

新型冠状病毒 RNA 聚合酶突变对瑞德西韦耐药性的影响

刘天福¹, 杨博元², 赵建元^{1*}, 岑山^{1*} (1. 中国医学科学院, 北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050; 2. 复旦大学医学院, 上海 200120)

摘要:新型冠状病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RNA dependent-RNA polymerase, RdRp)是病毒复制过程中的关键酶,也是当前抗病毒治疗中核苷(酸)类似物药物的主要靶点。然而,新冠病毒持续变异,产生了 Alpha、Beta、Gamma、Delta 和 Omicron 等多种被关注的突变毒株,使得感染仍有发生。尽管新冠病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶相对保守,但是随着研究的深入,在该蛋白上已报道存在多个位点的突变,如 V166A, V166L 和 P323L 等。这些突变对目前上市的小分子药物抗病毒活性的影响值得关注。笔者主要综述了新冠病毒 RNA 聚合酶突变对瑞德西韦耐药性的影响,同时结合突变位点的蛋白质结构模拟分析,以期对新冠病毒耐药研究和临床治疗提供参考。

关键词:新型冠状病毒;RNA 依赖性 RNA 聚合酶;瑞德西韦;药物敏感性

doi:10.11669/cpj.2025.07.001 中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)07-0665-08

Effect of SARS-CoV-2 RNA Polymerase Mutations on Remdesivir Resistance

LIU Tianfu¹, YANG Boyuan², ZHAO Jianyuan^{1*}, CEN Shan^{1*} (1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. School of Medicine, Fudan University, Shanghai 200120, China)

ABSTRACT: The RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) plays a pivotal role in the virus's replication process and is a primary target for nucleoside analogue antiviral drugs. However, the ongoing mutations of the virus have led to the emergence of multiple variants of concern, such as Alpha, Beta, Gamma, Delta, and Omicron, resulting in recurrent waves of the pandemic that are yet to be fully controlled. Although the RdRp of the novel coronavirus is relatively conserved, ongoing research has identified several mutations at this protein, such as V166A, V166L, and P323L. The impact of these mutations on the antiviral efficacy of currently available small molecule drugs is noteworthy. This article reviews the influence of SARS-CoV-2 RdRp mutations on resistance to remdesivir, incorporating protein structure prediction of the mutation sites, with the aim of providing insights for optimizing antiviral treatment strategies against COVID-19.

KEY WORDS: SARS-CoV-2; RNA-dependent RNA polymerase; remdesivir; drug sensitivity

病毒性疾病可对公共卫生和全球经济造成深远的影响^[1]。引发新型冠状病毒感染的严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 是一种单股正链 RNA 病毒。其与严重急性呼吸综合征 (severe acute respiratory syndrome, SARS) 冠状病毒以及中东呼吸综合征 (Middle East respiratory syndrome, MERS) 病毒在基因组序列上具有较高的相似性^[2]。鉴于冠状病毒固有的高变异性,研发靶向相对保守的 RNA 复制关键酶——

RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 的药物,具有广谱抗病毒的潜力^[3]。

目前,以 SARS-CoV-2 RdRp 为靶点的上市药物主要为核苷(酸)类似物,如瑞德西韦 (remdesivir, RDV)、莫诺匹拉韦 (molnupiravir, NHC)、法匹拉韦 (favipiravir, FPV) 氢溴酸氩瑞米德 (deuremidevir, VV116) 及阿兹夫定 (azvudine, FNC)^[4-11]。此类药物在宿主细胞内转化为活性的三磷酸形式,与 RdRp 的催化中心结合从而抑制病毒 RNA 的合成^[12]。

基金项目:国家自然科学基金面上项目资助(82373920);北京市自然科学基金资助(7232255);感染性疾病安徽省重点实验室资助课题(编号 AHIDL-2404R)

作者简介:刘天福,男,博士研究生 研究方向:抗病毒药物 * 通讯作者:赵建元,女,博士,副研究员 研究方向:病毒学基础研究和抗病毒药物应用;岑山,男,博士,研究员 研究方向:病毒宿主互作、抗病毒天然免疫和抗病毒药物 Tel:(010)63039279

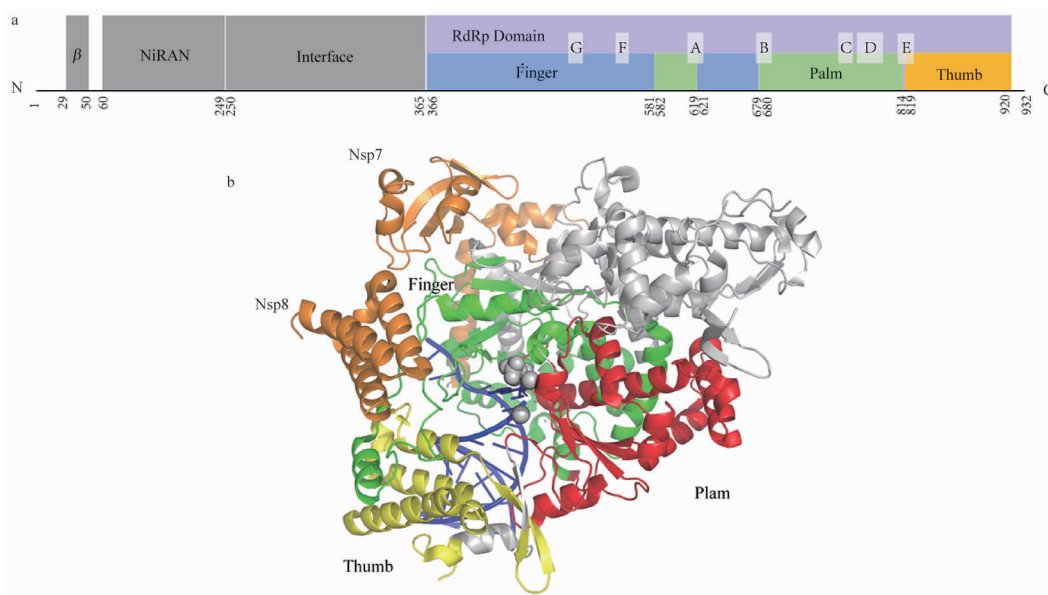
RDV 是首个获得美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准用于治疗 COVID-19 的小分子药物,也是在临床上应用最广的抗病毒药物之一^[13]。RDV 通过延迟链终止效应抑制病毒 RNA 合成^[14]。NHC 可替代胞苷三磷酸 (cytidine triphosphate, CTP) 和尿苷三磷酸 (uridine triphosphate, UTP) 插入 RNA 模板中通过增加突变频率发挥抗病毒效果^[15-16]。FPV 通过模拟鸟苷三磷酸 (guanosine triphosphate, GTP) 的结构作为底物参与 RNA 合成诱发突变发生^[17]。VV116 通过与核苷三磷酸竞争性结合,干扰病毒 RNA 合成^[18]。FNC 通过与 RNA 聚合酶相互作用,有效抑制病毒 RNA 的合成^[19]。这些药物具有良好的体内外抗病毒活性,并在临床研究中均表现出良好的安全性和有效性^[20-25]。

然而,随着病毒的持续进化,新的病毒测序数据表明

RdRp 正发生突变^[26]。这些突变直接关系到抗病毒药物的效果,因为 RdRp 的结构变化直接影响药物的结合能力和抑制效果。本文对 RDV 耐药性相关的新冠病毒 RdRp 突变进行了全面综述,包括临床研究和体外实验结果,以期为未来的药物开发、耐药机制研究和临床用药指导提供科学依据。

1 RdRp 的结构

在 SARS-CoV-2 的生命周期中,RdRp 复合物负责病毒 RNA 的合成。该复合物主要由 3 种非结构蛋白 (non-structural proteins, Nsp) 组成,包括 Nsp12、Nsp7 和 Nsp8^[27]。在该复合物中,Nsp12 执行病毒 RNA 合成功能,而 Nsp7 和 Nsp8 则作为辅助因子,增强催化效率。Nsp12 的结构由 4 个主要功能域构成,见图 1^[28-29]。



a - Nsp12 蛋白基因结构示意图; β - β 发夹结构功能域;NiRAN - 核苷酸转移酶功能域;Interface - 界面功能域;RdRp domain - RdRp 功能域;Finger - 手指域;Palm - 掌心域;Thumb - 拇指域;A - G - 基序 A, 基序 B, 基序 C, 基序 D, 基序 E, 基序 F 和基序 G; b - RdRp 蛋白三维结构图;Finger - 手指域;Palm - 掌心域;Thumb - 拇指域。

图 1 新冠病毒 Nsp12 蛋白基因结^[28-29]

N 端 β 发夹结构功能域 (D29 ~ K50), 对维持蛋白质的整体稳定性至关重要;套式病毒 RdRp 相关核苷酸转移酶功能域 (nidovirus RdRp-associated nucleotidyltransferase, NiRAN) (D60 ~ R249), 参与病毒 RNA 的修饰和调控过程^[30];界面功能域 (interface domain, A250 ~ R365), 在复合物的组装和功能中起到桥梁作用;RdRp 功能域 (S366 ~ F920), 作为催化 RNA 合成的主要活性区域, 直接参与病毒 RNA 的复制过程。这些功能域的相互协作是 SARS-CoV-2 病毒 RNA 复制的基础。

根据晶体结构 (PDB ID: 7BV2)^[29], 新冠病毒 Nsp12 蛋白的 RdRp 结构域在空间构型上呈现出与人类手部相似的形态 (图 1b), 主要由 3 个亚结构域组成: 手指域 (残基 397 ~ 581 和 621 ~ 679)、掌心域 (残基 582 ~ 619 和 680 ~ 814) 以及

拇指域 (残基 819 ~ 920)^[31]。在 RNA 合成过程中, 病毒的 RNA 模板首先与手指域进行识别和结合, 这一步骤是聚合酶活动的初始阶段。随后, RNA 模板链被精确定位至掌心域, 这是核苷酸三磷酸 (nucleoside triphosphates, NTPs) 的主要捕获区域。在掌心域内, NTPs 在镁离子或锰离子的辅助下, 通过与 RNA 模板链的碱基互补配对, 被掺入新生的 RNA 链中。在 RNA 链的延伸过程中, 拇指域的作用是调节新合成 RNA 链的移动, 确保 RNA 聚合反应高效进行。

由掌心域和手指域共同形成的中心腔是 RNA 合成生化过程发生的核场所。中心腔由模板/引物入口通道、NTPs 进入通道以及新生 RNA 链的出口通道组成。结构上, 中心腔由 7 个基序构成, 基序 A ~ E 位于掌心域, 基序 F 和 G 位于手指域^[27]。其中, 基序 A (N611 ~ M626) 和基序 C (F753 ~

N767)在 RNA 合成过程中最为关键^[32]。基序 A 中包含催化基序 D618, D623, 与 NTPs 形成氢键^[33]。基序 C 含有 S759 ~ D760 ~ D761 催化基序, 其中 D760 和 D761 残基参与镁离子配位, 催化 NTP 焦磷酸基团的释放^[29]。NTP 穿过由 K545、R553 和 R555 组成的亲水性通道后进入催化中心^[28]。基序 D (A771 ~ E796) 决定核苷酸添加的效率和保真度^[34]。基序 B (G678 ~ T710), 基序 E (H810 ~ V820)、基序 F (L544 ~ V557)、基序 G (K500 ~ L514) 共同稳定 RNA 模板链^[28-29, 35]。

当前, 靶向新冠病毒 RdRp 的上市药物主要为核苷(酸)类似物。这些药物通过模仿 NTPs 的结构, 充当病毒 RNA 合成过程中的底物以干扰和破坏病毒 RNA 合成。然而靶点蛋白突变可能对药物的抑制作用造成影响。

2 RDV

由吉利德公司研发的核苷酸类抗病毒药物 RDV (商品名 Veklury), 于 2020 年 5 月 1 日获得 FDA 紧急使用授权, 用于治疗 COVID-19 住院患者 (成人患者和 12 岁及以上儿童患者, 且患者体质量至少为 40 kg)。RDV 作为前体药物, 在体内经过组织蛋白酶 A、羧酸酯酶 1、组氨酸三核苷酸结合蛋白 1、单磷酸和双磷酸激酶的作用, 转化为其活性形式瑞德西韦三磷酸 (remdesivir triphosphate, RDV-TP)。RDV-TP 与 SARS-CoV-2 RdRp 结合, 并与 ATP 竞争性地嵌入新合成的 RNA 链中, 引起延迟链终止^[14, 36-38]。

在 Beigel 等^[4]开展的随机双盲对照临床试验中, 共纳入 1 062 名新冠患者 (RDV 组 541 人, 安慰剂组 521 人)。结果显示, 与安慰剂组相比, 接受 RDV 治疗的患者中位恢复时间从 15 d 缩短至 10 d。此外, RDV 组在改善临床症状、患者死亡率方面均表现出较好的效果, 死亡率从 15.2% 降至 11.4%。然而, Wang 等^[20, 39]的临床试验显示, 在患者病程后

期使用 RDV 未能显著缩短患者的恢复时间, 仅在症状持续时间不超过 10 d 的早期患者中观察到显著的症状改善。世界卫生组织“团结”试验 (solidarity trial) 的最终报告表明 RDV 对部分患者 (未接受机械通气但需要氧气支持) 有效, 可显著降低死亡率和疾病进展的风险^[40]。此外, RDV 对 Alpha、Beta、Delta 和 Omicron 毒株的活性保持稳定, 对 Omicron BA. 1、BA. 2、BA. 4、BA. 5、BQ. 1. 1 和 XBB 亦表现出较高的抗病毒活性^[41]。

3 与 RDV 耐药相关的新冠病毒 RdRp (Nsp12) 蛋白突变

尽管 RDV 在体内外均表现出良好的抗病毒效果, 但靶点蛋白 RdRp (Nsp12) 的突变可能导致其抗病毒效果减弱。因此, 本文综述了目前文献报道的 RDV 耐药相关的 RdRp 突变, 并结合美国国家生物技术信息中心 (National Center of Biotechnology Information, NCBI) 的病毒数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/>) 中 2024 年 1 月 1 日至 11 月 17 日的 91 946 条测序结果与对照序列 (YP_009724389.1) 进行比对, 并对各个突变的发生率进行了统计, 见表 1。另外, 将 RdRp 晶体结构 (PDB ID: 7BV2) 经 DynaMut2 平台分析, 模拟了 Nsp12 突变前后相邻氨基酸残基相互作用模式^[29, 42]。

3.1 V166A/V166L

RDV 治疗的新冠患者病例中报告了 Nsp12 V166A 突变^[43], 且细胞实验获得的 RDV 耐药株中也发现了 Nsp12 V166A 突变^[44], 但是目前尚无单独治疗 Nsp12 V166A 突变的药物敏感性数据。另外, 有两例新冠患者的临床报告显示使用 RDV 治疗后检测到 Nsp12 V166L 突变^[45-46], 经 RDV 处理的连续传代也检测到该突变, 且该突变使 RDV 抗病毒的 EC₅₀ 值升高了 50%^[47]。模型预测显示, Nsp12 V166A 导致

表 1 新型冠状病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 耐药相关突变位点及药物敏感性

结构域	突变位点	临床病例	体外传代	RDV EC ₅₀ 比值 (突变株/野生株)	突变概率 /%	功能特点	参考文献
核苷酸转移酶 (NiRAN) 结构域	V166A	1	1	-	0.002	-	[38-39]
	V166L	2	1	1.5	0.004	可能与瑞德西韦 (RDV) 的增强有关	[40-41, 43]
界面结构域	P323L	-	-	1.25	99.706	对药物敏感性的影响较小	[47]
RNA 依赖性 RNA 聚合酶手指域	A449V	2	-	-	0.016	-	[38, 43]
	F480L	-	-	1.5	0.001	对新冠病毒复制能力和耐药性影响较小	[44-46]
	D484Y	1	-	3	-	可能与 RDV 的耐药性增强有关	[44-45]
	I536V	1	-	-	0.012	-	[41]
	V557L	-	-	-	-	使 RdRp 蛋白不稳定, 相应毒株无法被拯救	[45]
	S759A	-	1	-	-	RdRp 对瑞德西韦三磷酸 (RDV-TP) 的亲合力降低	[39]
RdRp 手掌域	V792I	3	1	2.6	0.014	更容易克服 RDV 引起的延迟链终止	[39, 47-48]
	E796G	-	1	2.6	0.001	显著减弱 RDV 的抗病毒作用	[45]
	C799F	-	2	1.9	0.002	显著减弱 RDV 的抗病毒作用	[45, 49]
	E802A	-	1	2.14; 6	-	增强了病毒对 RDV 的耐药性, 同时降低病毒适应性	[50-51]
	E802D	1	1	2.54; 3.86; 7.29	-	增强了病毒对 RDV 的耐药性, 同时降低病毒复制能力	[45, 50-51]
NiRAN 结构域与界面结构域	V166L + P323L	-	-	1.5	-	增强了病毒对 RDV 的耐药性, 同时降低病毒复制能力	[47]
RdRp 手指域	F480L + V557L	-	-	3.76	-	增强了病毒对 RDV 的耐药性	[45]
RdRp 手指域和手掌域	S759A + V792I	-	1	7.3	-	显著增强病毒对 RDV 的耐药性	[39]
RdRp 手掌域	E796G + C799F	-	1	2.9	-	减弱 RDV 的抗病毒作用, 同时降低病毒复制能力	[45]

其与 K621 的疏水作用力消失,使结合腔空间减小; Nsp12 V166L 突变后,增加了范德华力,使结合腔空间增大(图 2)。因此,这两种突变可能都间接地影响了 RdRp 与 NTP/RDV-TP 的结合。

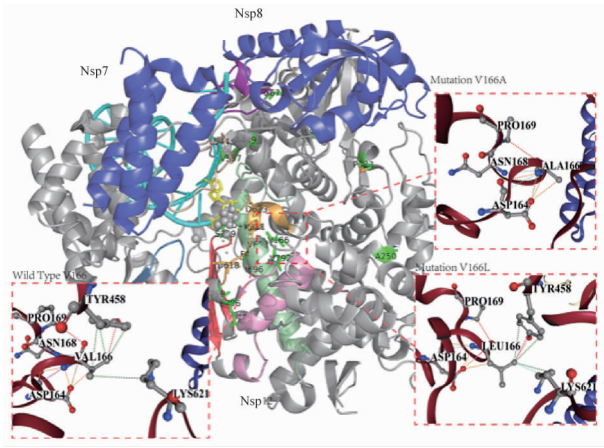


图 2 Nsp12 V166 突变体侧链相互作用模式预测

3.2 A449V

有两例新冠患者使用 RDV 治疗后检测到 Nsp12 A449V 突变^[43,48]。但由于缺乏体外研究,该突变对药物敏感性的影响仍未明确。A449V 突变显著增强了与 L544 之间的疏水相互作用,见图 3,这种增强的疏水作用力可能影响 RNA 模板链的正确定位,可能对 RDV 引起的延迟链终止效应产生影响。

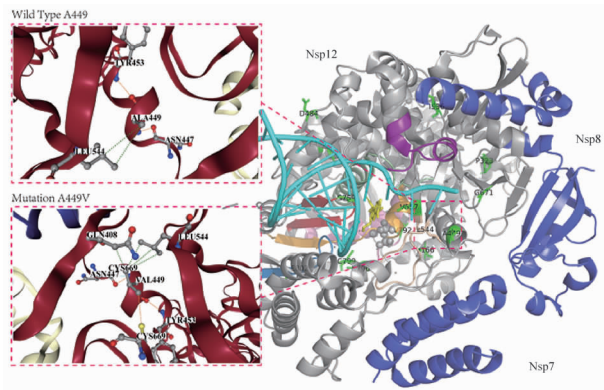


图 3 Nsp12 A449V 突变体侧链相互作用模式预测

3.3 D484Y

在 RDV 治疗失败的新冠患者体内检测到 Nsp12 D484Y 突变新冠病毒株^[49]。体外研究揭示 Nsp12 D484Y 突变株对 RDV 的 EC₅₀ 值是野生型的 3 倍^[50],表明 D484Y 突变可能与耐药性增强有关。Torii 等^[50]通过数学建模对 Nsp12 的多种突变进行了功能研究,结果显示相比野生型,D484Y 突变株的病毒产量有所提升。DynaMut2 模拟分析显示,D484Y 突变并未显著改变该残基与周围氨基酸的相互作用(图 4)。

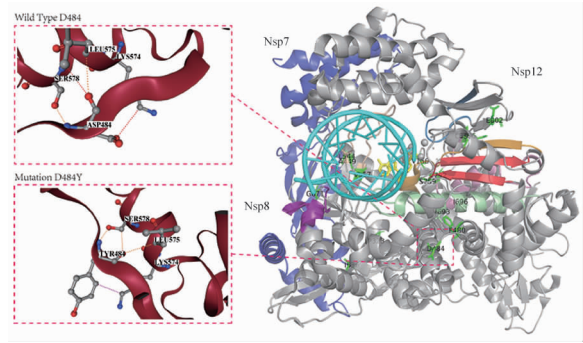


图 4 Nsp12 D484Y 突变体侧链相互作用模式预测

3.4 F480L/V557L

在 SARS-CoV-2 中,Nsp12 F480L 单一突变株的 EC₅₀ 值为野生型的 1.5 倍,而 F480L/V557L 双突变株为野生型的 3.76 倍^[50]。因此,共同突变使病毒对 RDV 的耐药性增强。结构预测显示,Nsp12 F480L 突变降低了氨基酸侧链的疏水性并减小了侧链的体积。该突变导致原本存在于苯丙氨酸侧链与基序 B 中缬氨酸(V693)和异亮氨酸(I696)之间的疏水相互作用力丧失,可间接引起催化中心 SDD 空间结构的变化(图 5)。

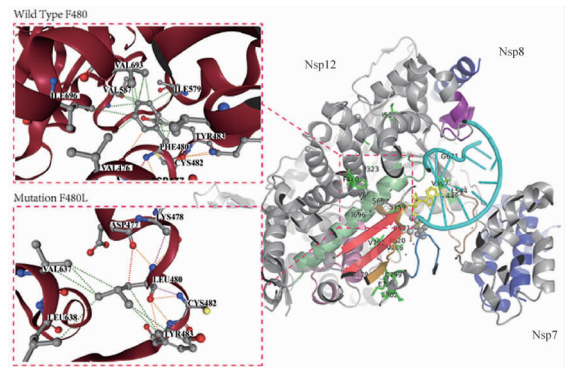


图 5 Nsp12 F480L 突变体侧链相互作用模式预测

Nsp12 V557L 突变与相邻残基的相互作用变化不大(图 6)。但 Pruijssers 等^[51]的分子建模研究表明,突变引起 RNA 模板链位置变化,对 NTPs 结合产生影响。此外,Tchesnokov 等^[52]的研究揭示 V557L 突变可提高 UTP 的使用效率并产生耐药性。

3.5 I536V 突变

Malsy 等^[46]报告的新冠患者病例中,在 RDV 治疗期间,SARS-CoV-2 的 Nsp12 蛋白出现了 I536V 突变(突变频率为 100)。I536V 突变显著增强了该位点与蛋白质中其他残基(如 Y530 和 V373 位点)的相互作用力(图 7)。然而,由于该位点与各基序距离较远,其影响仍需进一步研究。

3.6 V792I 和 S759A

在 3 例新冠患者的报告显示,RDV 治疗后均出现了 Nsp12 V792I 突变^[53-54]。Stevens 等^[44]在病毒耐药突变实验中也检测到了 S759A 和 V792I 突变。V792I 突变使 RDV

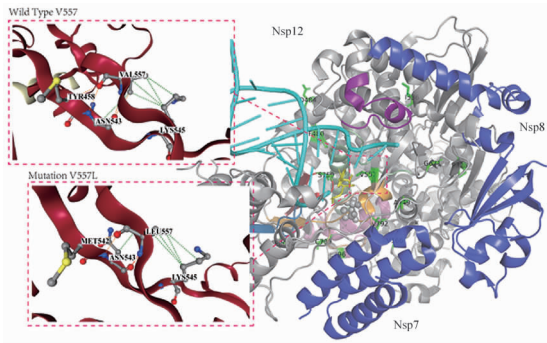


图6 Nsp12 V557L 突变体侧链相互作用模式预测

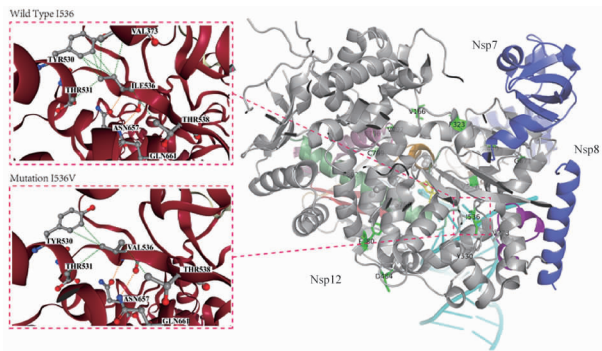


图7 Nsp12 I536V 突变体侧链相互作用模式预测

抗病毒的 EC_{50} 值提高了 2.6 倍,而 S759A 和 V792I 双突变的病毒使 RDV 抗病毒的 EC_{50} 值提高了 7.3 倍。RdRp S759A 突变使 RDV-TP 的亲合力降低近 90%。引入 V792I 突变,提高了 UTP 的利用效率。共同突变显著增强 RDV 的耐药性^[44]。结构预测显示,Nsp12 V792I 突变增强了其与基序 A 的相互作用,间接改变 D623 的空间位置,对 NTP 的选择和催化产生影响。另外,该突变还增加了其与 P620 之间的氢键和疏水作用力,增加了其与 K621 和 V166 之间的疏水作用力(图 8)。

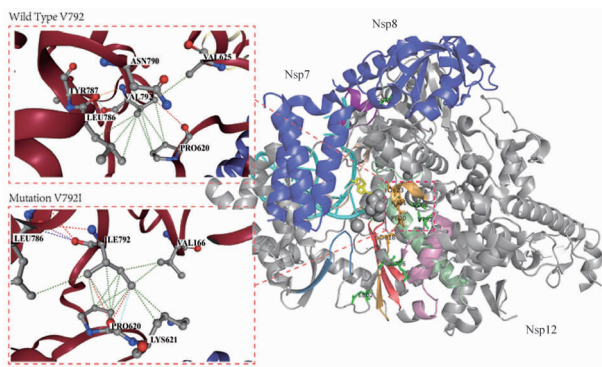


图8 Nsp12 V792I 突变体侧链相互作用模式预测

Nsp12 S759A 发生在基序 C 的催化活性中心 SDD 基序中,由丝氨酸(serine,S)突变为丙氨酸(alanine,A)。突变后,A688 和 N691 之间的相互作用消失(图 9)。Stevens 的研究

发现,S759A 突变导致 1 个氢键的缺失,从而降低了其与 RDV-TP 的亲合力^[44]。

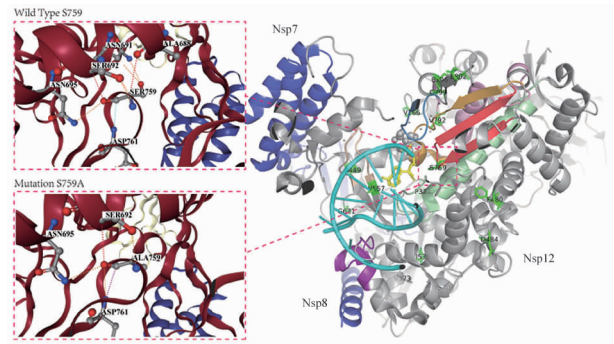


图9 Nsp12 S759A 突变体侧链相互作用模式预测

3.7 E796G 和 C799F

Torii 等^[50] 病毒耐药突变实验,筛选出 RDV 耐药株 Nsp12 E796G 和 C799F 突变。该双突变毒株对 RDV 的 EC_{50} 值是野生型毒株的 2.9 倍。而单突变实验显示,Nsp12 E796G 和 Nsp12 C799F 使 RDV 抗病毒的 EC_{50} 值分别提高了 2.6 倍和 1.9 倍。此外,Szemiel 等^[55] 的研究也发现了 Nsp12 C799F 突变。通过结构预测,我们发现该突变使其与 I779 之间的疏水作用力会丧失(图 10)。

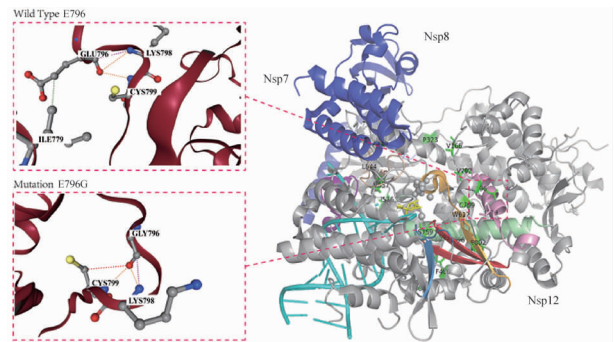


图10 Nsp12 E796G 突变体侧链相互作用模式预测

Nsp12 C799F 突变中,侧链中亲水的巯基被苯环替代,疏水性和空间大小都有所提高。突变后形成与 G616 极性作用力,以及与 W617 的疏水作用力,并与基序 D 的 I779, M794 形成较强疏水作用力(图 11)。经计算机模拟研究发现 E796G 和 C799F 提高了 RNA 结合位点的活性,表明其与 RDV 的结合力减弱^[50]。

3.8 E802A/D

在 RDV 治疗后,高病毒载量新冠患者的测序结果中存在 Nsp12 E802D 突变^[56]。体外研究中,两个相互独立的耐药突变实验也报道了 E802D 突变^[55]。将 NSP12 E802D 和 NSP12 E802A 突变引入新冠病毒后,RDV 的 EC_{50} 值分别提高到 2.54 倍和 2.14 倍^[55]。Gandhi 等^[56] 验证了 NSP12 E802A 和 NSP12 E802D 突变使 RDV 抗病毒的 EC_{50} 值分别提高了 6 倍和 3.86 倍。结构预测显示,E802D 突变后失去了与

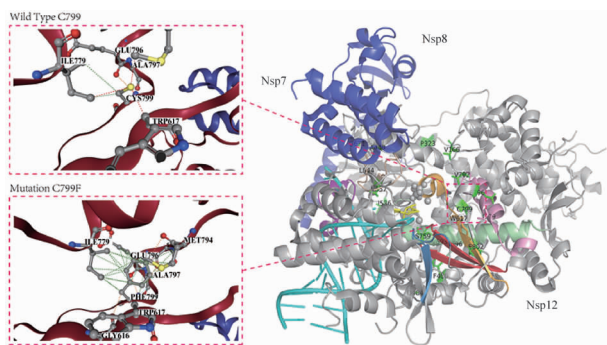


图 11 Nsp12 C799F 突变体侧链相互作用模式预测

残基 D804 和 K807 的作用力;E802A 突变后失去了与 D804、K807 和 G808 之间的作用力(图 12)。

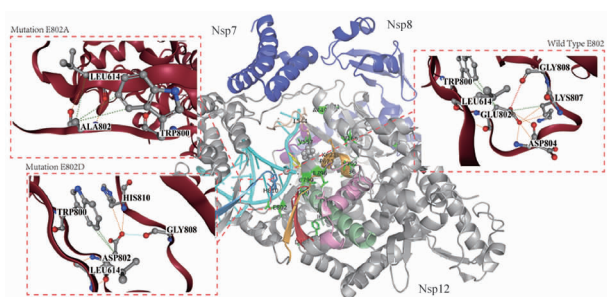


图 12 Nsp12 E802A/D 突变体侧链相互作用模式预测

4 讨论

本文结合 RDV 耐药性相关的临床研究和体外实验,对耐药相关突变的药物敏感性数据进行了汇总,如表 1 所示,其中 V166A、A449V、I536V 和 S759A 尚无药物敏感性数据。这些突变主要分布在基序 A 和基序 D 附近。V166L 和 V792I 突变发生位置接近,均增强了其与基序 A 中 K621 的相互作用,如提高 UTP 的利用效率以缓解模板依赖性抑制。E796G 和 C799F 均与 I779 存在相互作用,E796G 突变后失去了与 I779 之间的相互作用,而 C799F 显著提高与 I779 之间的作用力,但是两者均提高了 RNA 结合位点的柔性和 RDV 耐药性。

目前,关于 RDV 耐药新冠病毒的传播力和致病性的研究尚显不足。针对 RDV 耐药毒株复制能力的研究揭示 Nsp12 P323L 和 D484Y 突变能够增强病毒的复制能力;而 V166L、F480L、V557L、S759A、V792I、E802A 和 E802D 等突变则导致病毒复制效率下降^[44,47,50,56-58]。此外,Nsp12 D484Y、C799F 和 E796G 突变病毒感染效率均降低^[50]。

笔者在对比 RdRp 突变体分子内相互作用时,采用了预测突变蛋白具有较高准确性的 DynaMut2 平台^[42],但其结果仅为计算机模拟与真实结构会存在差异。当前抗新冠治疗药物在突变株中的药物敏感性研究仍有待完善,特别是 RDV 耐药机制相关研究。建议采用计算机模拟与实验验证相结合的方法深入探讨突变背后的耐药机制;同时,利用深度学习技术对具有潜在耐药性的突变位点

及新突变株的耐药特性进行预测分析。药物敏感性研究可为临床精准用药提供依据,针对耐药病毒使用多药联合治疗。

REFERENCES

- [1] WANG H H, ZENG W, KABUBEI K M, *et al.* Modelling the economic burden of SARS-CoV-2 infection in health care workers in four countries[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 2791. DOI: 10. 1038/s41467-023-38477-7.
- [2] HU B, GUO H, ZHOU P, *et al.* Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19(3): 141-154.
- [3] SHEAHAN T P, SIMS A C, ZHOU S T, *et al.* An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(541): eabb5883. DOI: 10. 1126/scitranslmed. abb5883.
- [4] BEIGEL J H, TOMASHEK K M, DODD L E, *et al.* Remdesivir for the treatment of covid-19-final report [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(19): 1813-1826.
- [5] JAYK BERNAL A, GOMES DA SILVA M M, MUSUNGAIE D B, *et al.* Molnupiravir for oral treatment of covid-19 in nonhospitalized patients[J]. *N Engl J Med*, 2022, 386(6): 509-520.
- [6] HUNG D T, GHULA S, AZIZ J M A, *et al.* The efficacy and adverse effects of favipiravir on patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of published clinical trials and observational studies[J]. *Int J Infect Dis*, 2022, 120: 217-227.
- [7] REN Z G, LUO H, YU Z J, *et al.* A randomized, open-label, controlled clinical trial of azvudine tablets in the treatment of mild and common COVID-19, a pilot study[J]. *Adv Sci (Weinh)*, 2020, 7(19): e2001435. DOI: 10. 1002/advs. 202001435.
- [8] FAN X H, DAI X H, LING Y, *et al.* Oral VV116 versus placebo in patients with mild-to-moderate COVID-19 in China; a multicentre, double-blind, phase 3, randomised controlled study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2024, 24(2): 129-139.
- [9] ZHANG X H, YI Z M, XIONG X, *et al.* Determination of Azvudine concentration in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2023, 58(15): 1398-1402.
- [10] JING W, FENG X W, FEI J P. The first domestic original drug for the treatment of COVID-19; azvudine [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2022, 57(23): 2041-2044.
- [11] QIAN S, QI Z J, XIAN Z S, *et al.* Safety of small molecule Anti-SARS-CoV-2 drugs during pregnancy and lactation [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2024, 59(18): 1757-1763.
- [12] LOMBARDO D, MUSOLINO C, CHINES V, *et al.* Assessing genomic mutations in SARS-CoV-2: potential resistance to antiviral drugs in viral populations from untreated COVID-19 patients [J]. *Microorganisms*, 2023, 12(1): 2. DOI: 10. 3390/microorganisms12010002.
- [13] SIEMIENIUK R A, BARTOSZKO J J, ZERAATKAR D, *et al.* Drug treatments for covid-19: living systematic review and network meta-analysis [J]. *BMJ*, 2020, 370: m2980. DOI: 10. 1136/bmj. m2980.
- [14] LI R D, LICLICAN A, XU Y L, *et al.* Key metabolic enzymes involved in remdesivir activation in human lung cells[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65(9): e0060221. DOI: 10.

- 1128/AAC.00602-21.
- [15] GORDON C J, TCHESNOKOV E P, SCHINAZI R F, *et al.* Molnupiravir promotes SARS-CoV-2 mutagenesis *via* the RNA template[J]. *J Biol Chem*, 2021, 297(1): 100770. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100770.
- [16] KABINGER F, STILLER C, SCHMITZOVÁ J, *et al.* Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis[J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2021, 28(9): 740-746.
- [17] SHANNON A, SELISKO B, LE N T T, *et al.* Rapid incorporation of Favipiravir by the fast and permissive viral RNA polymerase complex results in SARS-CoV-2 lethal mutagenesis[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4682. DOI: 10.1038/s41467-020-18463-z.
- [18] XIE Y C, YIN W C, ZHANG Y M, *et al.* Design and development of an oral remdesivir derivative VV116 against SARS-CoV-2[J]. *Cell Res*, 2021, 31(11): 1212-1214.
- [19] XU N, YANG J, ZHENG B S, *et al.* The pyrimidine analog FNC potently inhibits the replication of multiple enteroviruses[J]. *J Virol*, 2020, 94(9): e00204-20. DOI: 10.1128/JVI.00204-20.
- [20] VANGEEL L, CHIU W, DE JONGHE S, *et al.* Remdesivir, Molnupiravir and Nirmatrelvir remain active against SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern[J]. *Antiviral Res*, 2022, 198: 105252. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105252.
- [21] COX R M, WOLF J D, PLEMPER R K. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets[J]. *Nat Microbiol*, 2021, 6(1): 11-18.
- [22] WAHL A, GRALINSKI L E, JOHNSON C E, *et al.* SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801[J]. *Nature*, 2021, 591(7850): 451-457.
- [23] FINBERG R W, ASHRAF M, JULG B, *et al.* US₂01 study: a phase 2, randomized proof-of-concept trial of favipiravir for the treatment of COVID-19[J]. *Open Forum Infect Dis*, 2021, 8(12): ofab563. DOI: 10.1093/ofid/ofab563.
- [24] ZHANG Y M, SUN Y, XIE Y C, *et al.* A viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor VV116 broadly inhibits human coronaviruses and has synergistic potency with 3CLpro inhibitor nirmatrelvir[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 360. DOI: 10.1038/s41392-023-01587-1.
- [25] DENG G T, LI D S, SUN Y M, *et al.* Real-world effectiveness of Azvudine versus nirmatrelvir-ritonavir in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study[J]. *J Med Virol*, 2023, 95(4): e28756. DOI: 10.1002/jmv.28756.
- [26] SHANNON A, CANARD B. Kill or corrupt; Mechanisms of action and drug-resistance of nucleotide analogues against SARS-CoV-2[J]. *Antiviral Res*, 2023, 210: 105501. DOI: 10.1016/j.antiviral.2022.105501.
- [27] HILLEN H S, KOKIC G, FARNUNG L, *et al.* Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase[J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 154-156.
- [28] GAO Y, YAN L M, HUANG Y C, *et al.* Structure of the RNA-dependent RNA polymerase from COVID-19 virus[J]. *Science*, 2020, 368(6492): 779-782.
- [29] YIN W C, MAO C Y, LUAN X D, *et al.* Structural basis for inhibition of the RNA-dependent RNA polymerase from SARS-CoV-2 by remdesivir[J]. *Science*, 2020, 368(6498): 1499-1504.
- [30] LEHMANN K C, GULYAeva A, ZEVENHOVEN-DOBBE J C, *et al.* Discovery of an essential nucleotidylating activity associated with a newly delineated conserved domain in the RNA polymerase-containing protein of all nidoviruses[J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(17): 8416-8434.
- [31] PENG Q, PENG R C, YUAN B, *et al.* Structural and biochemical characterization of the nsp12-nsp7-nsp8 core polymerase complex from SARS-CoV-2[J]. *Cell Rep*, 2020, 31(11): 107774. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107774.
- [32] UENGWETWANIT T, CHUTIWITONCHAI N, WICHAPONG K, *et al.* Identification of novel SARS-CoV-2 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) inhibitors: From in silico screening to experimentally validated inhibitory activity[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 882-890.
- [33] PATHANIA S, RAWAL R K, SINGH P K. RdRp (RNA-dependent RNA polymerase): a key target providing anti-virals for the management of various viral diseases[J]. *J Mol Struct*, 2022, 1250: 131756. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131756.
- [34] YANG X R, SMIDANSKY E D, MAKSIMCHUK K R, *et al.* Motif D of viral RNA-dependent RNA polymerases determines efficiency and fidelity of nucleotide addition[J]. *Structure*, 2012, 20(9): 1519-1527.
- [35] JIANG Y, YIN W C, XU H E. RNA-dependent RNA polymerase: structure, mechanism, and drug discovery for COVID-19[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538: 47-53.
- [36] SHEN Y, EADES W, YAN B F. The COVID-19 medicine remdesivir is therapeutically activated by carboxylesterase-1, and excessive hydrolysis increases cytotoxicity[J]. *Hepatol Commun*, 2021, 5(9): 1622-1623.
- [37] DANGERFIELD T L, HUANG N Z, JOHNSON K A. Remdesivir is effective in combating COVID-19 because it is a better substrate than ATP for the viral RNA-dependent RNA polymerase[J]. *iScience*, 2020, 23(12): 101849. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101849.
- [38] GORDON C J, TCHESNOKOV E P, WOOLNER E, *et al.* Remdesivir is a direct-acting antiviral that inhibits RNA-dependent RNA polymerase from severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 with high potency[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(20): 6785-6797.
- [39] WANG Y M, ZHANG D Y, DU G H, *et al.* Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial[J]. *Lancet*, 2020, 395(10236): 1569-1578.
- [40] CONSORTIUM W H O S T. Remdesivir and three other drugs for hospitalised patients with COVID-19: final results of the WHO Solidarity randomised trial and updated meta-analyses[J]. *Lancet*, 2022, 399(10339): 1941-1953.
- [41] IMAI M, ITO M, KISO M, *et al.* Efficacy of antiviral agents against Omicron subvariants BQ.1.1 and XBB[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(1): 89-91.
- [42] RODRIGUES C H M, PIRES D E V, ASCHER D B. DynaMut2: Assessing changes in stability and flexibility upon single and multiple point missense mutations[J]. *Protein Sci*, 2021, 30(1): 60-69.
- [43] YANG S X, MULTANI A, GARRIGUES J M, *et al.* Transient SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase mutations after remdesivir treatment for chronic COVID-19 in two transplant recipients: case report and intra-host viral genomic investigation[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(8): 2096. DOI: 10.3390/mi-

- croorganisms11082096.
- [44] STEVENS L J, PRUIJSSERS A J, LEE H W, *et al.* Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms[J]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(656): eab0718. DOI: 10.1126/scitranslmed.ab0718.
- [45] HIROTSU Y, KOBAYASHI H, KAKIZAKI Y, *et al.* Multidrug-resistant mutations to antiviral and antibody therapy in an immunocompromised patient infected with SARS-CoV-2[J]. *Medicine*, 2023, 4(11): 813-824.
- [46] MALSY J, VELETZKY L, HEIDE J, *et al.* Sustained response after remdesivir and convalescent plasma therapy in a B-cell-depleted patient with protracted coronavirus disease 2019 (COVID-19) [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(11): e4020-e4024.
- [47] CHECKMAHOMED L, CARBONNEAU J, DU PONT V, *et al.* *In vitro* selection of remdesivir-resistant SARS-CoV-2 demonstrates high barrier to resistance [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2022, 66(7): e0019822. DOI: 10.1128/aac.00198-22.
- [48] HETTLE D, HUTCHINGS S, MUIR P, *et al.* Persistent SARS-CoV-2 infection in immunocompromised patients facilitates rapid viral evolution; Retrospective cohort study and literature review [J]. *Clin Infect Pract*, 2022, 16: 100210. DOI: 10.1016/j.clinpr.2022.100210
- [49] MARTINOT M, JARY A, FAFI-KREMER S, *et al.* Emerging RNA-dependent RNA polymerase mutation in a remdesivir-treated B-cell immunodeficient patient with protracted coronavirus disease 2019[J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73(7): e1762-e1765.
- [50] TORII S, KIM K S, KOSEKI J, *et al.* Increased flexibility of the SARS-CoV-2 RNA-binding site causes resistance to remdesivir [J]. *PLoS Pathog*, 2023, 19(3): e1011231. DOI: 10.1093/cid/ciaa1474.
- [51] PRUIJSSERS A J, GEORGE A S, SCHAFER A, *et al.* Remdesivir inhibits SARS-CoV-2 in human lung cells and chimeric SARS-CoV expressing the SARS-CoV-2 RNA polymerase in mice [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(3): 107940. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.107940
- [52] TCHESNOKOV E P, GORDON C J, WOOLNER E, *et al.* Template-dependent inhibition of coronavirus RNA-dependent RNA polymerase by remdesivir reveals a second mechanism of action [J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(47): 16156-16165.
- [53] HOGAN J I, DUERR R, DIMARTINO D, *et al.* Remdesivir resistance in transplant recipients with persistent coronavirus disease 2019[J]. *Clin Infect Dis*, 2023, 76(2): 342-345.
- [54] TANINO Y, NISHIOKA K, YAMAMOTO C, *et al.* Emergence of SARS-CoV-2 with dual-drug resistant mutations during a long-term infection in a kidney transplant recipient [J]. *Infect Drug Resist*, 2024, 17: 531-541.
- [55] SZEMIEL A M, MERITS A, ORTON R J, *et al.* *In vitro* selection of Remdesivir resistance suggests evolutionary predictability of SARS-CoV-2 [J]. *PLoS Pathog*, 2021, 17(9): e1009929. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009929.
- [56] GANDHI S, KLEIN J, ROBERTSON A J, *et al.* *De novo* emergence of a remdesivir resistance mutation during treatment of persistent SARS-CoV-2 infection in an immunocompromised patient; a case report [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1547. DOI: 10.1038/s41467-022-29104-y.
- [57] KIM S M, KIM E H, CASEL M A B, *et al.* SARS-CoV-2 variants with NSP12 P323L/G671S mutations display enhanced virus replication in ferret upper airways and higher transmissibility [J]. *Cell Rep*, 2023, 42(9): 113077. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.113077.
- [58] AGOSTINI M L, ANDRES E L, SIMS A C, *et al.* Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00221-18. DOI: 10.1128/mBio.00221-18.

(收稿日期:2024-10-15)