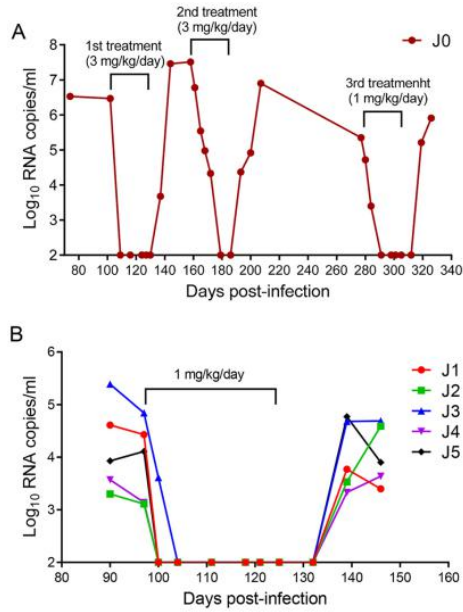


图 2 LP-51 在恒河猴 SHIV 感染模型的治疗效果

我们通过对 LP-51 进行结构优化获得 LP-80，其在细胞水平上的抑制活性高于 T-20 和广谱中和抗体 VRC01 大于 5300 倍，在猴体内的活性高于 T-20 超过 10000 倍。在大鼠和恒河猴的药代动力学研究表明，LP-80 在体内可以达到极高的药效浓度，且半衰期较长，适于每周 1-2 次给药治疗。如图 3 所示，LP-80 对 SHIV 慢性感染猴子反复两次的治疗都表现出很好的治疗效果^[3]。第一次治疗时，猴子采取每天给药联合每 4 天给药的方式，发现一周两次治疗可以很好地控制猴子的血浆病毒载量至检测线以下。待停药后病毒反弹稳定，我们继续给予一周两次、持续 6 个月的第二次治疗。

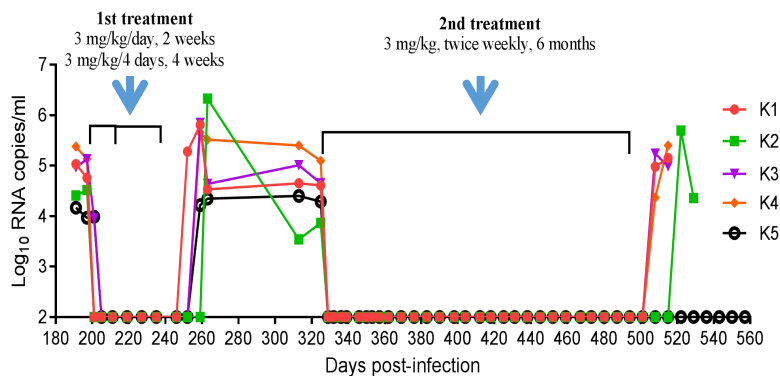


图 3 LP-80 在恒河猴 SHIV 感染模型的病毒 RNA 结果

2、病毒 DNA 变化情况：

LP-80 不仅控制了血浆病毒 RNA 至检测线以下，而且有效地降低了病毒 DNA

的拷贝数，图 4 显示了 LP-80 治疗下病毒 DNA 的变化情况。

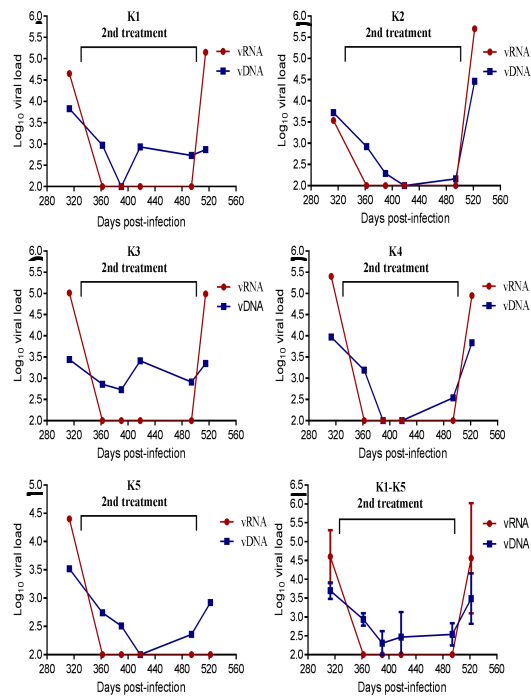


图 4 LP-80 在恒河猴 SHIV 感染模型的病毒 DNA 结果

3、血生化检测

动物模型建立的整个实验过程中，全部实验猴分别在第一次治疗和第二次治疗前后检测血生化，未见明显差异。而且，在动物安乐后，各组织脏器未见明显

异常。

Item (Unit)	1st treatment		2nd treatment	
	Before (DPI 191)	After (DPI 263)	Before (DPI 325)	After (DPI 508)
ALT (U/L)	16.40±3.91	15.8±3.27	12.80±3.27	13.20±2.86
AST (U/L)	32.40±3.29	30.80±3.27	27.20±3.11	31.40±4.45
TP (g/L)	74.00±4.53	71.26±1.76	70.76±3.48	71.15±2.86
ALB (g/L)	45.49±6.56	41.78±1.31	50.99±2.61	44.88±4.31
GLOB (g/L)	25.04±4.96	29.77±0.85	22.23±1.91	24.01±2.93
TBIL (umol/L)	6.11±1.57	5.52±0.82	5.92±0.90	5.52±0.90
ALP (U/L)	4.60±1.52	4.20±1.30	5.60±1.14	7.40±2.07
GGT (U/L)	7.40±1.82	9.20±3.83	9.00±1.58	10.40±1.95
GLU (mmol/L)	4.32±0.32	5.02±0.98	3.69±0.62	3.74±0.85
UN (mmol/L)	8.14±2.00	8.38±0.74	9.34±1.26	7.99±0.92
CREA (umol/L)	47.83±6.76	61.09±13.50	42.03±5.95	44.09±5.50
UA (umol/L)	3.08±0.61	3.25±0.54	2.54±0.28	2.54±0.73
Ca (mmol/L)	2.36±0.11	2.40±0.06	2.17±0.12	2.19±0.03
P (mmol/L)	1.22±0.25	0.98±0.07	1.74±0.19	1.29±0.24
CHO (mmol/L)	4.42±0.19	3.90±0.53	3.87±0.44	4.02±0.51
TG (mmol/L)	0.58±0.14	0.51±0.07	0.67±0.13	0.62±0.21
HDL-C (mmol/L)	2.46±0.07	1.96±0.26	2.46±0.31	2.66±0.45
LDL-C (mmol/L)	1.73±0.44	1.56±0.37	1.59±0.20	1.32±0.32
CK (U/L)	46.40±9.81	56.60±10.01	54.60±10.74	55.40±14.19
LDH (U/L)	290.00±62.25	443.40±85.91	247.40±35.30	262.80±48.26
IgG (g/L)	7.12±0.72	8.60±1.74	8.58±1.46	8.52±1.32
IgA (g/L)	0.93±0.33	1.05±0.12	0.76±0.31	0.86±0.18
IgM (g/L)	1.28±0.60	1.12±0.56	1.41±0.29	1.49±0.29
A/G	2.03±0.48	1.50±0.20	2.31±0.23	2.00±0.40
NA (mmol/L)	139.60±1.95	139.60±1.52	138.80±0.84	140.20±1.92
K (mmol/L)	4.62±0.13	4.56±0.18	4.70±0.20	4.64±0.26
CL (mmol/L)	108.80±1.64	109.40±1.52	109.20±0.84	109.80±1.92

五、模型发表文章

1. 熊竞, 丛喆, 王卫, 陈霆, 吴芳新, 刘克剑, 苏爱华, 鞠斌, 魏强. SHIVSF162P3 病毒感染急性期复制水平与慢性期 CD4+T 细胞亚群分布及频度相关性分析. 中国病毒病杂志, 2012,2 (5): 354-359. Experimental infection of SHIVSF162p3 in rhesus macaques: correlation analysis of the viral RNA levels in the acute phase and the distribution of CD4+T cell subsets in the chronic phase. Chin J Viral Dis, 2012,2 (5): 354-359.
2. Xue J, Cong Z, Xiong J, Wang W, Jiang H, Chen T, Wu F, Liu K, Su A, Ju B, Chen Z, Couto MA, Wei Q, Qin C. Repressive effect of primary virus replication on superinfection correlated with gut-derived central memory CD4(+) T cells in SHIV-infected Chinese rhesus macaques. PLoS One. 2013 Sep 2;8(9):e72295.