

## 抗诺如病毒药物及其疫苗研究新进展

董悦, 展鹏\*, 刘新泳\*

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

**摘要:** 诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起全球急性胃肠炎流行和暴发的主要病原体, NoV 感染已成为危害人类健康的重要公共卫生问题。由于缺乏合适和成熟的动物筛选模型和体外细胞培养模型, 抗 NoV 病毒研究进展缓慢, 目前临床尚缺乏针对 NoV 的有效抗病毒药物或疫苗。过去几年, 抗 NoV 药物及其疫苗领域进展较大。本综述通过精选代表性研究实例, 总结了抗 NoV 药物及其疫苗的最新进展。

**关键词:** 诺如病毒; 急性胃肠炎; 药物靶标; 抑制剂; 疫苗

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)04-0640-12

## New progress in anti-norovirus drugs and vaccines

DONG Yue, ZHAN Peng\*, LIU Xin-yong\*

(Department of Medicinal Chemistry, Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education),  
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

**Abstract:** Norovirus (NoV) is the main pathogen causing the global acute gastroenteritis in humans and NoV infection has become an important public health problem that threatens human health. Because of the lack of appropriate animal models and *in vitro* cell culture models, the development of NoV biology and antiviral research has been restricted, and there is currently no effective antiviral drug or vaccine against NoV. In the past few years, considerable progress has been made toward the development of norovirus antivirals. This review selects the most representative research examples and provides an overview of recent advances in anti-norovirus drugs and vaccines.

**Key words:** norovirus; acute gastroenteritis; drug target; inhibitor; vaccine

诺如病毒 (norovirus, NoV) 是引起全球散发性胃肠炎和暴发性急性胃肠炎的主要病原体之一。1972年, Kapikian 等<sup>[1]</sup>在美国俄亥俄州诺瓦克镇小学暴发的急性胃肠炎患者粪便标本中发现一种新型病毒颗粒, 命名为诺瓦克病毒 (Norwalk virus)。此后, 世界各地陆续自胃肠炎患者粪便中分离出多种形态相似的病毒颗粒。2002年, 第八届国际病毒命名委员会正式将形态与诺瓦克病毒相似, 但抗原性略异的病毒颗粒统一命名为诺如病毒 (NoV), 归属于杯状病毒科

(Caliciviridae)<sup>[2]</sup>。NoV 给社会带来了巨大的健康风险。据统计, 全球有超过 50% 的病毒性胃肠炎病例是由 NoV 引起的, 并且有超过 85% 的非细菌性胃肠炎与 NoV 相关。NoV 直接导致全球每年约 90 万人次的住院和 20 万人次的死亡。仅在美国, 每年就有约 2 100 万例由 NoV 感染造成的胃肠炎病例<sup>[3,4]</sup>。NoV 具有高度传染性且感染剂量较低, 通常 10~100 个病毒即可造成人感染<sup>[5]</sup>。在人口密集的环境, 如学校、餐馆、养老院和医院等全封闭或半封闭机构中急性胃肠炎的暴发最为常见<sup>[6]</sup>。NoV 的潜伏期多在 1~2 天, 感染的临床特征包括恶心、呕吐、腹痛、发热和腹泻, 儿童患者呕吐普遍, 成人患者腹泻为多。症状通常持续 2~4 天, 通常较轻并具有自限性, 但对于幼儿、老年人和免疫功能缺陷患者易发生严重的并发症<sup>[7]</sup>。

收稿日期: 2019-09-27; 修回日期: 2019-11-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81420108027, 81573347); 山东省重点研发计划 (2017CXGC1401, 2019JZZY021011).

\*通讯作者 Tel: 86-531-88382005,

E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0783

## 1 诺如病毒简介

### 1.1 病原学

作为杯状病毒科 (Caliciviridae) 家族的一员, NoV 是无包膜的二十面体对称球形, 它是单股正链的 RNA 病毒, 直径为 27~35 nm, 全长约 7.4~7.7 kb。基因组包括 3 个开放阅读框 (open reading frames, 即 ORF1、ORF2、ORF3, 图 1)<sup>[8]</sup>。ORF1 主要编码非结构蛋白, 其经蛋白酶水解后产生 6 个功能蛋白, 主要包括: P48 或 NS1-2、NTPase 或 NS3、P22 或 NS4、基因组连接病毒蛋白 (VPg) 或 NS5、NS6<sup>pro</sup> 或 NS6 和 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 或 NS7<sup>[9]</sup>。ORF2 和 ORF3 分别编码主要结构蛋白 (VP1) 和次要结构蛋白 (VP2)。VP1 是分子质量约 60 kDa 的病毒衣壳蛋白, 包括两个区域: 壳区 (shell domain, S 区) 和突出区 (protruding domain, P 区), 其中 S 区形成病毒内壳, P 区可介导病毒与人类组织血型抗原受体 (human histo-blood group antigens, HBGAs) 的结合。VP2 分子质量约 23 kDa, 有研究显示 VP2 可帮助重组 NoV 颗粒, 有助于整个衣壳蛋白的稳定<sup>[10,11]</sup>。



Figure 1 Structure of norovirus genome

NoV 的遗传基因和抗原性呈高度多样性, 根据其基因特征主要分为 5 个不同的基因组 (genogroups), 每一基因组包含多种基因型 (genotypes), 同一基因型病毒又有不同的变异株。在 NoV 的 5 个基因组中, GI、GII 和 GIV 组可感染人和其他灵长类动物, GIII、GV 组分别感染猪和奶牛<sup>[12,13]</sup>。其中 GII NoV 造成了全球 80% 至 90% 的 NoV 感染, 该基因组的第四基因型 (GII.4 型) 则是造成 NoV 感染的主要原因 (约 70%)<sup>[14]</sup>。流行病学研究表明, GII.4 菌株会经历周期性进化, 每 2~4 年就有新变异株出现并流行<sup>[15]</sup>。

### 1.2 诺如感染模型的研究

NoV 是有物种特异性的, 人诺如病毒 (human norovirus, HuNoV) 只能感染人类并导致人类患病, 而不能在小鼠或其他小型动物体内繁殖扩增, 这极大地限制了抗 NoV 药物和疫苗评价模型的建立。

研究发现, 感染鼠诺如病毒 (MNV) 的小鼠体内树突细胞和巨噬细胞会大量复制, 因此推测 B 细胞是小鼠 NoV 的敏感细胞<sup>[16]</sup>, 随后科学家便尝试在体外用 HuNoV 感染人 B 细胞。2014 年, Jones 等<sup>[17]</sup>使用 HuNoV GII.4-sydney 株成功感染人 B 细胞, 并指出人类组织血型抗原 (HBGAs) 对感染起到辅助作用, 然而 HuNoV 在此模型中复制效率较低。2016 年, Ettayebi 等<sup>[18]</sup>成功

在源自人干细胞的类肠道组织培养物中培养了 HuNoV, 并且揭示了胆汁可以增强 GII.4 病毒的复制能力, 而其他毒株只在胆汁存在的情况下才可复制。然而, 人肠道组织来源有限, 无法满足病毒的大规模培养及疫苗生产, 在广泛运用于抗病毒筛选和开发前还需要进一步优化。此外, 基于 NoV 原型株诺瓦克病毒 (Norwalk virus, GI.1) 的亚基因组复制子体系也被用来评估抗 HuNoV 候选物。Norwalk 复制子可在 Huh-7 细胞或 BHK-21 细胞中自我复制并稳定表达, 它的建立进一步拓宽了 NoV 细胞培养体系的范围, 在抗病毒药物筛选和抗体评价方面具有重要意义<sup>[19]</sup>。

迄今为止已有部分动物模型用于扩增 HuNoV。Cheetham 等<sup>[20]</sup>用 HuNoV GII.4 病毒株感染无菌猪, 可引起其轻度腹泻、返吐病毒, 并从其粪便中检测到 NoV, 且表现出特殊的免疫应答效应。也有报道称无菌小牛可以支持 HuNoV GII.4 基因型的感染<sup>[21]</sup>。除了无菌猪和无菌牛, 其他动物模型也被用于 HuNoV 研究, 包括非人类灵长类动物, 如黑猩猩、猕猴、恒河猴等<sup>[22-24]</sup>。但是, 由于临床疾病、肠道环境、微生物群等的明显差异, 目前仍无动物模型可完全模仿 HuNoV 感染。

此外, 一些与 NoV 类似性高的病毒也被科学家用来替代 NoV 进行相关的研究。其中, 能在猫肾细胞培养的猫杯状病毒 (feline calicivirus, FCV) 和能在小鼠巨噬细胞 RAW264.7 细胞系中培养的鼠诺如病毒是被最广泛应用的替代病毒<sup>[25,26]</sup>。

### 1.3 病毒复制周期和抗病毒靶点

由于缺乏合适和成熟的动物模型和体外细胞培养系统, 人们对 NoV 的认识进展缓慢, 目前尚无针对 NoV 的疫苗与抗病毒药物。但随着分子生物技术的发展, NoV 复制周期各个阶段的生物学过程不断被阐明, 新的药物靶点不断被发现。NoV 复制周期 (图 2) 主要包括: 吸附、侵入、基因组释放、翻译、病毒蛋白酶裂解病毒多蛋白产生成熟病毒蛋白、复制, 最后是组装和释放<sup>[27]</sup>。理论上, 阻断病毒复制周期的任何一个环节都可以实现抗病毒的目的。近年来, 在研发抗 NoV 药物方面取得了相当大的进展。本综述精选了具有代表性的研究实例, 总结了抗 NoV 药物新靶标及其小分子抑制剂的前沿进展, 为加快发现新的安全有效的抗 NoV 药物提供参考。

## 2 临床开发中的药物

迄今为止, 还没有批准用于治疗用途的抗 NoV 药物或疫苗, 唯一完成临床试验的候选药物是硝唑尼特 (nitazoxanide, NTZ, 1)。NTZ 能够抑制多种 RNA 和 DNA 病毒, 包括呼吸道合胞病毒 (RSV)、冠状病毒、轮状病毒 (RV)、乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒

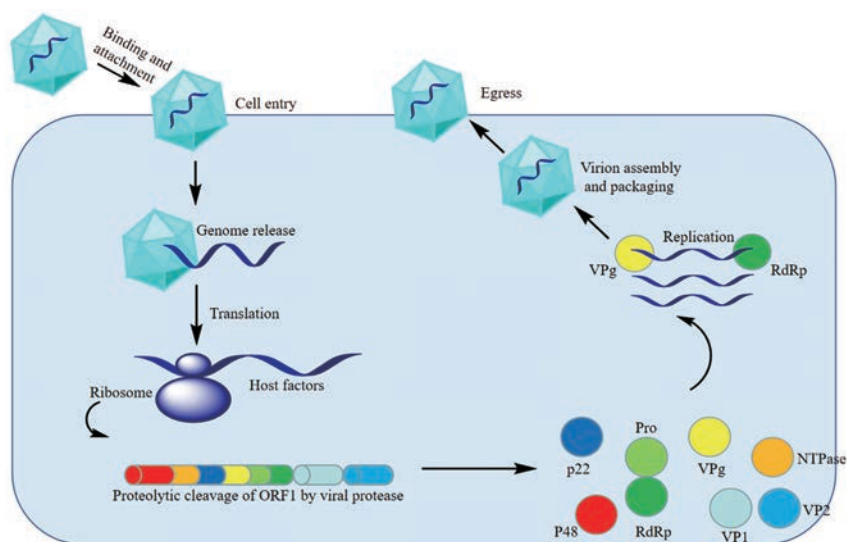
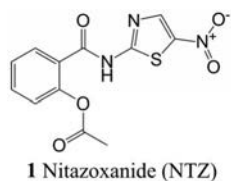


Figure 2 The replication cycle of norovirus

(HCV)、登革热病毒 (DENV) 和人类免疫缺陷病毒 (HIV) 等, 目前被 FDA 批准用于治疗贾第虫 (*Giardia*) 和隐孢子虫 (*Cryptosporidium*) 的感染<sup>[28]</sup>。NTZ 已被证实 在治疗 NoV 胃肠炎中有一定疗效, 它能够抑制 Norwalk 复制子 ( $EC_{50} = 1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[29,30]</sup>。尽管 NTZ 是治疗 NoV 感染的有效分子, 但其精确作用机制仍待阐明。



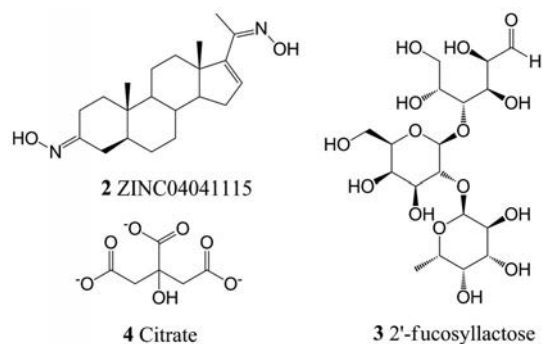
### 3 已知靶点药物

#### 3.1 吸附和侵入抑制剂

2002 年, Hutson 等<sup>[31]</sup>首次提出 NoV 感染与 ABO 血型抗原有关的假说。随后的研究发现, 肠道黏膜上的人类组织血型抗原 (HBGAs) 是 NoV 的病毒受体<sup>[32,33]</sup>。根据 NoV 通过 HBGAs 受体吸附侵袭和感染宿主这一原理, 可以设计阻断病毒和 HBGAs 相互作用的抗 NoV 药物。

2013 年, Zhang 等<sup>[34]</sup>基于酶联免疫吸附测定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 对 200 万个化合物进行了虚拟筛选。该方法利用 HuNoV VP1/HBGA 阻断试验来筛选能阻断病毒-受体相互作用的潜在分子。结果表明, 具有环戊烷- $\alpha$ -二甲基菲结构的化合物对 HBGA-NoV 结合具有有效的抑制作用 ( $IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。该系列中最有效的化合物是 ZINC04041115 (2,  $IC_{50}$  约为  $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。其他基于 ELISA 测定的 VLP 结合试验表明, 人乳寡糖 (human

milk oligosaccharides, HMOs) 中的 2'-岩藻糖基乳糖 (2'-fucosyllactose, 2'FL, 3) 和 3'-岩藻糖基乳糖 (3'-fucosyllactose, 3'FL) 在低浓度 ( $5.5\sim 30.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 下能够抑制 GII.10 NoV VLPs 与 HBGAs 的结合<sup>[35]</sup>。随后, 2'FL 也被证实可以抑制 GII.17 和 GI.1 VLPs 与 HBGAs 的结合,  $IC_{50}$  值分别是  $13\sim 20$  和  $38\sim 50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[36]</sup>。以类似的方式, 柠檬酸 (citrate, 4) 也被证明可以与 NoV GII.10 VLPs 结合导致其形态结构的改变, 从而阻止 VLP-HBGA 结合<sup>[37]</sup>。



单克隆抗体 (monoclonal antibodies, mAbs) 或纳米抗体 (nanobodies, Nbs) 的被动免疫疗法是另一种预防 NoV 附着和侵入的抗病毒策略, 通常采用阻断实验, 即检测 mAbs 或 Nbs 是否可以阻断 VLP 与受体的结合。在黑猩猩模型中, mAb D8 能够阻止 Norwalk 感染。但到目前为止, 产生的 mAbs 的交叉基因型活性有限, 这使得它们对抗原多样的 NoV 的抗病毒效果不佳<sup>[38]</sup>。最近, 已显示 Nbs 能够通过 与衣壳 P 结构域相互作用而对 VLPs 产生广泛的中和活性, 且它对特定抗原具有高度亲和力。其中最好的 NoV Nbs 是 Nb-85, 它

可阻止 GII.1、GII.2、GII.4、GII.12、GII.17 和 G1.11 VLPs 与 HBGAs 的结合。Nbs 显示的交叉基因型活性表明这些分子有潜力克服常规 mAbs 抗原谱较窄的缺点<sup>[39,40]</sup>。

### 3.2 聚合酶抑制剂

RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 对病毒的复制至关重要, 是极具吸引力的抗病毒靶点。NoV RdRp 位于 ORF1 C 端, 具有其他正链 RNA 病毒 RdRp 的结构特性和聚合酶共有的结构域, 有手指 (fingers)、手掌 (palm) 以及拇指 (thumb) 区域 (图 3), 主要负责合成负链 RNA 与大规模正链 RNA 的配对、翻译病毒衣壳蛋白并组装子代病毒<sup>[41]</sup>。靶向 RdRp 的抗病毒药物一般分为核苷类似物与非核苷类抑制剂。值得一提的是, 聚合酶抑制剂同样也是抗 HCV、HIV、疱疹病毒和 HBV 药物的重要组成部分<sup>[42-44]</sup>。

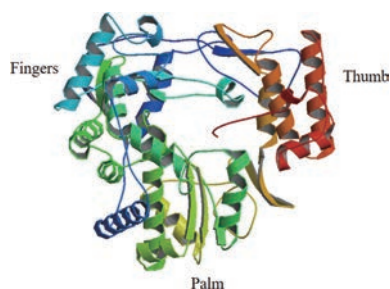


Figure 3 Structure of the norovirus polymerase, RdRp (PDB ID: 1SH2)

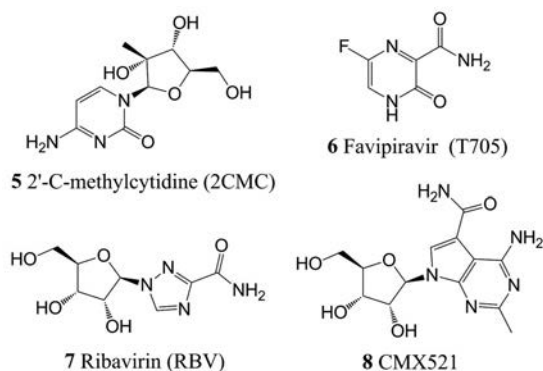
**3.2.1 核苷类似物** 核苷类似物 (nucleoside analogs, NAs) 作为天然底物的类似物, 通过发挥竞争性抑制作用和链终止作用来抑制 RNA 合成从而发挥抗病毒作用。由于 NAs 结合在高度保守的 RdRp 活性位点, 所以与非核苷抑制剂相比, 它们通常表现出广谱抗病毒活性。因此, 针对其他 RNA 病毒开发的 NAs 已被用于检测是否具有抗 NoV 活性。其中, 最初作为抗 HCV 的抗病毒药物 2'-C-甲基胞苷 (2'-C-methylcytidine, 2CMC, 5) 是研究最多的药物。尽管口服 2CMC 前药 valopicitabine 因胃肠道不良反应而停止用于 HCV<sup>[45]</sup>, 它仍被广泛报道为一种潜在的抗 NoV 药物。2012 年, Rocha-Pereira 等<sup>[46]</sup>发现 2CMC 可抑制 MNV RNA 的合成和 MNV 斑块的形成,  $EC_{50}$  值分别为 1.6 和  $2.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2016 年, Kolawole 等<sup>[47]</sup>发现 2CMC 能够抑制 HuNoV BJAB 细胞培养系统中的 HuNoV 复制 ( $EC_{50} = 0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。2CMC 在小鼠模型中也显示出潜在的抗 NoV 作用, 将缺乏 I 型 II 型干扰素受体的小鼠在感染 MNV 后按  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的剂量 1 天两次皮下注射 2CMC, 共 7 天, 发现小鼠肠道内 NoV 的复制和分泌明显减少, 并且小鼠的腹泻发病率和死亡率也有显著

的下降<sup>[47]</sup>。这些研究表明, 2CMC 很有可能成为治疗 NoV 感染和限制 NoV 蔓延的有效制剂。

法匹拉韦 (favipiravir, T705, 6) 作为一种广谱 NA, 最初是针对流感病毒开发的, 它还可以抑制其他多种病毒的复制, 包括黄病毒、沙粒病毒、汉坦病毒和埃博拉病毒等<sup>[48]</sup>。T705 作为嘌呤类似物, 它可以抑制 HuNoV 复制子 ( $EC_{50} = 21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[49]</sup>。然而, 由于这种药物存在致畸风险, 需要谨慎使用。

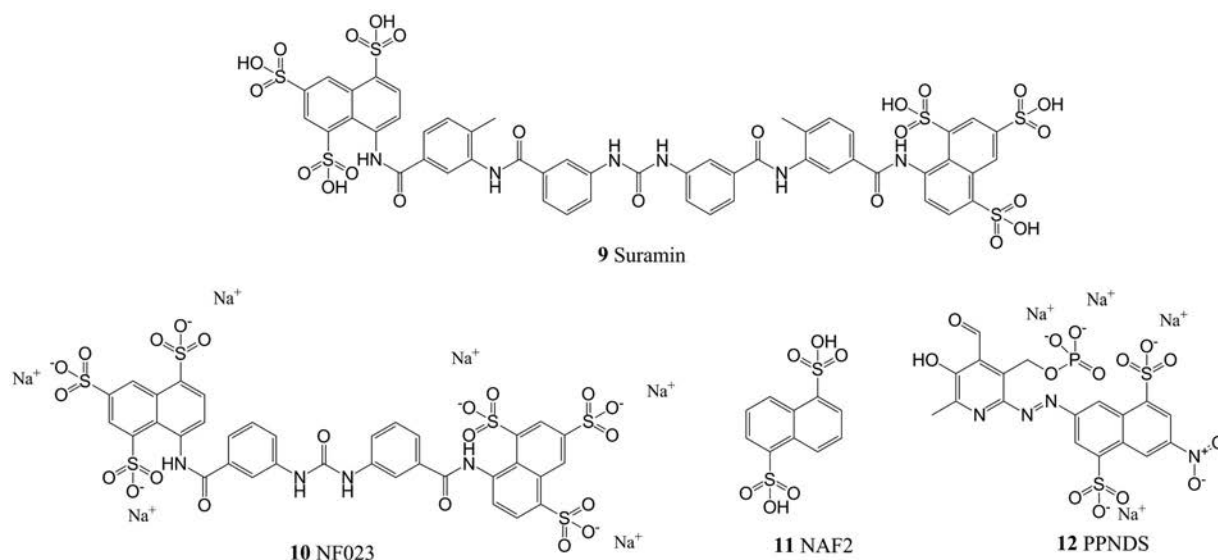
另一种广谱 NA 利巴韦林 (ribavirin, RBV, 7) 同样具有对多种 DNA 和 RNA 病毒的抗病毒活性, 已应用于临床治疗 HCV、RSV、戊型肝炎病毒 (HEV) 和拉沙热病毒等<sup>[50]</sup>。2007 年, RBV 被证明能够抑制 MNV ( $EC_{50} = 63.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Norwalk 复制子 ( $EC_{50} = 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[51]</sup>。2012 年, Alam 等<sup>[52]</sup>通过 MNV RdRp 的共结晶研究发现 RBV 的结合位点为聚合酶活性位点, 提示了 RBV 是作为聚合酶抑制剂发挥抗病毒作用的。

此外, CMX521 (8) 是通过高通量筛选发现的一种新型 NA。据报道, CMX521 是一个泛基因型、强效的抗 NoV 药物, 目前正处于 I 期临床的招募阶段, 以评估其安全性、耐受性和药代动力学性质。



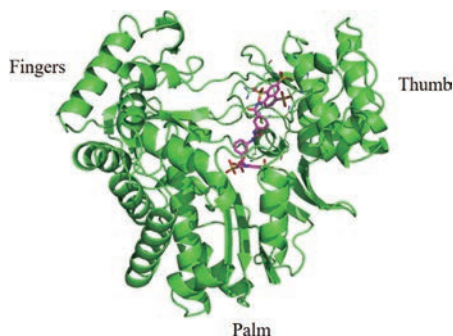
**3.2.2 非核苷抑制剂** 非核苷抑制剂 (non-nucleoside inhibitors, NNIs) 通常表现出窄谱抗病毒活性。目前, 在 NoV RdRp 上存在 3 个已知的 NNIs 结合位点: 第一个结合口袋位于手指和拇指区域之间的 NTP 访问路径内; 第二个口袋称为位点 A, 它是带有柔性氨基酸侧链的正电荷 NTP 通道; 第三个口袋称为位点 B, 它是位于拇指区域内的高度保守的变构结合口袋<sup>[53]</sup>。

苏拉明 (suramin, 9) 作为抗寄生虫药物, 是一个对称的聚阴离子萘基脲, 它能够有效地对抗 HIV 和 HBV。研究表明, 苏拉明能够在体外有效地抑制人和小鼠的 NoV 聚合酶,  $IC_{50}$  值分别为 24.6 和  $70.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同样, 作为苏拉明衍生物, NF023 (10) 也可抑制人和小鼠的 NoV RdRp,  $IC_{50}$  分别为 71.5 和  $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过 X 射线晶体学分析苏拉明和 NF023 与 MNV 聚合酶的详



细结合模式,发现这两个分子占据着手指和拇指结构域之间相同的结合位点,同样,这两个分子与 HuNoV 聚合酶的共结晶也显示它们的结合口袋都位于手指和拇指域之间(图4)<sup>[54]</sup>。苏拉明的另两个衍生物, NAF2 (**11**) 和 PPNDS (**12**) 也被证明能够抑制 HuNoV RdRp,  $IC_{50}$  值分别为 14 和  $0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , PPNDS 还可抑制 MNV RdRp,  $IC_{50}$  为  $0.88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[55]</sup>。

尽管苏拉明及其衍生物的抑酶活性较好,但这些化合物细胞通透性差,因此它们细胞水平 (RAW264.7 细胞) 的抗病毒效力大大降低,  $EC_{50}$  仅为  $0.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[56]</sup>。同样, PPNDS 在  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的噬斑测定中对 MNV 复制的抑制率仅为 20.5%。相比之下,同浓度的 PPNDS 对 RdRp 的抑制率可达 98.0%<sup>[53]</sup>。为进一步提高这些化合物的抗 NoV 活性,已有科学家开始尝试通过脂质体输送苏拉明来改善其细胞通透性。



**Figure 4** Structure of the norovirus polymerase, RdRp (PDB ID: 4NRT) bound to NF023

除苏拉明及其衍生物外,最近几年一些其他非核苷抑制剂也被发现具有抗 NoV 的功效。其中 Netzler 等<sup>[53]</sup> 通过荧光聚合酶试验评价了 6 种 HCV NNIs (filibuvir、

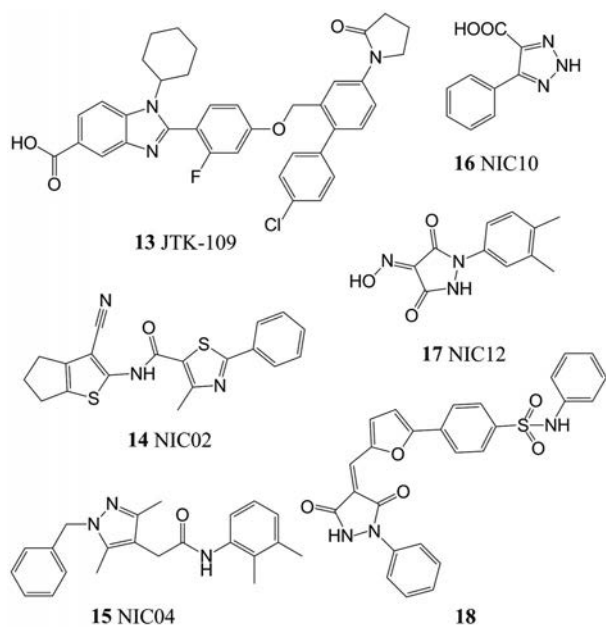
JTK-109、lomibuvir、nesbuvir、setrobuvir 和 tegobuvir) 对 HuNoV RdRp 的抗病毒活性。结果发现,除 JTK-109 (**13**) 外,其他化合物的  $IC_{50}$  均超过  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。JTK-109 属于广谱抗病毒分子,它具有抑制 HuNoV 聚合酶的活性 ( $IC_{50} = 4.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),在细胞水平也具有抑制 MNV 复制的活性 ( $EC_{50} = 6.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

2013 年, Eltahla 等<sup>[57]</sup> 通过先前建立的 HCV 聚合酶模型对 2 万个化合物进行了高通量筛选。其中, 4 个化合物 NIC02 (**14**)、NIC04 (**15**)、NIC10 (**16**)、NIC12 (**17**) 可抑制 HuNoV 聚合酶,  $IC_{50}$  值在  $5.0 \sim 9.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间,并且也可抑制细胞培养物中的 Norwalk 复制子和 MNV 复制,  $EC_{50}$  值分别为  $30.1 \sim >100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $4.8 \sim 38.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。有报道称, NIC02、NIC04 与 HuNoV RdRp 的结合位点可能与 NIC10、NIC12 不同,尚需进一步证实。

此外, Ferla 等<sup>[58]</sup> 对 30 万种市售化合物进行虚拟筛选,从中筛选并评估了 62 个化合物对 HuNoV RdRp 的抑制作用,并对活性较好的化合物进行了衍生。其中化合物 **18** 可以抑制 HuNoV RdRp ( $IC_{50} = 5.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 MNV RdRp ( $IC_{50} = 12.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 成为新的抗 NoV 先导化合物。

### 3.3 蛋白酶抑制剂

近年来,病毒蛋白酶作为抗病毒药物靶标引起了人们的广泛关注。与 RdRp 类似, NoV 蛋白酶 (NS6) 也是一个理想的抗 NoV 靶点,它是一种半胱氨酸蛋白酶,其活性位点由催化三联体组成,包括半胱氨酸、组氨酸和谷氨酸<sup>[11]</sup>。NoV 多蛋白的蛋白水解发生在 5 个位点,其中裂解位点 (P1 和 P1') 的 N 端 (P5 至 P2) 和 C 端 (P2' 至 P5') 的氨基酸组成如图 5 所示。NoV 蛋白酶在非结构性多元蛋白前体加工过程起着重要的作

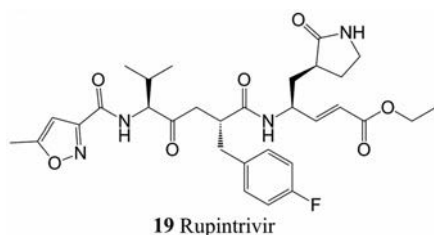


用,是病毒复制的关键。芦平曲韦 (rupintrivir, **19**) 是第一代的 NoV 蛋白酶抑制剂,最初是作为抗人鼻病毒 (human rhinovirus) 抑制剂开发的。2011 年, Kim 等<sup>[59]</sup>发现芦平曲韦对其他小核糖核酸病毒、冠状病毒和杯状病毒具有广谱抗病毒活性。随后的一些研究也证实了这些结果,并显示芦平曲韦能够抑制 Norwalk 复制子 ( $EC_{50} = 1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )<sup>[60]</sup>。然而,芦平曲韦的药代动力学性质和生物利用度需要进一步的提高<sup>[61]</sup>。

Diagram showing cleavage sites 1-5 on the NoV protease structure, with corresponding amino acid residues: Q/G, Q/G, E/G, E/A, E/G.

Site	P4	P3	P2	P1	P1'	P2'	P3'	P4'
1	F	H	L	Q	G	P	E	D
2	F	Q	L	Q	G	P	T	Y
3	A	V	P	E	G	K	N	K
4	I	N	F	E	A	P	P	T
5	T	A	L	E	G	G	D	K

Figure 5 Six functional proteins cleaved by NoVPro and the peptide sequences of the five cleavage sites



其余的 NoV 蛋白酶抑制剂可分为过渡态模拟物和过渡态抑制剂。其中,过渡态模拟物包括  $\alpha$ -羟基膦酸盐 ( $\alpha$ -hydroxyphosphonates, **20**),它在低微摩尔浓度

下能够有效地抑制 Norwalk 复制子<sup>[62]</sup>。虽然其效力高,但相比之下,对它的研究远少于过渡态抑制剂。第一类过渡态抑制剂是一系列肽基醛,其结构含有谷氨酰胺替代物,在这些肽基醛中,化合物 **21** 可同时抑制 MNV ( $EC_{50} = 5.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 Norwalk 复制子 ( $EC_{50} = 2.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。随后,进一步的研究总结出肽基醛类化合物的构效关系:① 强效的 NoV 蛋白酶抑制剂要求有醛基作为 P1 的亲电体;② *N,N*-二取代谷氨酰胺是最有利的 P1 侧链;③ 苯丙氨酸或亮氨酸对 P2 有利,而脯氨酸不利于活性<sup>[63]</sup>。在此之后,更多的衍生物被开发出来,包括:二肽基醛类 (例如化合物 **22**)、三肽基醛类 (例如 syc-10, **23**)、 $\alpha$ -酮基酰胺肽类 (例如化合物 **24**)、 $\alpha$ -酮杂环类 (例如化合物 **25**)、亚硫酸氢盐加合物类 (例如 GC376, **26**) 以及双亚硫酸盐加合物的酯或氨基甲酸酯前药 (例如化合物 **27**)<sup>[64-68]</sup>。与最初的肽基醛抑制剂相比,这些衍生物都显示出同等或更高水平的抗病毒活性。

为了提高上述过渡态抑制剂的膜渗透性和口服生物利用度,一些对 Norwalk 复制子具有抑制作用的大环化合物被设计出来 ( $EC_{50}$  值最低为  $1.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 例如化合物 **28**),此外噁二唑类 ( $EC_{50} = 2.5 \sim 51.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 如化合物 **29**)、噁唑烷酮类 ( $EC_{50} = 6.7 \sim 17.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 如化合物 **30**)、三唑类 ( $EC_{50} = 3.8 \sim 88.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 如化合物 **31**) 也显示出一定的抑制作用<sup>[69-72]</sup>,化合物 **29** 和 NoV 蛋白酶的分子对接图 (图 6) 显示除了 Ala160、Gln110 和 Ala158 与抑制剂之间存在多个氢键外,抑制剂与 His157 和 Thr134 残基也存在氢键作用。尽管这些大环过渡态抑制剂活性并不显著,但是它们显示出类似于芦平曲韦的广谱抗病毒活性<sup>[73]</sup>。总而言之,针对 NoV 蛋白酶的蛋白酶抑制剂是治疗 NoV 感染的一类有前景的抗病毒候选物。

### 3.4 作用于宿主因子的化合物

随着直接抗病毒药物 (direct-acting antiviral agents, DAAs) 临床应用的增加,耐药问题日益突出,尤其是具有低耐药屏障的非核苷抑制剂和蛋白酶抑制剂。与 DAAs 相比,靶向宿主的抗病毒药物通常具有更高的耐药屏障,并且该类药物可以靶向与病毒直接相互作用或辅助病毒复制的关键蛋白,具有较好的抗病毒效力,成为治疗 NoV 感染的重要类型<sup>[74]</sup>。

**3.4.1 蛋白质靶标** 最近,靶向宿主的抗 NoV 药物去泛素化酶 (deubiquitinase, DUB) 抑制剂成为研究热点。DUB 是一类参与调节泛素-蛋白酶体系统的酶,该系统通常被病毒利用以进行复制<sup>[75,76]</sup>。WP1130 (**32**) 是一个合成的 DUB 小分子抑制剂,它通过诱导未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR) 来有效

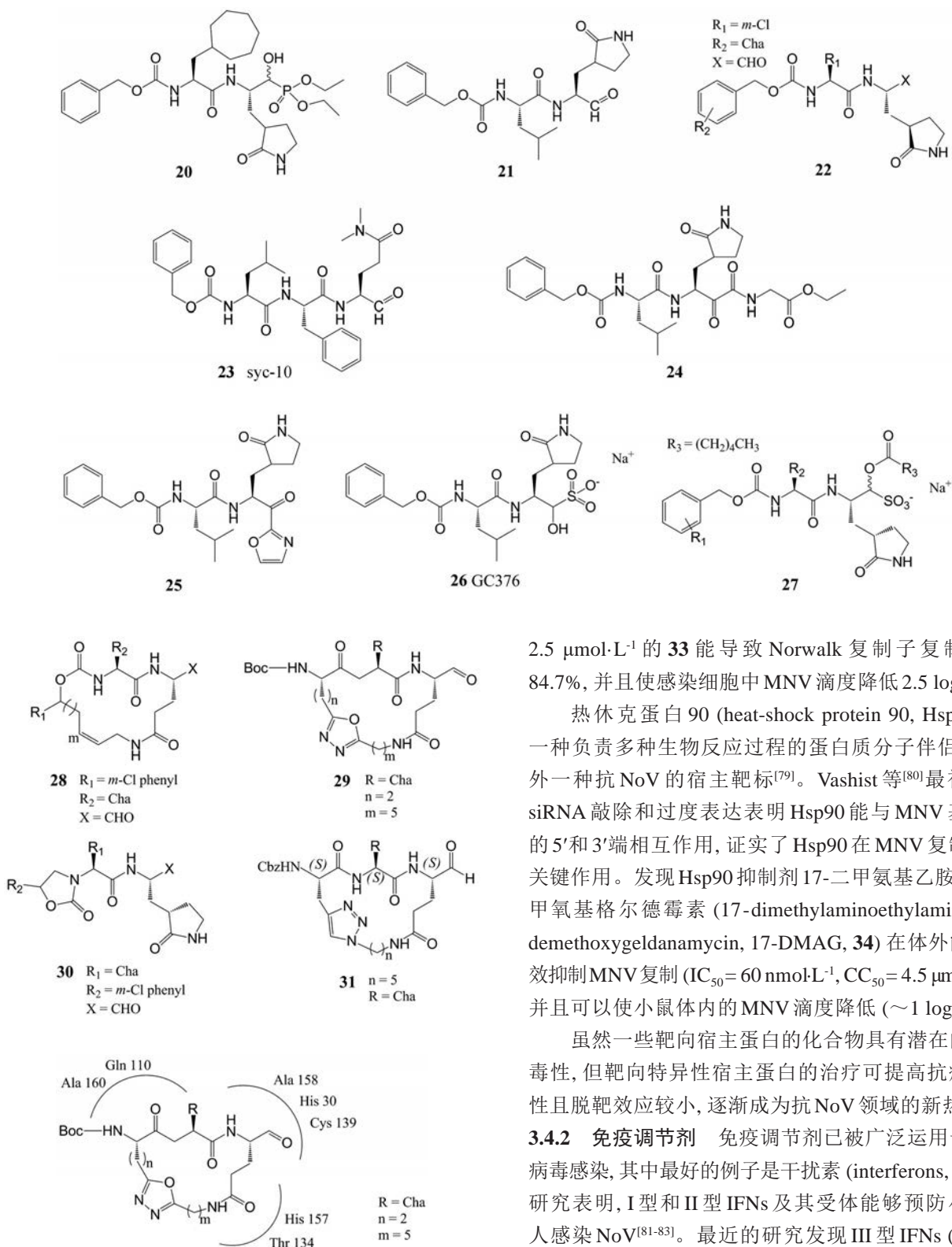


Figure 6 The binding mode of **29** to NoV 3CL<sup>Pro</sup>

地抑制 NoV 的复制。然而 WP1130 的生物利用度较差, 它仅在小鼠小肠中表现出对 MNV 的抑制作用<sup>[77]</sup>。为了解决其生物利用度差的问题, 科学家对 WP1130 进行修饰得到了 59 种衍生物, 其中化合物 **33** 最有效。

2.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 **33** 能导致 Norwalk 复制子复制减少 84.7%, 并且使感染细胞中 MNV 滴度降低 2.5  $\log$ <sup>[78]</sup>。

热休克蛋白 90 (heat-shock protein 90, Hsp90) 是一种负责多种生物反应过程的蛋白质分子伴侣, 是另外一种抗 NoV 的宿主靶标<sup>[79]</sup>。Vashist 等<sup>[80]</sup>最初使用 siRNA 敲除和过度表达表明 Hsp90 能与 MNV 基因组的 5' 和 3' 端相互作用, 证实了 Hsp90 在 MNV 复制中的关键作用。发现 Hsp90 抑制剂 17-二甲氨基乙胺-17-去甲氧基格尔德霉素 (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin, 17-DMAG, **34**) 在体外能够有效抑制 MNV 复制 ( $\text{IC}_{50} = 60 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\text{CC}_{50} = 4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并且可以使小鼠体内的 MNV 滴度降低 ( $\sim 1 \log$ )。

虽然一些靶向宿主蛋白的化合物具有潜在的细胞毒性, 但靶向特异性宿主蛋白的治疗可提高抗病毒活性且脱靶效应较小, 逐渐成为抗 NoV 领域的新热点。

**3.4.2 免疫调节剂** 免疫调节剂已被广泛运用于治疗病毒感染, 其中最好的例子是干扰素 (interferons, IFNs)。研究表明, I 型和 II 型 IFNs 及其受体能够预防小鼠和人感染 NoV<sup>[81-83]</sup>。最近的研究发现 III 型 IFNs (IFN- $\lambda$ ) 也有抗 NoV 感染的作用, IFN- $\lambda$  可以诱导细胞表达许多由 I 型和 II 型 IFNs 诱导表达的共同基因<sup>[84-86]</sup>。然而, 与 I 型和 II 型 IFNs 不同的是, 单剂量的 IFN- $\lambda$  (1  $\mu\text{g}$ ) 可预防和清除小鼠持续的 MNV 感染并且 IFN- $\lambda$  可靶向非造血细胞和肠上皮细胞<sup>[87]</sup>。在 MNV 传播模型中, 内源性 IFN- $\lambda$  可阻止感染急性 CW3 MNV 的小鼠的



粒 (virus-like particle, VLP) 及 P 粒子 (P particle) 为代表的 NoV 疫苗成为主要研发方向。

### 5.1 VLP 疫苗

NoV VP1 蛋白可在体外表达并能自行组装成病毒样颗粒 (VLPs), 其形状和免疫原性与天然 NoV 十分相似, 且能诱导出较高水平的抗体反应<sup>[101]</sup>, 可应用于疫苗的研发。2009 年, El-Kamary 等<sup>[102]</sup>研制出第一批包含局部佐剂的 VLP 疫苗, 可对同源性感染诱导产生足够的临床保护。此外, 考虑到 NoV 不同基因型之间交叉保护力弱, 很多研究者致力于研发含主要流行型的多价 VLP 疫苗。2011 年, Treanor 等<sup>[103]</sup>开展了 GI.1 和 GII.4 双价疫苗的安全性和免疫原性临床试验, 结果显示该双价疫苗具有良好的安全性和免疫原性。

### 5.2 P 颗粒疫苗

相比 VLP 疫苗, P 颗粒疫苗更易于构建, 因为它易于表达、成本低、免疫原性高并且可以减少一些无关抗体的产生, 进而减少不良反应。Tan 等<sup>[104]</sup>进行着 P 粒子和轮状病毒 VP8 抗原嵌合疫苗的研发, 以专门针对儿童、老人或免疫功能缺陷患者等特殊群体。现有的研究显示 P 颗粒疫苗可诱导实验动物产生与 VLP 疫苗相近的免疫原性和保护效果, 它已经成为近年来继 VLP 疫苗外另一 NoV 疫苗的研究热点。

此外, 减毒活疫苗因其高免疫性也受到了人们越来越多的关注和重视。尽管遗传宿主的可变性、基因型组的多样性和病毒的持续进化都干扰着 NoV 疫苗的研发, 但随着分子检测技术的不断进步和体外感染模型的逐步完善, 相信一定能够研制出一种安全、有效且可持续的 NoV 疫苗。

## 6 总结与展望

作为引起全球病毒性胃肠炎和腹泻的最主要病原体, NoV 在人群的流行和感染越来越频繁, 受到越来越多的关注和重视。尽管现在还没有有效的抗病毒药物和疫苗来预防和治疗 NoV 感染, 但相关研究从未停止。本文通过对抗 NoV 病毒的药物靶点、小分子抑制剂及疫苗研究进展的总结, 以期发现安全有效, 具有临床应用价值的抗 NoV 药物。

目前, 对已上市或未获批准的抗病毒药物进行新应用的重新开发和探索, 很多原先针对其他病毒开发的药物也被发现具有抗 NoV 的功效。此外, 基于化合物库的计算机辅助药物筛选方法如高通量筛选、虚拟筛选等也被广泛运用于发现抗 NoV 候选物。近年来, 在研发抗 NoV 药物方面取得了较大的进展, 包括通过阻断病毒-受体相互作用, 抑制病毒聚合酶、蛋白酶等, 其中阻断 HBGA 结合、抑制 RdRp 是目前研究的主要方向。另外靶向必需宿主因子的药物、干扰素, 还有一

些未知靶点药物也逐步发现具有抗 NoV 功效。从天然产物中寻找具有抗 NoV 活性的化合物也成为发现抗 NoV 先导化合物的重要途径。同时, 以 VLP 为主要方向的疫苗研究前景广阔。

随着人们对 NoV 基因组结构和发病机制研究的日益深入, B 细胞和肠上皮干细胞培养系统的完善, NoV 受体的发现和证实, 分子克隆、基因重组等新技术的飞速发展, 抗 NoV 药物的研发提升到一个新的平台。而深入研究 NoV 特性和复制机制, 完善 NoV 感染模型, 将会是抗 NoV 药物研究取得实质性突破的关键。

## References

- [1] Kapikian AZ, Wyatt RG, Dolin R, et al. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis [J]. *J Virol*, 1972, 10: 1075-1081.
- [2] Vinjé J. Advances in laboratory methods for detection and typing of norovirus [J]. *J Clin Microbiol*, 2015, 53: 373-381.
- [3] Patel MM, Widdowson MA, Glass RI, et al. Systematic literature review of role of Noroviruses in sporadic gastroenteritis [J]. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14: 1224-1231.
- [4] Ramani S, Atmar RL, Estes MK. Epidemiology of human Noroviruses and updates on vaccine development [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014, 30: 25-33.
- [5] Green KY. Norovirus infection in immunocompromised hosts [J]. *Clin Microbiol Infect*, 2014, 20: 717-723.
- [6] Harris JP, Lopman BA, O'Brien SJ. Infection control measures for norovirus: a systematic review of outbreaks in semi-enclosed settings [J]. *J Hosp Infect*, 2010, 74: 1-9.
- [7] Atmar RL, Estes MK. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14: 15-37.
- [8] Thorne L, Arias A, Goodfellow I. Advances toward a Norovirus antiviral: from classical inhibitors to lethal mutagenesis [J]. *J Infect Dis*, 2016, 213: S27-S31.
- [9] Xi JN, Graham DY, Wang KN, et al. Norwalk virus genome cloning and characterization [J]. *Science*, 1990, 250: 1580-1583.
- [10] Hardy ME. Norovirus protein structure and function [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2005, 253: 1-8.
- [11] Prasad BV, Shanker S, Muhaxhiri Z, et al. Antiviral targets of human noroviruses [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 18: 117-125.
- [12] Kageyama T, Shinohara M, Uchida K, et al. Coexistence of multiple genotypes, including newly identified genotypes, in outbreaks of gastroenteritis due to norovirus in Japan [J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42: 2988-2995.
- [13] Zheng DP, Ando T, Fankhauser RL, et al. Norovirus classification and proposed strain nomenclature [J]. *Virology*, 2006, 346: 312-323.

- [14] Hoa Tran TN, Trainor E, Nakagomi T, et al. Molecular epidemiology of Noroviruses associated with acute sporadic gastroenteritis in children: global distribution of genogroups, genotypes and GII.4 variants [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56: 185-193.
- [15] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Emergence of new Norovirus strain GII.4 Sydney--United States, 2012 [J]. *Morb Mortal Wkly Rep*, 2013, 62: 55.
- [16] Mumphrey SM, Changotra H, Moore TN, et al. Murine norovirus 1 infection is associated with histopathological changes in immunocompetent hosts, but clinical disease is prevented by STAT1-dependent interferon responses [J]. *J Virol*, 2007, 81: 3251-3263.
- [17] Jones MK, Watanabe M, Zhu S, et al. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells [J]. *Science*, 2014, 346: 755-759.
- [18] Ettayebi K, Crawford SE, Murakami K, et al. Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids [J]. *Science*, 2016, 353: 1387-1393.
- [19] Chang KO, Sosnovtsev SV, Belliot G, et al. Stable expression of a Norwalk virus RNA replicon in a human hepatoma cell line [J]. *Virology*, 2006, 353: 463-473.
- [20] Cheetham S, Souza M, Meulia T, et al. Pathogenesis of a genogroup II human norovirus in gnotobiotic pigs [J]. *J Virol*, 2006, 80: 10372-10381.
- [21] Souza M, Azevedo MS, Jung K, et al. Pathogenesis and immune responses in gnotobiotic calves after infection with the genogroup II.4-HS66 strain of human norovirus [J]. *J Virol*, 2008, 82: 1777-1786.
- [22] Bok K, Parra GI, Mitra T, et al. Chimpanzees as an animal model for human norovirus infection and vaccine development [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108: 325-330.
- [23] Rockx BH, Bogers WM, Heeney JL, et al. Experimental norovirus infections in non-human primates [J]. *J Med Virol*, 2005, 75: 313-320.
- [24] Farkas T. Natural norovirus infections in Rhesus Macaques [J]. *Emerg Infect Dis*, 2016, 22: 1272-1274.
- [25] Vashist S, Bailey D, Putics A, et al. Model systems for the study of human norovirus Biology [J]. *Future Virol*, 2009, 4: 353-367.
- [26] Karst SM, Wobus CE, Lay M, et al. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus [J]. *Science*, 2003, 299: 1575-1578.
- [27] Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, White PA. Norovirus antivirals: where are we now? [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39: 860-886.
- [28] Rossignol JF. Nitazoxanide: a first-in-class broad-spectrum antiviral agent [J]. *Antiviral Res*, 2014, 110: 94-103.
- [29] Rossignol JF, El-Gohary YM. Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2006, 24: 1423-1430.
- [30] Siddiq DM, Koo HL, Adachi JA, et al. Norovirus gastroenteritis successfully treated with nitazoxanide [J]. *J Infect*, 2011, 63: 394-397.
- [31] Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, et al. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type [J]. *J Infect Dis*, 2002, 185: 1335-1337.
- [32] Tan M, Hegde RS, Jiang X. The P domain of Norovirus capsid protein forms dimer and binds to histo-blood group antigen receptors [J]. *J Virol*, 2004, 78: 6233-6242.
- [33] Choi JM, Hutson AM, Estes MK, et al. Atomic resolution structural characterization of recognition of histo-blood group antigens by Norwalk virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 9175-9180.
- [34] Zhang XF, Tan M, Chhabra M, et al. Inhibition of histo-blood group antigen binding as a novel strategy to block Norovirus infections [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e69379.
- [35] Weichert S, Koromyslova A, Singh BK, et al. Structural basis for norovirus inhibition by human milk oligosaccharides [J]. *J Virol*, 2016, 90: 4843-4848.
- [36] Koromyslova A, Tripathi S, Morozov V, et al. Human norovirus inhibition by a human milk oligosaccharide [J]. *Virology*, 2017, 508: 81-89.
- [37] Koromyslova AD, White PA, Hansman GS. Treatment of norovirus particles with citrate [J]. *Virology*, 2015, 485: 199-204.
- [38] Chen Z, Sosnovtsev SV, Bok K, et al. Development of Norwalk virus-specific monoclonal antibodies with therapeutic potential for the treatment of Norwalk virus gastroenteritis [J]. *J Virol*, 2013, 87: 9547-9557.
- [39] Koromyslova AD, Hansman GS. Nanobodies targeting norovirus capsid reveal functional epitopes and potential mechanisms of neutralization [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006636.
- [40] Koromyslova AD, Hansman GS. Nanobody binding to a conserved epitope promotes norovirus particle disassembly [J]. *J Virol*, 2015, 89: 2718-2730.
- [41] Ng KK, Pendas-Franco N, Rojo J, et al. Crystal structure of Norwalk virus polymerase reveals the carboxyl terminus in the active site cleft [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 16638-16645.
- [42] Eltahla AA, Luciani F, White PA, et al. Inhibitors of the hepatitis C virus polymerase; mode of action and resistance [J]. *Viruses*, 2015, 7: 5206-5224.
- [43] Fung J, Lai CL, Seto WK, et al. Nucleoside/nucleotide analogues in the treatment of chronic hepatitis B [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66: 2715-2725.
- [44] De Clercq E. The nucleoside reverse transcriptase inhibitors, nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors, and protease inhibitors in the treatment of HIV infections (AIDS) [J]. *Adv Pharmacol*, 2013, 67: 317-358.
- [45] Gardelli C, Attenui B, Donghi M, et al. Phosphoramidate prodrugs of 2'-C-methylcytidine for therapy of hepatitis C virus infection [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 5394-5407.
- [46] Rocha-Pereira J, Jochmans D, Debing Y, et al. The viral poly-

- merase inhibitor 2'-C-methylcytidine inhibits Norwalk virus replication and protects against norovirus-induced diarrhea and mortality in a mouse model [J]. *J Virol*, 2013, 87: 11798-11805.
- [47] Kolawole AO, Rocha-Pereira J, Elftman MD, et al. Inhibition of human norovirus by a viral polymerase inhibitor in the B cell culture system and in the mouse model [J]. *Antiviral Res*, 2016, 132: 46-49.
- [48] Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor [J]. *Antiviral Res*, 2013, 100: 446-454.
- [49] Jin Z, Tucker K, Lin X, et al. Biochemical evaluation of the inhibition properties of favipiravir and 2'-C-methyl-cytidine triphosphates against human and mouse norovirus RNA polymerases [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 7504-7516.
- [50] Snell NJ. Ribavirin--current status of a broad spectrum antiviral agent [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2001, 2: 1317-1324.
- [51] Chang KO, George DW. Interferons and ribavirin effectively inhibit Norwalk virus replication in replicon-bearing cells [J]. *J Virol*, 2007, 81: 12111-12118.
- [52] Alam I, Lee JH, Cho KJ, et al. Crystal structures of murine norovirus-1 RNA-dependent RNA polymerase in complex with 2-thiouridine or ribavirin [J]. *Virology*, 2012, 426: 143-151.
- [53] Netzler NE, Enosi Tuipulotu D, Eltahla AA, et al. Broad-spectrum non-nucleoside inhibitors for caliciviruses [J]. *Antiviral Res*, 2017, 146: 65-75.
- [54] Mastrangelo E, Pezzullo M, Tarantino D, et al. Structure-based inhibition of Norovirus RNA-dependent RNA polymerases [J]. *J Mol Biol*, 2012, 419: 198-210.
- [55] Tarantino D, Pezzullo M, Mastrangelo E, et al. Naphthalene-sulfonate inhibitors of human norovirus RNA-dependent RNA-polymerase [J]. *Antiviral Res*, 2014, 102: 23-28.
- [56] Mastrangelo E, Mazzitelli S, Fabbri J, et al. Delivery of suramin as an antiviral agent through liposomal systems [J]. *ChemMedChem*, 2014, 9: 933-939.
- [57] Eltahla AA, Lim KL, Eden JS, et al. Nonnucleoside inhibitors of norovirus RNA polymerase: scaffolds for rational drug design [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 3115-3123.
- [58] Ferla S, Netzler NE, Ferla S, et al. In silico screening for human norovirus antivirals reveals a novel non-nucleoside inhibitor of the viral polymerase [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 4129.
- [59] Kim Y, Lovell S, Tiew KC, et al. Broad-spectrum antivirals against 3C or 3C-like proteases of picornaviruses, noroviruses, and coronaviruses [J]. *J Virol*, 2012, 86: 11754-11762.
- [60] Kitano M, Hosmillo M, Emmott E, et al. Selection and characterization of rupintrivir-resistant Norwalk virus replicon cells *in vitro* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e00201-00218.
- [61] Hayden FG, Turner RB, Gwaltney JM, et al. Phase II, randomized, double-blind, placebo-controlled studies of rupintrivir nasal spray 2-percent suspension for prevention and treatment of experimentally induced rhinovirus colds in healthy volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47: 3907-3916.
- [62] Mandadapu SR, Gunnam MR, Galasiti Kankanamalage AC, et al. Potent inhibition of norovirus by dipeptidyl  $\alpha$ -hydroxyphosphonate transition state mimics [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 5941-5944.
- [63] Tiew KC, He G, Aravapalli S, et al. Design, synthesis, and evaluation of inhibitors of Norwalk virus 3C protease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 5315-5319.
- [64] Galasiti Kankanamalage AC, Kim Y, Weerawarna PM, et al. Structure-guided design and optimization of dipeptidyl inhibitors of norovirus 3CL protease. Structure-activity relationships and biochemical, X-ray crystallographic, cell-based, and *in vivo* studies [J]. *J Med Chem*, 2015, 58: 3144-3155.
- [65] Muhaxhiri Z, Deng L, Shanker S, et al. Structural basis of substrate specificity and protease inhibition in Norwalk virus [J]. *J Virol*, 2013, 87: 4281-4292.
- [66] Mandadapu SR, Weerawarna PM, Gunnam MR, et al. Potent inhibition of norovirus 3CL protease by peptidyl  $\alpha$ -ketoamides and  $\alpha$ -ketoheterocycles [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 4820-4826.
- [67] Mandadapu SR, Gunnam MR, Tiew KC, et al. Inhibition of norovirus 3CL protease by bisulfite adducts of transition state inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 62-65.
- [68] Galasiti Kankanamalage AC, Kim Y, Rathnayake AD, et al. Design, synthesis, and evaluation of novel prodrugs of transition state inhibitors of norovirus 3CL protease [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 6239-6248.
- [69] Damalanka VC, Kim Y, Alliston KR, et al. Oxadiazole-based cell permeable macrocyclic transition state inhibitors of norovirus 3CL protease [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 1899-1913.
- [70] Damalanka VC, Kim Y, Galasiti Kankanamalage AC, et al. Design, synthesis, and evaluation of a novel series of macrocyclic inhibitors of norovirus 3CL protease [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 127: 41-61.
- [71] Damalanka VC, Kim Y, Galasiti Kankanamalage AC, et al. Structure-guided design, synthesis and evaluation of oxazolidinone-based inhibitors of norovirus 3CL protease [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 881-890.
- [72] Weerawarna PM, Kim Y, Galasiti Kankanamalage AC, et al. Structure-based design and synthesis of triazole-based macrocyclic inhibitors of norovirus protease: structural, biochemical, spectroscopic, and antiviral studies [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 119: 300-318.
- [73] Mandadapu SR, Weerawarna PM, Prior AM, et al. Macrocyclic inhibitors of 3C and 3C-like proteases of picornavirus, norovirus, and coronavirus [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 3709-3712.
- [74] Kaufmann SHE, Dorhoi A, Hotchkiss RS, et al. Host-directed therapies for bacterial and viral infections [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17: 35-56.

- [75] Gonzalez-Hernandez MJ, Pal A, Gyan KE, et al. Chemical derivatives of a small molecule deubiquitinase inhibitor have antiviral activity against several RNA viruses [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e94491.
- [76] Luo H. Interplay between the virus and the ubiquitin-proteasome system: molecular mechanism of viral pathogenesis [J]. *Curr Opin Virol*, 2016, 17: 1-10.
- [77] Perry JW, Ahmed M, Chang KO, et al. Antiviral activity of a small molecule deubiquitinase inhibitor occurs *via* induction of the unfolded protein response [J]. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002783.
- [78] Charbonneau ME, Gonzalez-Hernandez MJ, Showalter HD, et al. Small molecule deubiquitinase inhibitors promote macrophage anti-infective capacity [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e104096.
- [79] Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823: 624-635.
- [80] Vashist S, Urena L, Gonzalez-Hernandez MB, et al. Molecular chaperone Hsp90 is a therapeutic target for noroviruses [J]. *J Virol*, 2015, 89: 6352-6363.
- [81] Maloney NS, Thackray LB, Goel G, et al. Essential cell-autonomous role for interferon (IFN) regulatory factor 1 in IFN- $\gamma$ -mediated inhibition of norovirus replication in macrophages [J]. *J Virol*, 2012, 86: 12655-12664.
- [82] Thackray LB, Duan E, Lazear HM, et al. Critical role for interferon regulatory factor 3 (IRF-3) and IRF-7 in type I interferon-mediated control of murine norovirus replication [J]. *J Virol*, 2012, 86: 13515-13523.
- [83] Changotra H, Jia Y, Moore TN, et al. Type I and Type II interferons inhibit the translation of murine norovirus proteins [J]. *J Virol*, 2009, 83: 5683-5692.
- [84] Nice TJ, Robinson BA, Van Winkle JA. The role of interferon in persistent viral infection: insights from murine norovirus [J]. *Trends Microbiol*, 2018, 26: 510-524.
- [85] Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, et al. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex [J]. *Nat Immunol*, 2003, 4: 69-77.
- [86] Bolen CR, Ding S, Robek MD, et al. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression [J]. *Hepatology*, 2014, 59: 1262-1272.
- [87] Nice TJ, Baldrige MT, McCune BT, et al. Interferon- $\lambda$  cures persistent murine norovirus infection in the absence of adaptive immunity [J]. *Science*, 2015, 347: 269-273.
- [88] Rocha-Pereira J, Jacobs S, Noppen S, et al. Interferon lambda (IFN- $\lambda$ ) efficiently blocks norovirus transmission in a mouse model [J]. *Antiviral Res*, 2018, 149: 7-15.
- [89] Bam RA, Jones GS, Irrinki A, et al. TLR7 agonist GS-9620 is a potent inhibitor of acute HIV-1 infection in human peripheral blood mononuclear cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 61: e01369-16.
- [90] Enosi Tuipulotu D, Netzler NE, Lun JH, et al. TLR7 agonists display potent antiviral effects against norovirus infection *via* innate stimulation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62: e02417-17.
- [91] Lee W, Kim M, Lee SH, et al. Prophylactic efficacy of orally administered Bacillus poly- $\gamma$ -glutamic acid, a non-LPS TLR4 ligand, against norovirus infection in mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 8667.
- [92] Moore RA, Edwards JE, Hopwood J, et al. Imiquimod for the treatment of genital warts: a quantitative systematic review [J]. *BMC Infect Dis*, 2001, 1: 3.
- [93] Dowling JK, Mansell A. Toll-like receptors: the swiss army knife of immunity and vaccine development [J]. *Clin Transl Immunol*, 2016, 5: e85.
- [94] Ohba M, Oka T, Ando T, et al. Antiviral effect of theaflavins against caliciviruses [J]. *J Antibiot (Tokyo)*, 2017, 70: 443-447.
- [95] Seo DJ, Choi C. Inhibitory mechanism of five natural flavonoids against murine norovirus [J]. *Phytomedicine*, 2017, 30: 59-66.
- [96] Dong JS, Su BJ, Oh H, et al. Comparison of the antiviral activity of flavonoids against murine norovirus and feline calicivirus [J]. *Food Control*, 2016, 60: 25-30.
- [97] Su X, D'Souza DH. Naturally occurring flavonoids against human norovirus surrogates [J]. *Food Environ Virol*, 2013, 5: 97-102.
- [98] Yang M, Lee G, Si J, et al. Curcumin shows antiviral properties against norovirus [J]. *Molecules*, 2016, 21: 1401.
- [99] Lee H, Ko G. Antiviral effect of vitamin A on norovirus infection *via* modulation of the gut microbiome [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 25835.
- [100] Fumian TM, Tuipulotu DE, Netzler NE, et al. Potential therapeutic agents for feline calicivirus infection [J]. *Viruses*, 2018, 10: 433.
- [101] Jiang X, Wang M, Graham DY, et al. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein [J]. *J Virol*, 1992, 66: 6527-6532.
- [102] El-Kamary SS, Pasetti MF, Mendelman PM, et al. Adjuvanted intranasal Norwalk virus-like particle vaccine elicits antibodies and antibody-secreting cells that express homing receptors for mucosal and peripheral lymphoid tissues [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202: 1649-1658.
- [103] Treanor JJ, Atmar RL, Frey SE, et al. A novel intramuscular bivalent norovirus virus-like particle vaccine candidate--reactogenicity, safety, and immunogenicity in a Phase 1 trial in healthy adults [J]. *J Infect Dis*, 2014, 210: 1763-1771.
- [104] Tan M, Huang P, Xia M, et al. Norovirus P particle, a novel platform for vaccine development and antibody production [J]. *J Virol*, 2011, 85: 753-764.