

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2018.09.019

· 综述 ·

## 克里米亚-刚果出血热病毒新型治疗性抗体研制展望

# Development of novel therapeutic antibody for the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus

刘欢(LIU Huan),张怀东(ZHANG Huai-dong),陈晓晖(CHEN Xiao-hui),龚睿(GONG Rui)

(中国科学院武汉病毒研究所,湖北 武汉 430071)

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)

[关键词] 克里米亚-刚果出血热病毒;新疆出血热病毒;抗体;展望

[中图分类号] R373 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9638(2018)09-0838-05

随着人们认识的增加,烈性传染性病毒不断被发现和鉴定,高致病性、高传播性的病毒往往由于变异,导致反复流行。如在非洲和阿拉伯半岛多次暴发 1931 年首次分离到的裂谷热病毒(Rift Valley fever virus, RVFV)<sup>[1]</sup>; 1937 年发现于非洲,并于 1999 年传入美国且在多个州暴发的西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)<sup>[2-3]</sup>; 1944、1956、1965 年分别发现于俄国克里米亚、非洲刚果和我国新疆巴楚地区的克里米亚-刚果出血热病毒(Crimean-Congo haemorrhagic fever virus, CCHFV), 1967 年分离出该病毒,被我国称为新疆出血热病毒(Xinjiang haemorrhagic fever virus, XHFV)<sup>[4]</sup>。1967 年在德国首次发现马尔堡病毒(Marburgvirus, MARV)<sup>[5]</sup>; 1976 年发现,随后在非洲反复暴发流行的埃博拉病毒(Ebolavirus, EBOV)<sup>[6]</sup>; 1998—1999 年在马来西亚暴发, 2001—2009 年连续在印度和孟加拉国流行的尼帕病毒(Nipahvirus, NiV)<sup>[7-8]</sup>; 2002 年底出现, 2003 年在我国暴发流行的 SARS 冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)<sup>[9]</sup>; 2012 年出现于沙特阿拉伯,具有高致死率的中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)<sup>[10]</sup>; 2013 年在我国多地出现的 H7N9 型流感病毒<sup>[11]</sup>。自 2009 年以来,中国加强了急性发热性疾病的监测与

管理,发现了一种不明原因的严重发热伴血小板减少综合征(SFTS),该病由一种新型病毒引起,命名为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒,简称新布尼亚病毒(severe fever with thrombocytopenia syndrome virus, SFTSV)<sup>[12]</sup>。目前,上述病毒感染几乎没有特效药物和疫苗,因此,针对其研制特效药物,对于提高其防治水平、保障我国国民健康,具有非常重要的意义。

### 1 克里米亚-刚果出血热病毒

克里米亚-刚果出血热最初源于 20 世纪 40 年代中亚克里米亚半岛,病原体为 CCHFV。克里米亚-刚果出血热是一种流行于俄国北部、中东、南部欧亚大陆和非洲撒哈拉地区的烈性传染性疾病,主要见于无树的大平原、半沙漠地带及丘陵地区,病死率为 20%~70%<sup>[13]</sup>,该病分布具有明显的地域性<sup>[14-18]</sup>。1965 年在我国新疆南部巴楚地区首次发现此种疾病,CCHFV 在我国又被称为 XHFV。新疆出血热是目前我国发现的四种虫媒病毒性传染病之一<sup>[18]</sup>。在青海、云南、四川、内蒙、安徽、海南、伊犁、东北等地均有抗体阳性案例的报道,并证实在新疆塔里木盆地、准噶尔盆地、塔里木河,云南腾冲、寻甸、西双版纳和孟连、伊犁河谷边境地区、青海等存

[收稿日期] 2017-07-21

[基金项目] 中国科学院国际合作局对外合作重点项目(153B42KY5B20170004)

[作者简介] 刘欢(1982-),男(汉族),湖北省襄阳市人,副研究员,主要从事微生物学和医学免疫研究。

[通信作者] 龚睿 E-mail: gongr@wh.iov.cn

在 XHFV 自然疫源地<sup>[19]</sup>。近年来,新疆出血热在我国再度暴发,疫区不断扩大,危害日益严重。CCHFV 属于布尼亚病毒科(Bunyaviridae)的内罗病毒属(Nairovirus)<sup>[20]</sup>。根据第七届国际病毒学分类委员会报告,内罗病毒属包括 34 种由硬蜱科(Ixodidae)或者隐喙蜱科(Argasidae)传播的病毒,分为七个血清型<sup>[21]</sup>,其中最重要的是克里米亚-刚果出血热血清型和内罗毕羊病(Nairobi sheep disease)血清型。内罗毕羊病毒主要感染绵羊和山羊,也可以引起人轻度发热和血小板减少<sup>[22]</sup>。

1968 年 Murphy 等<sup>[23-24]</sup>第一次描述了 CCHFV 在乳鼠脑中具有与其他布尼亚病毒科病毒相似形态。在病毒基本结构、形态发生、复制循环以及理化性质等方面,CCHFV 可作为布尼亚病毒科的典型代表<sup>[20, 25-28]</sup>。CCHFV 基因组由大(L)、中(M)、小(S)三股负链 RNA 片段组成,分别编码 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、糖蛋白(glycoprotein, GP)及核蛋白(nucleoprotein, NP)<sup>[29]</sup>。三个基因组分别包含一个开放读码框,两侧为非编码区。每个基因组末端 11 个碱基是保守的,并且除第 9 位核苷酸外均互补,在随后的 20 个左右碱基显示片段特异性互补,形成螺旋丝状或锅柄状结构<sup>[30]</sup>。

CCHFV mRNA 编码的糖蛋白前体,经翻译后加工成为成熟的 G1 和 G2<sup>[31-33]</sup>。成熟的 G1 和 G2 嵌入脂质层,形成刺突状结构<sup>[34]</sup>。蛋白 G1 和 G2 也分别称为 Gc 和 Gn,在介导病毒与受体结合,进入宿主细胞中起关键作用,病毒感染后产生的中和性抗体也主要靶向该区域<sup>[35]</sup>。成熟的糖蛋白能识别易感宿主细胞上的受体并能诱导中和抗体的产生<sup>[36]</sup>。Gn 只在病毒成熟的末期产生,目前研究<sup>[37]</sup>认为,Gn 主要起分子伴侣作用,帮助 Gc 正确折叠,而 Gc 介导了与受体的结合,其潜在受体可能是核仁素(nucleolin)。

CCHFV 由蜱虫叮咬传播,重症患者的血液与排泄物也具有传染性。该病毒具有传播迅速、致死率高、暂无有效治疗药物<sup>[35, 38-39]</sup>等特点,开发针对 CCHFV 的特效药物,对于提高我国对该病毒的防治水平,保障国民健康具有十分重要的意义。

## 2 治疗性抗体

生物治疗中的蛋白质类大分子药物通常包括生长因子、受体、酶、血液因子、抗凝血剂、重组疫苗、融

合蛋白和单克隆抗体等,而单克隆抗体则越来越受到人们的关注<sup>[40]</sup>。美国食品药品监督管理局(FDA)已经批准三十多种单克隆抗体用于治疗各种疾病,如癌症、免疫系统疾病等<sup>[41]</sup>。2001 年以来,治疗性抗体的市场以每年 35% 的速度增长,是生物类药物中增长最快的<sup>[19]</sup>。近年来,一些大的制药公司也在收购其他抗体公司方面展开激烈竞争,如 AstraZeneca 公司于 2007 年花 156 亿美元巨资买下 MedImmune 公司,而后的主打产品之一是一种预防呼吸道合胞病毒感染的单克隆抗体 Palivizumab(商品名 Synagis)<sup>[42]</sup>,由此可见治疗性抗体的重要性。

治疗性抗体的显著优势是其天然存在于人体内,相对安全,同时具有功能强大和靶向性高的特点,为治疗目前难以攻克的疾病带来新的希望。如最近鉴定一系列针对人免疫缺陷病毒 I 型(human immunodeficiency virus type 1, HIV-1)的具有广谱中和活性的抗体(如 VRC01<sup>[43-44]</sup>),有的已进入一、二期临床试验(如 PRO140<sup>[45-46]</sup>和 TNX-355<sup>[47-48]</sup>),显示出治疗性抗体在防治 HIV-1 上具有很好的应用前景<sup>[49-50]</sup>。

然而,随着研究的不断深入,人们发现全长抗体的分子量较大(~150 kD),组织(如实体瘤)渗透性较差,也难以结合一些空间上有位阻效应的关键表位(如病毒囊膜蛋白上的中和性位点),从而影响活性。解决的策略之一是将全长抗体进行小型化<sup>[51]</sup>,由此开发了一系列具有结合功能的抗体片段,如 Fab(50~60 kD)、单链抗体(scFv, 20~30 kD)、重链可变区抗体(VH, 12~15 kD)(单域抗体)等小型化抗体。上述抗体片段相对于全长单抗,具有更好的组织渗透性和结合存在位阻效应的抗原表位的能力,有些甚至能够口服用药。目前,基于人重链可变区 VH 的单域抗体已经被用于研发针对病毒的候选抗体类药物<sup>[48, 51]</sup>。已有开发以抗体 Fc 片段的 CH2 结构域为骨架的单域抗体,称之为纳米抗体。该纳米抗体的分子量与 VH 形式的单域抗体相似,但是具有相对较长的血浆半衰期<sup>[52]</sup>。

已有研究<sup>[53]</sup>表明,病毒感染后产生的抗体对 CCHFV 具有中和作用,并且主要靶向病毒的囊膜蛋白。因此,通过抗体工程技术筛选出针对该病毒囊膜蛋白具有中和活性的单域抗体 dAb 或者 nAb,有望开发成一类新的抗 CCHFV 的候选抗体药物。

## 3 中和活性评价系统

疱疹口炎病毒(vesicular stomatitis virus,

VSV)是典型的带有包膜蛋白的动物病毒,由于其庞大的宿主范围,并能在很多哺乳动物细胞和昆虫细胞中稳定地复制,被广泛地应用于研究中。VSV 组装使用时是删除了糖蛋白 G 基因的重组 VSV。重组 rVSV - ΔG 与异源病毒包膜蛋白一起生成 VSV 假病毒颗粒<sup>[54]</sup>。已有研究构建了以 VSV 为基础的假病毒体系 VSV-CCHFV<sup>[55]</sup>。首先在 293FT 细胞内分别表达 CCHFV 糖蛋白前体 G 和 β-半乳糖苷酶(作为对照),然后用带有萤火虫荧光素酶报告基因的委内瑞拉马脑炎病毒糖蛋白(VSV-VEEVGP, Venezuelan equine encephalitis virus glycoprotein)假病毒侵染细胞。委内瑞拉马脑炎病毒糖蛋白 VEEVGP 在细胞内很快降解,VSV 核心复制、组装的子代病毒将带有 CCHFV 糖蛋白,形成 VSV-CCHFV 假病毒。侵染 48 h 后收集病毒,加入到 SW13 单层细胞中,通过测萤火虫荧光素酶酶活性评估病毒的滴度。在缺少高等级生物安全实验室的情况下,CCHFV 模型的建立使得体外稳定、高效地获得感染性病毒颗粒并用于中和抗体的检测与评价成为可能。

#### 4 囊膜蛋白分类与抗原设计

目前,依据病毒囊膜蛋白融合前后的结构模式,将病毒囊膜蛋白分为三类:ClassI、ClassII 和 ClassIII。ClassI 型囊膜蛋白分类的依据主要是其均能形成一个含有 α-螺旋的卷曲螺旋结构中心的发夹三聚体;ClassII 型囊膜蛋白分类的依据主要是其均能形成含有 β-折叠结构的发夹三聚体<sup>[56-64]</sup>。ClassIII 型囊膜蛋白也能通过两部分结构的组合,形成发夹三聚体(与 ClassI 型囊膜蛋白类似),融合后的三聚体也含有 α-螺旋三聚体核心;然而每个融合区域暴露出两个位于延长的 β-折叠顶端的融合环,显著的表现出与 ClassII 型囊膜蛋白结构上的类似之处<sup>[65-67]</sup>。已有预测研究<sup>[64,68]</sup>表明,CCHFV 的囊膜蛋白 Gc 属于 ClassII 型囊膜蛋白。虽然这类蛋白缺少明显的保守氨基酸序列,但是其二级结构和三级结构是保守的,结构非常相似。

使用 TMHMMServer(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>)预测 CCHFV 囊膜蛋白 Gc 在胞外区、跨膜区和胞内区的分布。跨膜区和胞内区因存在空间位阻,不能成为其功能性表位。然后用 NetNGlyc 对囊膜蛋白糖基化位点进行预测,糖基化对表位形成有一定影响,可能会改变或形成新

的表位。利用两个抗原表位预测服务器,(1)ClusPro: protein-protein docking/Antibody Mode(<http://cluspro.bu.edu>);(2)MIF Bioinformatics: Predicted Antigenic Peptides(<http://bio.dfci.harvard.edu/Tools/antigenic.html>),联用亲水性、柔韧性、可及性、转角等多参数进行抗原表位预测。综合考虑跨膜区和抗原表位预测结果及囊膜蛋白的高度变异区,确定分段表达策略,逐步缩小抗原表位区域。表达、纯化这些结构域,可以作为抗体筛选的靶点。

#### 5 展望

中和性抗体是烈性病毒感染防控的特效药物,如已经研制出的针对 EBOV 的抗体药物 ZMapp,取得了很好的效果。目前,已有的针对烈性病毒的中和抗体多为全长单克隆抗体(主要为 IgG 形式),分子量大,不容易结合大分子(如病毒囊膜蛋白)上空间存在位阻效应的关键表位;而且结构复杂,需在哺乳动物细胞中表达,制备周期长,一般情况下需要在低温储存,难以适用于复杂环境。

相对于全长克隆抗体、Fab 和 scFv,单域抗体(包括 dAb 和 nAb)能更有效靶向病毒囊膜蛋白上那些关键而狭小的保守区域,发挥中和活性;富含 β-折叠,结构简单可原核表达,易于制备,常温下仍保持稳定,适宜在复杂的环境中储存和使用;筛选能够中和 CCHFV 的单域抗体,有望开发出抗 CCHFV 的新候选药物,单域抗体具有广阔的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] Francis T, Magill TP. Rift valley fever; a report of three cases of laboratory infection and the experimental transmission of the disease to ferrets[J]. J Exp Med, 1935, 62(3): 433 - 448.
- [2] Havens WP, Watson DW, Green RH, et al. Complement fixation with the neurotropic viruses[J]. J Exp Med, 1943, 77(2): 139 - 153.
- [3] Phillips JE, Stallknecht DE, Perkins TA, et al. Evolutionary dynamics of West Nile virus in Georgia, 2001 - 2011[J]. Virus genes, 2014, 49(1): 132 - 136.
- [4] Casals J. Antigenic similarity between the virus causing Crimean hemorrhagic fever and Congo virus[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1969, 131(1): 233 - 236.
- [5] Gedigk P, Korb G, Bechtelsheimer H. The pathological anatomy of the marburg virus disease[J]. Verh Dtsch Ges Pathol, 1968, 52: 317 - 322.
- [6] [No authors listed]. After Marburg, Ebola[J]. Lancet,

- 1977, 1(8011): 581 - 582.
- [7] CDC. Update: outbreak of Nipah virus - Malaysia and Singapore, 1999[J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1999, 48(16): 335 - 337.
- [8] Harit AK, Ichhpujani RL, Gupta S, et al. Nipah/Hendra virus outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001 [J]. *Indian J Med Res*, 2006, 123(4): 553 - 560.
- [9] Benitez MA. Hong Kong health chief falls ill with suspected SARS virus[J]. *Lancet*, 2003, 361(9363): 1106.
- [10] Bermingham A, Chand MA, Brown CS, et al. Severe respiratory illness caused by a novel coronavirus, in a patient transferred to the United Kingdom from the Middle East, September 2012[J]. *Euro Surveill*, 2012, 17(40): 20290.
- [11] Chen Y, Liang W, Yang S, et al. Human infections with the emerging avian influenza A H7N9 virus from wet market poultry; clinical analysis and characterisation of viral genome[J]. *Lancet*, 2013, 381(9881): 1916 - 1925.
- [12] Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, et al. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China[J]. *N Engl J Med*, 2011, 364(16): 1523 - 1532.
- [13] Chinikar S, Goya MM, Shirzadi MR, et al. Surveillance and laboratory detection system of Crimean-Congo haemorrhagic fever in Iran[J]. *Transbound Emerg Dis*, 2008, 55(5 - 6): 200 - 204.
- [14] Estrada-Peña A, Ruiz-Fons F, Acevedo P, et al. Factors driving the circulation and possible expansion of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the western Palearctic[J]. *J Appl Microbiol*, 2013, 114(1): 278 - 286.
- [15] Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever[J]. *Antiviral Res*, 2004, 64(3): 145 - 160.
- [16] Schwarz TF, Nsanze H, Longson M, et al. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1996, 55(2): 190 - 196.
- [17] Ergönül O. Crimean-Congo haemorrhagic fever[J]. *Lancet Infect Dis*, 2006, 6(4): 203 - 214.
- [18] Vorou R, Pierroutsakos IN, Maltezou HC. Crimean-Congo hemorrhagic fever[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2007, 20(5): 495 - 500.
- [19] Yen YC, Kong LX, Lee L, et al. Characteristics of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (Xinjiang strain) in China[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 1985, 34(6): 1179 - 1182.
- [20] Donets MA, Chumakov MP, Korolev MB, et al. Physicochemical characteristics, morphology and morphogenesis of virions of the causative agent of Crimean hemorrhagic fever[J]. *Intervirology*, 1977, 8(5): 294 - 308.
- [21] Elliott RM, Bouloy M, Calisher C, et al. Seventh report international committee for the taxonomy of viruses[C]. Elsevier Science & Technology, 2000: 599 - 621.
- [22] Burt FJ, Spencer DC, Leman PA, et al. Investigation of tick-borne viruses as pathogens of humans in South Africa and evidence of Dugbe virus infection in a patient with prolonged thrombocytopenia[J]. *Epidemiol Infect*, 1996, 116(3): 353 - 361.
- [23] Murphy FA, Harrison AK, Tzianabos T. Electron microscopic observations of mouse brain infected with Bunyamwera group arboviruses[J]. *J Virol*, 1968, 2(11): 1315 - 1325.
- [24] Murphy FA, Harrison AK, Whitfield SG. Bunyaviridae: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses[J]. *Intervirology*, 1973, 1(4): 297 - 316.
- [25] Ellis DS, Southee T, Lloyd G, et al. Congo/Crimean haemorrhagic fever virus from Iraq 1979: I. Morphology in BHK21 cells[J]. *Arch Virol*, 1981, 70(3): 189 - 198.
- [26] Martin ML, Lindsey-Regnery H, Sasso DR, et al. Distinction between Bunyaviridae genera by surface structure and comparison with Hantaan virus using negative stain electron microscopy[J]. *Arch Virol*, 1985, 86(1 - 2): 17 - 28.
- [27] Sawnepoel R. Nairovirus infections[M]//Porterfield JS. Exotic viral infections. London: Chapman & Hall, 1995: 285 - 293.
- [28] Schmaljohn CS, Hooper JW. Nairovirus infections[M]//Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*, 4th ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2001: 1581 - 1602.
- [29] Elliott RM, Schmaljohn CS, Collett MS. Bunyaviridae genome structure and gene expression[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1991, 169: 91 - 141.
- [30] Hewlett MJ, Pettersson RF, Baltimore D. Circular forms of Uukuniemi virion RNA; an electron microscopic study[J]. *J Virol*, 1977, 21(3): 1085 - 1093.
- [31] Sanchez AJ, Vincent MJ, Erickson BR, et al. Crimean-congo hemorrhagic fever virus glycoprotein precursor is cleaved by Furin-like and SKI-1 proteases to generate a novel 38-kilodalton glycoprotein[J]. *J virol*, 2006, 80(1): 514 - 525.
- [32] Drosten C, Götting S, Schilling S, et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR[J]. *J Clin Microbiol*, 2002, 40(7): 2323 - 2330.
- [33] Vincent MJ, Sanchez AJ, Erickson BR, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus glycoprotein proteolytic processing by subtilase SKI-1[J]. *J Virol*, 2003, 77(16): 8640 - 8649.
- [34] Simpson DI, Knight EM, Courtois G, et al. Congo virus; a hitherto undescribed virus occurring in Africa. I. Human isolations-clinical notes[J]. *East Afr Med J*, 1967, 44(2): 86 - 92.
- [35] Bente DA, Forrester NL, Watts DM, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity[J]. *Antiviral Res*, 2013, 100(1): 159 - 189.
- [36] Flick R, Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus[J]. *Curr Mol Med*, 2005, 5(8): 753 - 760.
- [37] Xiao X, Feng Y, Zhu Z, et al. Identification of a putative Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry factor[J]. *Biochem*

- Biophys Res Commun, 2011, 411(2): 253–258.
- [38] Deyde VM, Khristova ML, Rollin PE, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus genomics and global diversity[J]. J Virol, 2006, 80(17): 8834–8842.
- [39] Wei PF, Luo YJ, Li TX, et al. Serial expression of the truncated fragments of the nucleocapsid protein of CCHFV and identification of the epitope region[J]. Virol Sin, 2010, 25(1): 45–51.
- [40] Dimitrov DS, Marks JD. Therapeutic antibodies: current state and future trends – is a paradigm change coming soon? [J] Methods Mol Biol, 2009, 525: 1–27.
- [41] Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design[J]. Nat Rev Immunol, 2006, 6(5): 343–357.
- [42] Geskey JM, Thomas NJ, Brummel GL. Palivizumab; a review of its use in the protection of high risk infants against respiratory syncytial virus (RSV)[J]. Biologics, 2007, 1(1): 33–43.
- [43] Wu X, Yang ZY, Li Y, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1[J]. Science, 2010, 329(5993): 856–861.
- [44] Zhou T, Georgiev I, Wu X, et al. Structural basis for broad and potent neutralization of HIV-1 by antibody VRC01[J]. Science, 2010, 329(5993): 811–817.
- [45] Jacobson JM, Saag MS, Thompson MA, et al. Antiviral activity of single-dose PRO 140, a CCR5 monoclonal antibody, in HIV-infected adults[J]. J Infect Dis, 2008, 198(9): 1345–1352.
- [46] Jacobson JM, Thompson MA, Lalezari JP, et al. Anti-HIV-1 activity of weekly or biweekly treatment with subcutaneous PRO 140, a CCR5 monoclonal antibody [J]. J Infect Dis, 2010, 201(10): 1481–1487.
- [47] Kuritzkes DR, Jacobson J, Powderly WG, et al. Antiretroviral activity of the anti-CD4 monoclonal antibody TNX-355 in patients infected with HIV type 1[J]. J Infect Dis, 2004, 189(2): 286–291.
- [48] Jacobson JM, Kuritzkes DR, Godofsky E, et al. Safety, pharmacokinetics, and antiretroviral activity of multiple doses of ibalizumab (formerly TNX-355), an anti-CD4 monoclonal antibody, in human immunodeficiency virus type 1-infected adults[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2): 450–457.
- [49] Gong R, Chen W, Dimitrov DS. Candidate antibody-based therapeutics against HIV-1[J]. BioDrugs, 2012, 26(3): 143–162.
- [50] Chen W, Ying T, Dimitrov DS. Antibody-based candidate therapeutics against HIV-1: implications for virus eradication and vaccine design[J]. Expert Opin Biol Ther, 2013, 13(5): 657–671.
- [51] Holliger P, Hudson PJ. Engineered antibody fragments and the rise of single domains[J]. Nat Biotechnol, 2005, 23(9): 1126–1136.
- [52] Gong R, Xiao G. Engineered antibody variable and constant domains as therapeutic candidates[J]. Pharm Pat Anal, 2013, 2(5): 637–646.
- [53] Ahmed AA, McFalls JM, Hoffmann C, et al. Presence of broadly reactive and group-specific neutralizing epitopes on newly described isolates of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus[J]. J Gen Virol, 2005, 86(Pt 12): 3327–3336.
- [54] Whitt MA. Generation of VSV pseudotypes using recombinant  $\Delta$ G-VSV for studies on virus entry, identification of entry inhibitors, and immune responses to vaccines [J]. J Virol Methods, 2010, 169(2): 365–374.
- [55] Shtanko O, Nikitina RA, Altuntas CZ, et al. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus entry into host cells occurs through the multivesicular body and requires ESCRT regulators[J]. PLoS Pathog, 2014, 10(9): e1004390.
- [56] Skehel JJ, Wiley DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin[J]. Annu Rev Biochem, 2000, 69: 531–569.
- [57] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition[J]. Annu Rev Biochem, 2001, 70: 777–810.
- [58] Dimitrov DS. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications[J]. Nat Rev Microbiol, 2004, 2(2): 109–122.
- [59] Schibli DJ, Weissenhorn W. Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion [J]. Mol Membr Biol, 2004, 21(6): 361–371.
- [60] Harrison SC. Mechanism of membrane fusion by viral envelope proteins[J]. Adv Virus Res, 2005, 64: 231–261.
- [61] Kielian M, Rey FA. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin[J]. Nat Rev Microbiol, 2006, 4(1): 67–76.
- [62] Lamb RA, Paterson RG, Jardetzky TS. Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures [J]. Virology, 2006, 344(1): 30–37.
- [63] Stiasny K, Heinz FX. Flavivirus membrane fusion[J]. J Gen Virol, 2006, 87(Pt 10): 2755–2766.
- [64] Kielian M. Class II virus membrane fusion proteins[J]. Virology, 2006, 344(1): 38–47.
- [65] Roche S, Bressanelli S, Rey FA, et al. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G[J]. Science, 2006, 313(5784): 187–191.
- [66] Roche S, Rey FA, Gaudin Y, et al. Structure of the prefusion form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G[J]. Science, 2007, 315(5813): 843–848.
- [67] Heldwein EE, Lou H, Bender FC, et al. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1[J]. Science, 2006, 313(5784): 217–220.
- [68] Garry CE, Garry RF. Proteomics computational analyses suggest that the carboxyl terminal glycoproteins of Bunyaviruses are class II viral fusion protein (beta-penetrenes) [J]. Theor Biol Med Model, 2004, 1: 10.