

抗登革病毒药物化学研究新进展

侯凌欣, 鞠 翰, 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: 登革热是由埃及伊蚊和白纹伊蚊传播的一种虫媒病毒性疾病。登革病毒感染能够引发登革热、登革出血热和登革休克综合征等多种症状。迄今为止尚无治疗登革病毒感染的特异性药物上市。本文结合抗登革病毒研究的最新进展, 从蛋白酶抑制剂、病毒多聚酶抑制剂、病毒侵入抑制剂、病毒复制相关宿主因子抑制剂以及衣壳蛋白抑制剂等几个方面综述了抗登革病毒药物研究新进展。

关键词: 登革热; 登革热病毒; 登革出血热; 药物发现

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)04-0669-10

Recent advances in the discovery of dengue virus inhibitors

HOU Ling-xin, JU Han, 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: Dengue fever is one of the most important vector-borne human diseases caused by mosquito vector *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. Dengue virus can cause dengue fever, dengue hemorrhagic fever and dengue shock syndrome. There are no approved drugs for the treatment of dengue disease so far. In this paper, combined with the latest progress in the research of anti-dengue virus, the new progress in the research of anti-dengue virus drugs was reviewed from the aspects of protease inhibitors, virus polymerase inhibitors, entry inhibitors, virus replication-related host factor inhibitors, capsid protein inhibitors and nucleic acid inhibitors.

Key words: dengue fever; dengue virus; dengue hemorrhagic fever; drug discovery

登革病毒血清型 1 至 4 (DENV-1~4) 属于黄病毒科, 是一组包膜 RNA 病毒。黄病毒科是由节肢动物传播的疾病病原体组成, 如黄热病病毒 (YFV)、日本脑炎病毒 (JEV)、西尼罗河病毒 (WNV) 和 DENV。许多黄病毒科病毒是常见的人类致病原, 具有发病率和死亡率高的特点^[1]。仅 DENV 一项来说, 就对生活在登革热流行地区的约 25 亿人构成了公共卫生威胁。DENV 感染常导致登革热、危及生命的登革出血热 (DHF) 或登革休克综合征 (DSS)。全球 100 多个国家报道了大

约 50 万例登革出血热和登革出血热病例, 其中每年大约有 25 000 人死亡, 并且登革热在我国南方沿海各省市仍有流行的趋势。但是, 目前市场上仍无特异性治疗登革病毒感染的药物^[2]。因此, 研究开发低毒、高效的抗登革病毒药物具有重大意义。本文综述了抗 DENV 药物的研究新进展。

1 登革热病毒的结构、致病机制与临床表现

1.1 登革病毒基因组结构和功能

DENV 是黄病毒科的一部分, 病毒颗粒呈哑铃状、棒状或球形, 病毒颗粒外有脂蛋白包膜, 并具有包膜刺突, 病毒包膜的外层含有包膜蛋白 E, 内层含有膜蛋白 M, 病毒的核心部分是由病毒的单股正链 RNA 和病毒衣壳蛋白 C 共同组成的 20 面体核衣壳结构。登革病毒基因组是一个长度约为 11 kb 的单链阳性 RNA, 基

收稿日期: 2019-09-29; 修回日期: 2019-10-17.

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.0513-4870.2019-0787

因组的 5'端和 3'端都有 1 个非编码区 (UTR), 位于 1 个开放阅读框的两侧。开放阅读框编码 1 个长多聚蛋白, 经病毒和细胞蛋白酶的协同和翻译后加工成 3 个结构蛋白 (衣壳[C]、前膜[prM]和包膜[E]) 和 7 个非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5) (图 1)^[2]。其中, 结构蛋白参与病毒的进入和组装; 非结构蛋白参与病毒 RNA 复制、避免先天免疫反应和病毒组装; 糖蛋白 NS1 在病毒 RNA 复制的早期阶段参与病毒 RNA 的复制; NS3 与辅因子 NS2B、RNA 三磷酸酶和 RNA 解旋酶都发挥病毒丝氨酸蛋白酶的作用; NS5 作为甲基转移酶和依赖 RNA 的 RNA 聚合酶 (RdRp) 发挥作用; 对于小疏水蛋白 NS2A、NS4A 和 NS4B 的功能尚不明确。这些跨膜蛋白能够将病毒复制复合体锚定在内质网 (ER) 膜上^[3]。

1.2 登革病毒的致病机制

DENV 感染的复制周期可分为以下几个步骤: 病毒 E 蛋白与细胞表面受体结合、病毒通过内吞作用进入宿主细胞、病毒包膜与内体膜的融合、病毒 RNA 释放到细胞质中、病毒 RNA 基因组被翻译成多蛋白、RNA 的复制、病毒在内质网上组装形成不成熟的病毒粒子以及病毒粒子从高尔基体离开细胞。DENV 感染宿主细胞首先是病毒 E 蛋白与细胞表面受体的结合, 目前已发现多种细胞表面分子可以作为 DENV 的感染受体, 如氨基多糖、DC-SIGN、甘露糖受体、蛋白聚糖等^[4]。然后 DENV 在宿主细胞受体和病毒粒子的包膜 (E) 蛋白的相互作用下, 通过受体介导的内吞作用进入细胞, 之后病毒在核内体中仍保持完整, 直到细胞环境变为酸性, pH 的降低使病毒包膜与释放核衣壳的内体膜发生融合, 随后核衣壳被脱衣从而把病毒基因组释放到细胞质中, 这时病毒基因组发挥信使 RNA 的作用, 并被病毒和细胞蛋白酶翻译成多蛋白, 然后非结构蛋白复制病毒 RNA, 并在内质网上发生病毒的组装,

在内质网中衣壳蛋白包裹着新合成的病毒 RNA, 形成不成熟的病毒颗粒, 最后这些颗粒通过胞吐作用到达高尔基体, 并从高尔基体离开细胞 (图 2)^[5]。

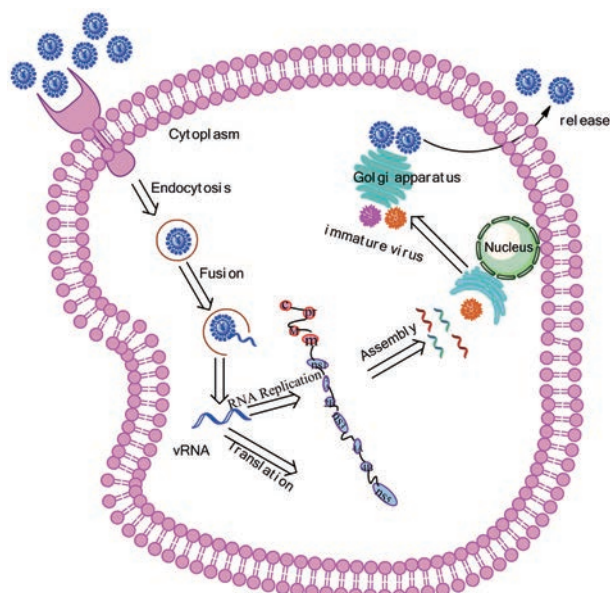


Figure 2 Life cycle of dengue virus^[5]. (Figure derived from Dighe SN, et al. Eur J Med Chem, 2019, 176: 431-455)

1.3 临床表现

DENV 的初次感染早期症状并不明显, 容易发生误诊。典型症状为发热, 常伴乏力、肌痛、畏寒, 可能会出现皮疹、消化道症状 (恶心、呕吐、腹泻) 或者女性的阴道不规则出血、鼻衄以及呕血等症状。当再次感染异型 DENV 时, 会产生抗体依赖增强感染效应 (ADE), 病症恶化为 DHF, 且伴随凝血障碍、血小板减少、血管脆性和通透性增加等症状。若病情进一步加重则可能会出现 DSS, 导致弥散性血管内凝血甚至威胁生命。初次感染 DENV-1 或 DENV-3 时, 会比初次感染 DENV-2 或 DENV-4 或更容易发生登革出血热和登革休克综合

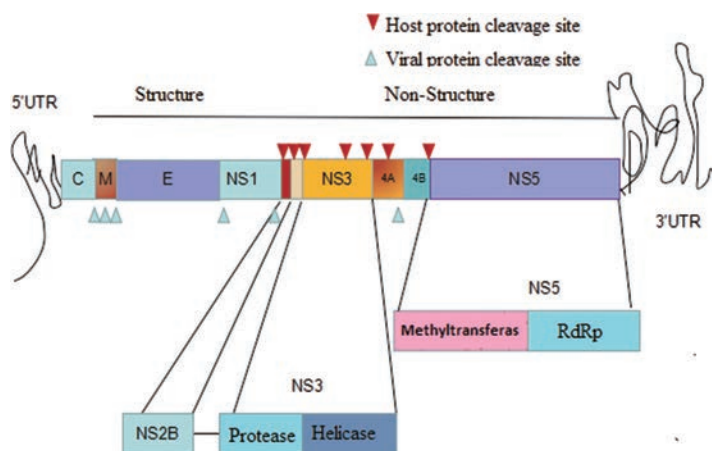


Figure 1 Schematic diagram of DENV genome^[3]. (Figure derived from Green J, et al. Annu Rep Med Chem, 2012, 47: 297-317)

征,但若再次感染 DENV-2 则会导致更加严重的症状,产生 DHF 的风险会显著升高^[6]。

2 抗 DENV 药物的研究进展

2.1 病毒多聚酶抑制剂

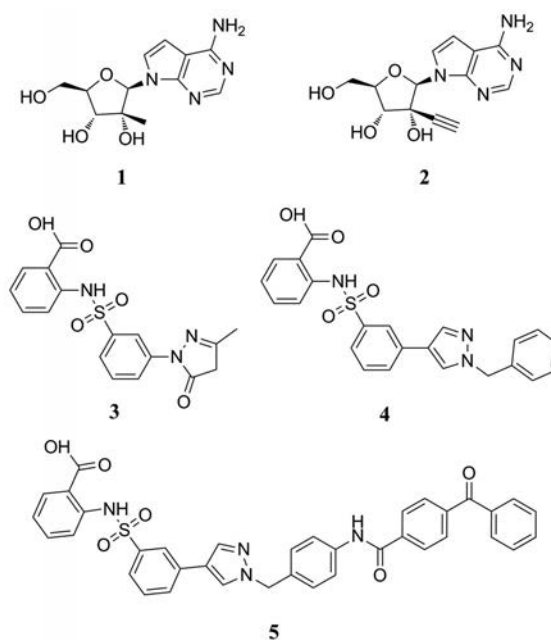
登革病毒属于黄病毒科黄病毒属, HCV 属黄病毒科肝炎病毒属,两者在结构上有很大的相似性,因此基于 HCV 的药物研发经验,可以将病毒多聚酶和蛋白酶作为抗登革病毒药物研究的重要靶点。

目前抑制病毒多聚酶的抑制剂有 2 种,一种是核苷/核苷酸类似物,核苷抑制剂也是应用最广泛的抗病毒药物。这些抑制剂在病毒 DNA 或 RNA 合成过程中起着链终止剂的作用^[7]。例如,黄病毒抑制剂 7-去氮-甲基腺苷 (MK-0608, **1**),最初研发是针对 HCV 的 RdRp 抑制剂,而后发现其也具有抗登革病毒活性^[8];另一个腺苷类似物 7-去氮-乙炔腺苷 (NITD008, **2**)也能够同时在细胞水平和小鼠体内抑制登革病毒,其三磷酸形式直接抑制登革病毒的 RdRp 活性,这表明该复合物在病毒 RNA 合成中起着链终止子的作用; NITD008 不仅能够抑制登革病毒的 4 种血清型,还能够抑制黄病毒科其他病毒如 WNV、黄热病毒和 HCV 等^[9]。遗憾的是,该化合物表现出严重的体内毒性作用。尽管如此,对该先导化合物的结构修饰以及开发仍然是抗登革病毒药物研究领域的热点。

另一种抑制剂为非核苷抑制剂 (non-nucleoside inhibitors, NNI),它通过连接蛋白的变构区 (allosteric pockets) 来抑制酶的活性,NNI 的作用机制主要是将聚合酶的结构改变成非活性构象,阻断从聚合酶起始到延伸的构象转换或是阻碍聚合酶延伸的过程。目前已经鉴定出了一系列非核苷抑制剂^[10,11]。例如, Niyomrattanakit 等^[12]通过基于 RdRp 引物延伸的高通量筛选方法 (high-throughput screening, HTS),筛选出了 3 种登革病毒 RdRp 抑制剂,分别是 *N*-邻磺酰氨基苯甲酸 (*N*-sulfonylanthranilic acid) 衍生物 NITD-1 (**3**)、NITD-2 (**4**) 和 NITD-29 (**5**)。它们通过与病毒 NS5 的 RdRp 域结合从而特异性的抑制登革病毒 RdRp 活性。

2.1.1 核苷抑制剂 核苷类似物代表了一类应用最广泛的抗病毒药物,并且一直被积极地用于 DENV 感染的潜在治疗。许多 DENV 的核苷抑制剂来源于治疗 HCV 药物的发现,这是由于这两种病毒具有相似性^[13]。

化合物 (**6**) (2'-*C*-甲基腺苷) 就是一个特别的例子,它能抑制丙肝病毒 HCV 复制,而且在 2003 年 Migliaccio 等^[14]发现它也具有抗 DENV 活性。2'-*C*-甲基腺苷 (**6**) 具有抗 DENV 活性,其 EC_{50} 为 $4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。但是这种化合物不适合药物开发,因为它通过宿主脱氨



酶快速转化成了 2'-*C*-甲基肌苷。2004 年 Olsen 等^[15]用碳取代 2'-*C*-甲基腺苷的 7 位氮,减少了宿主脱氨酶对化合物的脱氨基作用,从而发现了化合物 (MK-0608, **1**)。然而,这种替代也降低了抗登革病毒活性 ($EC_{50} = 15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),为了提高抗病毒活性,2009 年 Yin 等^[9]用 2'-乙炔基取代 2'-*C*-甲基得到化合物 (NITD008, **2**)。2010 年 Chen 等^[16]对腺苷碱基 C7 位进一步修饰,发现了化合物 (NITD449, **7**),但 NITD449 的药代动力学性质较差。为了克服这个问题他们又合成了化合物 (NITD203, **8**),以改善 NITD449 的药代动力学性质 (表 1)。

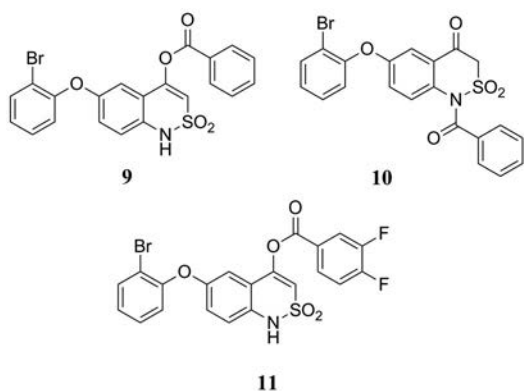
2.1.2 NS5 蛋白的多聚酶靶点 NS5 蛋白是 DENV 基因组编码的最大最保守的蛋白,在基因组复制、转录和加帽中起着重要作用,且其在 4 种 DENV 血清型中高度保守 (约占序列同源性的 70%)。NS5 有两个功能域:一个是甲基转移酶 (MTase) 域存在于 N 端;另一个是 RdRp 域存在于 C 端。这两个功能域通过一段短的低保守性的氨基酸序列链接起来。RdRp 是病毒复制周期中的关键酶。RdRp 先以正链 RNA 为模板合成负链 RNA,然后再以后者为模板合成更多的正链 RNA,用于蛋白的翻译或病毒粒子的包装。因此它在登革病毒的生命周期中是必不可少的。

为了寻找全新的 NS5 RdRp 抑制剂, Dighe 等^[5]对其内部化合物库进行了高通量筛选,发现了苯并噻唑啉衍生物 (**9**) 和 (**10**) (EC_{50} 分别为 30.8 和 $11.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外,在结构优化过程中又得到了新的苯并噻唑啉衍生物 (**11**) ($EC_{50} = 0.6 \pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),不过化合物 (**11**) 在浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时无抗病毒活性,推测可能是因

Table 1 The adenosine-based DENV nucleoside inhibitors^[17]. (Data from Chen YL, et al. Antiviral Res, 2015, 122: 12-19)

Name	Nucleoside	Structure	Cell activity (EC ₅₀ /CC ₅₀) /μmol·L ⁻¹	Mouse activity <i>in vivo</i>	Reference
2-Methyl adenosine (6)	Adenosine		4/18	No	[14]
MK-0608 (1)	Adenosine		15/>320	Yes	[15]
NITD008 (2)	Adenosine		0.7/>100	Yes	[9]
NITD449 (7)	Adenosine		6.99/>50	No	[16]
NITD203 (8)	Adenosine		0.71/>50	Yes	[16]

为 (11) 被代谢成相应的去苯甲酰衍生物而丧失了活性。



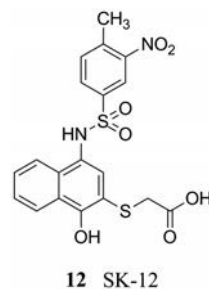
2.2 病毒蛋白酶抑制剂

蛋白酶是产生成熟病毒所必需的,它在维持病毒的活性方面也起着关键作用。这种酶介导多蛋白的裂解,释放病毒繁殖所需要的功能蛋白。蛋白酶可分为 NS3 蛋白酶、NS2B-NS3 蛋白酶及 NS4B 蛋白酶等,其中双组分蛋白酶 NS2B-NS3 不仅负责处理登革热病毒中 NS2A/NS2B、NS2B/NS3、NS3/NS4A 和 NS4B/NS5 的连接部位,还负责处理 C、2A、NS3 和 NS4A 的内部位点。因此,NS2B-NS3 蛋白酶是药物发现的理想靶标^[18]。

目前已有 10 个 HIV 蛋白酶抑制剂和 2 个 HCV 蛋白酶抑制剂用于临床,这为研制出登革热病毒蛋白酶抑制剂提供了可能^[19,20]。然而蛋白酶抑制剂仍存在一

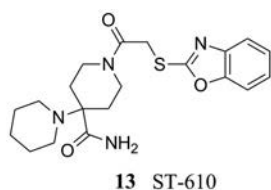
些缺点,例如它容易诱导耐药性病毒株的产生,不同血清型的登革热病毒 NS3 蛋白酶的序列相似性在 63%~74% 之间,蛋白酶抑制剂对不同亚型病毒的抑制活性也可能不同,这都会导致耐药性病毒株的产生。因此,登革热病毒蛋白酶抑制剂可能需要和其他药物联用。此外,人体细胞中存在诸多丝氨酸蛋白酶、弗林蛋白酶、胰蛋白酶、凝血酶或者弹性蛋白酶等,这可能使病毒蛋白酶抑制剂对宿主细胞蛋白酶产生交叉抑制,这就需要抑制剂特异性抑制登革病毒丝氨酸蛋白酶活性,同时不对宿主细胞蛋白酶产生影响^[21]。

人们通过大规模化合物筛选,发现了多种针对蛋白酶的化合物,但是这些化合物的活性都不高,均为微摩尔水平。比如 Pambudi 等^[22]筛选出的小分子化合物 SK-12 (12),该化合物可在 NS2B 结合位点抢先与 NS3 结合,干扰 NS2B-NS3 复合物的形成,因此,SK-12 对所有血清型的登革病毒都有抑制作用。其中,SK-12 对 DENV-4 的抑制作用最强 (EC₅₀ = 0.74 ± 0.48 μmol·L⁻¹)。



2.2.1 NS3蛋白酶抑制剂 NS3蛋白酶是一种类似胰蛋白酶的丝氨酸蛋白酶, 含有典型的丝氨酸蛋白酶催化三联体, 由残基组氨酸 51 (His51)、天冬氨酸 75 (Asp75) 和丝氨酸 135 (Ser135) 组成。登革病毒 NS3 蛋白酶 (NS3pro) 的 N-端三分之一是蛋白酶活性所必需的, C-端三分之二则与核苷三磷酸酶和 RNA 解旋酶的酶活性有关。激活 NS2B 辅因子是 NS3 蛋白酶催化活性的先决条件, 双组分 NS2B-NS3pro 蛋白酶在功能研究和药物发现研究中比单纯的 NS3pro 更具有结构相关性。然而, NS2B 促进 NS3pro 高活化的机制仍不清楚^[23]。

2013 年, Byrd 等^[24]通过高通量筛选确定了一种新的 NS3 蛋白酶抑制剂 (ST-610, **13**), 在细胞培养中, 该化合物对 4 种血清型登革病毒均有抑制活性 ($EC_{50} = 0.203 \sim 0.272 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。ST-610 可能是通过抑制病毒 NS3 解旋酶的双链 RNA (dsRNA) 解离活性, 选择性地抑制 DENV 复制的。然而, 位于 DENV NS3 蛋白解旋酶区域的 263 位丙氨酸会突变成苏氨酸, 从而降低 ST-610 的敏感性使其不能抑制这一过程。因此, 目前仍需不断努力以提高这一系列化合物的抑制活性。



2.2.2 NS2B-NS3蛋白酶抑制剂 NS2B/NS3pro 在登革病毒多蛋白的加工和复制过程中发挥着重要作用, 它是 DENV 复制过程中必不可少的酶。因此以其为靶点的药物可以抑制 DENV 多蛋白的加工。此外, 该蛋白酶在 4 种登革热病毒血清型之间高度保守, 所以 NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂很可能对它们同样有效^[25]。

登革病毒基因组包含 1 个单一的开放阅读框架 (ORF), 该框架被翻译成 1 个独特的多蛋白, 宿主和病毒蛋白酶切割这种多蛋白, 产生 3 个结构蛋白 (衣壳 [C]、前膜 [prM] 和包膜 [E]) 和 7 个非结构蛋白 (NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5) (图 3A)。在非结构蛋白中, NS3 是一种多功能蛋白复合物 (图 3B), 其 C 端区域具有解旋酶 (NS3Hel)、核苷酸-三磷酸酶 (NTPase) 和 RNA-三磷酸酶 (RTPase), 这些酶在病毒基因组复制和转录过程中都是必不可少的。而 NS3 的 N-端区域非常不稳定, 相应的酶活性也依赖于 NS2B 辅助蛋白 (图 3C)^[26]。

在过去的几年中, NS3pro/NS2B 蛋白酶抑制剂的开发工作一直在进行, 为了开发 NS3pro/NS2B 蛋白酶

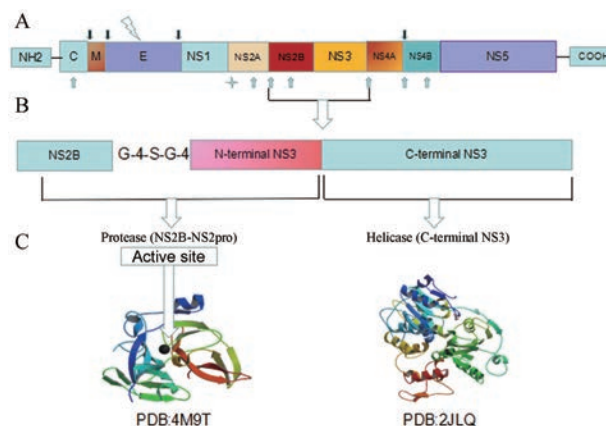
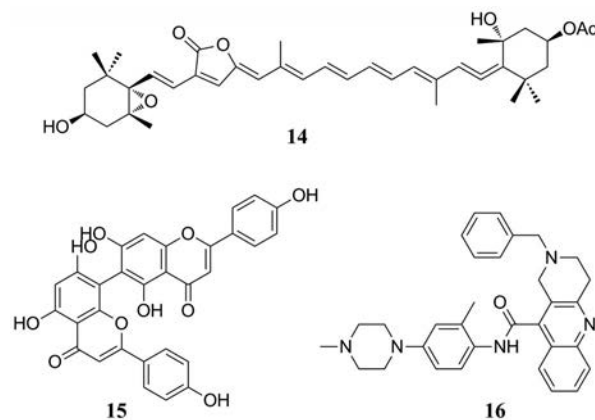


Figure 3 Schematic diagram of DENV genome and crystal structure of NS2B/NS3pro^[26]. (Derived from Leonel CA, et al. Arch Virol, 2018, 163: 575-586)

抑制剂, 研究人员进行了小分子库的高通量筛选 (HTS), 以及设计了能够模拟天然底物的肽类化合物。例如 Lee 等^[27]从台湾珊瑚的乙醇提取物中分离出 9 种化合物, 并在体外测试它们抑制 DENV 复制的效果。在筛选的化合物中, 化合物 (**14**) 活性最强 ($EC_{50} = 4.50 \pm 0.46 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且化合物 (**14**) 对四种血清型的 DENV 均有活性。De Sousa 等^[28]测试了植物中的 6 种黄酮类化合物 (长春花黄酮、槲皮苷、异槲皮苷、杨梅素、水合槲皮素和山柰酚) 对 NS3pro/NS2B 蛋白酶的抑制活性, 其中长春花黄酮 (**15**) 是活性最好的黄酮类化合物, 它对 DENV-2 ($EC_{50} = 15.1 \pm 2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 DENV-3 ($EC_{50} = 25.7 \pm 0.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 有比较好的抑制作用。Li 等^[29]通过高通量虚拟筛选 (HTVS) 在包含 500 万个分子的化学库中筛选出了 14 个化合物进行研究, 其中化合物 (**16**) 在 $300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下对 NS3pro/NS2B 蛋白酶的抑制率为 85.3%, 它是对所有血清型的 DENV 都有效的 NS3pro/NS2B 蛋白酶抑制剂 ($EC_{50} = 5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2.3 NS4B 蛋白酶抑制剂 NS4B 是一种小型的膜蛋白 (约 27 kDa), 具有较高的疏水性。它较为保守, 在



4种血清型登革热病毒 (DENV-1~4) 和其他黄病毒 (包括 YFV、WNV、JEV 和 TBEV) 之间约有 40% 的氨基酸相似性。由于 NS4B 的疏水性, 虽然目前对其晶体结构和核磁共振结构未见报道, 但 Miller 等^[30] 利用生化分析建立了 DENV-2 NS4B 薄膜拓扑模型 (图 4)。在这个模型中, NS4B 整合在内质网 (ER) 膜中, 有 3 个跨膜结构域 (TMD3、4、5) 和两个膜相关结构域 (pTMD1 和 pTMD2)。其中 pTMD1 和 pTMD2 位于 NS4B 的 N 端 100 个氨基酸中, 位于 ER 腔内。TMD3 (残基 101-129) 从管腔跨越到细胞质一侧的膜, 而 TMD4 (残基 165-190) 从细胞质跨越到管腔一侧的膜。TMD5 (残基 217-244) 从管腔跨越到细胞质一侧的膜, 在 C 端被 NS2B/NS3 蛋白酶裂解后, 可能会翻转回内质网腔。

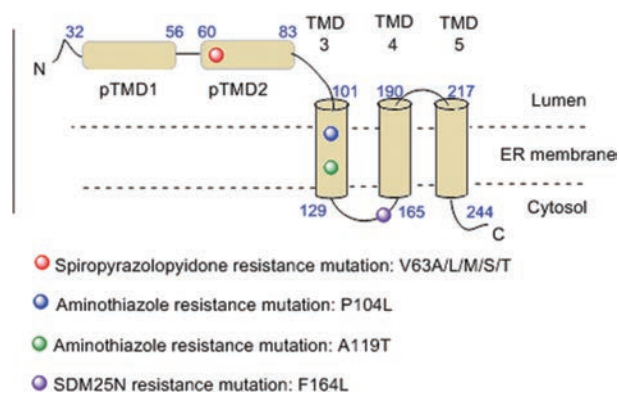
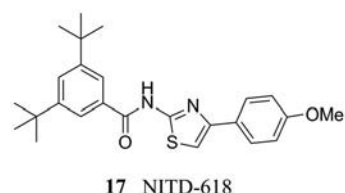


Figure 4 Membrane structure of NS4B and location of drug resistance mutation in NS4B^[31]. (Derived from Xie X, et al. Antiviral Res, 2015, 118: 39-45)

针对 NS4B 设计的酰胺噻唑化合物 NITD-618 (17), 它是一种高效的血清型 DENV 抑制剂, EC_{50} 为 $1.0 \sim 4.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了测试该化合物对 DENV 的特异性, 研究人员对一组 RNA 病毒进行了 NITD-618 的筛选, 发现该化合物对其他经测试的 RNA 病毒都没有活性。值得注意的是, 酰胺噻唑耐药突变 P104L 和酰胺噻唑耐药突变 A119T 在 DENV 的 4 种血清型中都是保守的, 但在其他黄病毒中不保守, 这可能解释了 NITD-618 对 DENV 的选择性抗病毒活性。然而, NITD-618 的高脂性导致其药代动力学性质较差, 阻碍了在其体内药效的测试。研究人员试图降低其脂性, 结果却导致其活性的丧失或对其抗病毒的抗毒选择性的降低^[32]。

2.3 病毒侵入抑制剂

近年来, 人们在阐明登革病毒感染的宿主细胞途径方面取得了进展。有人提出, 登革病毒表面的病毒表位可以引发细胞免疫反应, 进而引发严重疾病。因此, 这些表位可能成为开发新型 DENV 侵入抑制剂的



潜在靶点。

登革病毒侵入宿主细胞的过程如下: 首先, 登革病毒包膜 E 蛋白与细胞膜表面的受体分子结合使得病毒颗粒吸附, 然后吸附的病毒通过受体介导的内吞进入细胞, 之后在核内体的酸性环境下病毒包膜与宿主核内体膜融合, 最后核酸衣壳进入胞质, 病毒 RNA 释放到胞浆 (图 5)^[33,34]。宿主细胞中许多因子 (包括宿主细胞表面的 HS 或高度硫酸化形式的糖胺聚糖) 都与登革病毒的这一侵入过程有关, 如硫酸软骨素 E (CSE) 对于黄病毒 (包括 DENV) 的侵入过程就是必不可少的^[35]。因此, 在登革病毒侵入过程中有关的宿主因子和病毒 E 蛋白结构域都可能是发现抗登革病毒抑制剂的有效靶点。

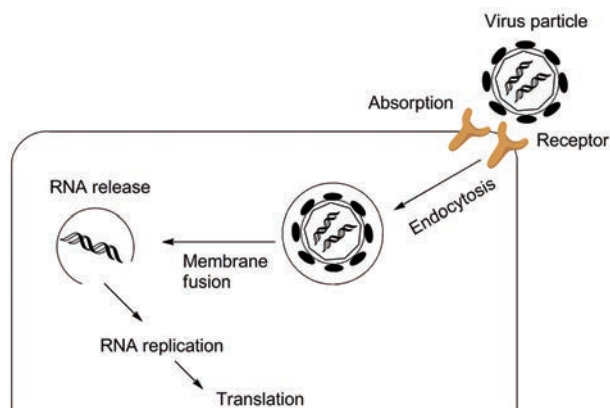
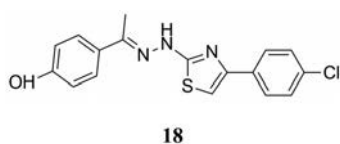


Figure 5 Schematic diagram of DENV membrane fusion process^[35]. (Derived from Hidari K, et al. Viruses, 2013, 5: 605-618)

2.3.1 以 E 糖蛋白的茎域为靶点的侵入抑制剂 一些研究小组已经证明从 E 糖蛋白中提取的短肽可以抑制 DENV 的复制, 它使蛋白质结合到 E 蛋白三聚体中间, 诱导 DENV 病毒粒子表面结构变化, 从而干扰病毒和细胞结合。例如肽 1 (FWFTLIKTQAKQPARYRRFC) 和肽 2 (MAILGDTAWDFGSLGGVFSIGKALHQVFGAIY)。肽 1 是一种用于置换 E 糖蛋白 II 区铰链区域和 E 糖蛋白的 I 区/II 区连接区域的肽, 它在病灶形成单位 (FFU) 检测中 IC_{50} 值是 $7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[36]; 肽 2 是一种有 33 个氨基酸的肽, 它模仿 DENV-2 的茎区 (残基 412-144), 在恒河猴肾细胞 (LLC-MK2) 中进行的 FFU 检测证明, 它在浓度 $2 \sim 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内可以减少 4 种血清型登革热病

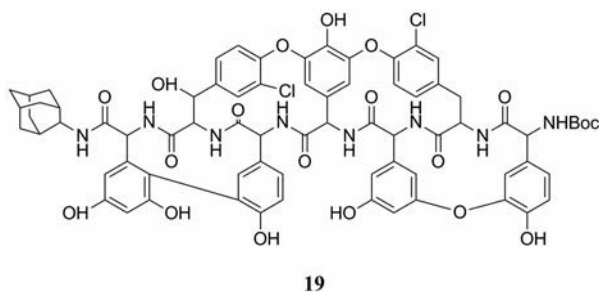
毒 50% 的传染性^[37]。

2.3.2 以E糖蛋白的疏水囊为靶点的侵入抑制剂 2003年, Modis等^[38]结合 DENV E糖蛋白的晶体结构, 描述了结构域 I 和结构域 II 之间的疏水口袋, 并认为该口袋是一个有价值的配体结合位点。进而发现了靶向该位点的首个配体分子正辛酰- β -D-葡糖苷 (β -OG), 因此该结合位点也被称为 β -OG 口袋。最近, Jadav等^[39]报道了一类新的 β -OG 口袋混合抑制剂, 这类化合物是先前在虚拟筛选中发展而来的。其中所发现的抑制剂中化合物 (18) 的活性最高 ($EC_{50} = 1.39 \pm 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 125 \pm 40.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。



2.3.3 以受体结合域 III 为靶点的侵入抑制剂 E糖蛋白结构域 III 似乎通过与糖胺聚糖 (GAG) 受体结合, 从而负责宿主细胞表面 DENV 的接触和积累, GAGs 是一种与靶细胞表面蛋白连接的长链而无支链的硫酸多糖。此外, DENV 被证明可以与宿主细胞外表面的肝素-硫酸盐蛋白聚糖或合癸聚糖结合, 因此, 许多研究者希望通过模拟这些受体的肝素-硫酸盐 (HS) 部分来发现新的侵入抑制剂。

目前, 研究发现了一种可能与 E糖蛋白结合的化合物, 替考拉宁衍生物 (19), 该化合物体外抑制 DENV-2 复制的 EC_{50} 为 $69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, SI 大于 15。值得注意的是, 该化合物还对带有抗体的 DENV 颗粒发挥抗病毒作用, 因此在预防由抗体依赖增强感染效应引起的严重登革热方面具有重要价值^[40]。

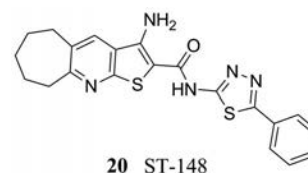


2.4 DENV 衣壳蛋白抑制剂

登革病毒是有包膜的单股正链 RNA 病毒, 基因组长约 11 kb, 依次编码了 3 个结构蛋白 (C、PrM 和 E) 和 7 个非结构蛋白。其中衣壳蛋白 C 位于病毒颗粒内部, 与基因组 RNA 结合, 共同构成病毒的核衣壳。衣壳蛋白相对分子质量约为 12 000, 是登革病毒翻译过程中

首先合成的多肽, 它存在于宿主细胞的细胞核与细胞质中。登革病毒衣壳蛋白是一种具有多种生物学功能的病毒结构蛋白, 除了与病毒 RNA 共同构成核衣壳, 还能够与宿主细胞内诸如 RNA、蛋白质等多种生物大分子相互作用, 此外它还参与了宿主细胞生长、增殖以及凋亡的调控。随着研究的不断深入, 登革病毒衣壳蛋白也成为药物研究的热点靶标^[41]。

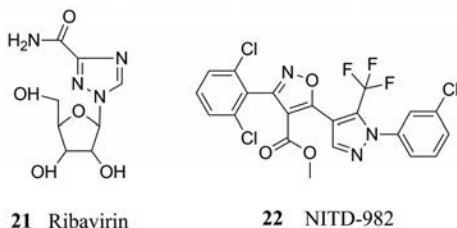
Byrd等^[42]发现小分子抑制剂 ST-148 (20) 能够抑制 DENV 复制。腹腔内和静脉注射 ST-148 到 AG129 小鼠模型后, 能够显著降低血浆和肝脾脏中的病毒载量。SR-148 耐药实验结果发现, C 蛋白 S34L 位点的单氨基酸突变后, DENV-2 对 ST-148 的敏感性降低了 550 倍, 且体外实验证明 ST-148 能够与野生型和突变型的 C 蛋白结合, 由此得出结论 C 蛋白是 ST-148 的作用靶点。Scaturro等^[43]进一步研究证实 ST-148 提高了 C 蛋白分子间的作用, 导致核衣壳结构刚性化, 干扰了病毒核衣壳的组装及释放。



2.5 病毒复制相关宿主因子抑制剂

登革病毒在感染和发病期间宿主和病毒会发生相互作用, 登革病毒感染的宿主细胞包括单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞。病毒通过 E 蛋白介导附着在细胞表面, 并通过受体介导的内吞作用进入细胞。内体中较低 pH 值触发了 E 蛋白的结构重组, 从而诱导了病毒和宿主细胞膜的融合, 使核衣壳和病毒 RNA 释放到细胞质中^[44,45]。病毒复制周期中需要多个宿主因子参与, 干扰这些宿主因子的功能往往可以抑制病毒的复制。病毒的复制依赖于宿主提供核苷。因此参与核苷生物合成的宿主酶有望作为抗登革病毒药物开发的潜在靶点。例如利巴韦林 (21) (抗登革病毒药物), 它就是通过抑制鸟嘌呤的生物合成而抑制登革病毒的复制, 类似地, 嘧啶生物合成抑制剂可以通过抑制嘧啶的生物合成来抑制登革病毒的复制, 也可以作为潜在抗登革病毒药物开发的靶点。研究者通过 DENV 感染试验, 从 180 万种化合物中筛选出了一种新型抗登革病毒化合物 (NITD-982, 22), 它能抑制宿主二氢乳酸脱氢酶 (DHODH), 而 DHODH 是嘧啶生物合成所必需的酶。NITD-982 就是通过消耗细胞内嘧啶来抑制病毒 RNA 合成的 ($EC_{50} = 2.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。与体外药效相比, 该化合物在 DENV-AG129 小鼠模型

中没有显示出任何效果。体内疗效的缺乏可能是由于从饮食中外源性摄取嘧啶,或者是由于当前化合物具有较高的血浆蛋白结合活性。尽管如此, NITD-982 仍不失为一种潜在的抗病毒先导化合物^[46]。



2.6 其他抑制剂

Baltina 等^[47]通过 DENV-2 型在非洲绿猴肾细胞中的细胞病变效应 (CPE) 和病毒感染性的抑制试验, 阐明了甘草酸 (GL) 衍生物的结构-抗病毒活性关系, 同时证明了 GL (96% 纯度) 对非洲绿猴肾细胞具有较低的细胞毒性, 它可以抑制 DENV-2 诱导的 CPE 以及降低 DENV-2 的感染性 ($EC_{50} = 8.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。因此, 对 GL 的结构进行修饰可能是寻找抗 DENV-2 感染药物的新方法。GL 及其衍生物如图 6 所示。

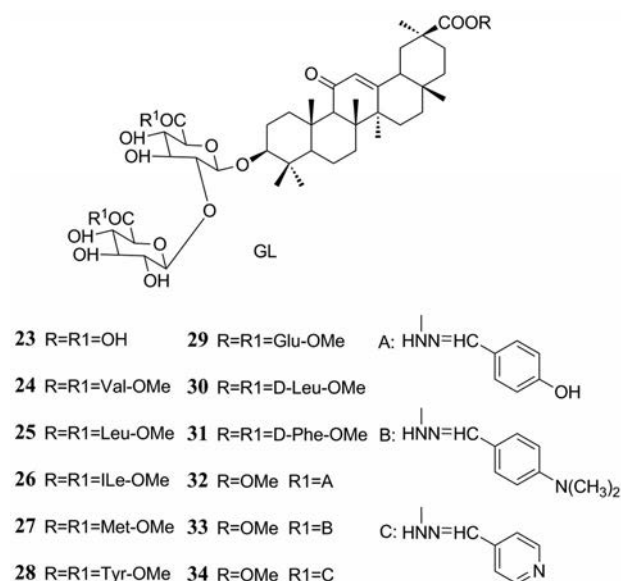


Figure 6 The structure of GL and its derivatives (compound 23–34)^[47]. (Figure derived from Baltina LA, et al. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019: 126645)

3 总结与展望

近年来, DENV 的生物学和抗病毒药物研究取得了很大的进展, 获得了一些有效的抗 DENV 候选药物。但 DENV 药物研发仍然面临诸多挑战: 首先, 缺少对 4 种血清型登革病毒都有效的抗登革病毒药物; 其次, 重症登革病毒感染的分子机制目前还不清楚, 这在很大

程度上限制了抗登革病毒药物的研发; 再次, 目前还没有合适的能够进行药物体内效果研究的小动物模型等, 这些都是亟需解决的重要问题。

现有 DENV 抑制剂的研发策略主要有 3 种: ① 基于酶靶标的高通量筛选, 病毒多聚酶和蛋白酶是抗病毒药物研发中的重要靶标, 通过基于病毒多聚酶和蛋白酶的高通量筛选, 人们获得了一些活性化合物。② 基于表型的高通量筛选, 由于病毒感染过程复杂, 导致很多酶水平表现出高活性的化合物在进一步细胞实验或动物实验中没有理想的效果, 而基于表型的高通量筛选, 不仅能更加有效的寻找对病毒感染过程确切有效且结构新颖的化合物, 还有希望获得新的作用靶点。③ 从已知的 HCV 抑制剂中寻找登革病毒抑制剂, 由于登革病毒和 HCV 同属黄病毒, 结构上有很大的相似性, 因此从已知的 HCV 抑制剂出发, 有望获得有效的登革病毒抑制剂。

现有的登革病毒抑制剂也依然存在一些缺点, 例如蛋白酶虽然在维持病毒的活性方面也起着关键作用, 但蛋白酶抑制剂容易诱导耐药性病毒株的产生; 很多病毒多聚酶抑制剂活性不够高以及存在很多毒副作用; 病毒侵入抑制剂尽管在体外能够表现出一定的抗登革病毒活性, 但缺乏一些有效的体内抗病毒效果评估或者体内抗病毒效果不佳, 很难应用于登革病毒感染的临床治疗等。总而言之, 发现新一代登革病毒抑制剂依然是未来抗病毒药物的研究热点。

References

- [1] Martina BE, Koraka P, Osterhaus AD. Dengue virus pathogenesis: an integrated view [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2009, 22: 564-581.
- [2] Uno N, Ross TM. Dengue virus and the host innate immune response [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7: 1-11.
- [3] Green J, Bandarage U, Luisi K, et al. Recent advances in the discovery of dengue virus inhibitors [J]. *Annu Rep Med Chem*, 2012, 47: 297-317.
- [4] Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker [J]. *Antiviral Res*, 2013, 98: 192-208.
- [5] Dighe SN, Dua K, Chellappan DK, et al. Recent update on anti-dengue drug discovery [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 176: 431-455.
- [6] Yauch LE, Shresta S. Dengue virus vaccine development [J]. *Adv Virus Res*, 2014, 88: 315-372.
- [7] Chen YL, Yin Z, Duraiswamy J, et al. Inhibition of dengue virus RNA synthesis by an adenosine nucleoside [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 2932-2939.

- [8] Schul W, Liu W, Xu HY, et al. A dengue fever viremia model in mice shows reduction in viral replication and suppression of the inflammatory response after treatment with antiviral drugs [J]. *J Infect Dis*, 2007, 195: 665-674.
- [9] Yin Z, Chen YL, Schul W, et al. An adenosine nucleoside inhibitor of Dengue virus [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 20435-20439.
- [10] Yin Z, Chen YL, Kondreddi RR, et al. *N*-Sulfonylanthranilic acid derivatives as allosteric inhibitors of Dengue viral RNA-dependent RNA polymerase [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 7934-7937.
- [11] Niyomrattanakit P, Chen YL, Dong H, et al. Inhibition of dengue virus polymerase by blocking of the RNA tunnel [J]. *J Virol*, 2010, 84: 5678-5686.
- [12] Yang CC, Hsieh YC, Lee SJ, et al. Novel dengue virus-specific NS2B/NS3 protease inhibitor, BP2109, discovered by a high-throughput screening assay [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 229-238.
- [13] Lin C, Yu J, Hussain M, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel 7-deazapurine nucleoside derivatives as potential anti-dengue virus agents [J]. *Antiviral Res*, 2018, 149: 95-105.
- [14] Migliaccio G, Tomassini JE, Carroll SS, et al. Characterization of resistance to non-obligate chain-terminating ribonucleoside analogs that inhibit hepatitis C virus replication *in vitro* [J]. *J Biol Chem*, 2003, 278: 49164-49170.
- [15] Olsen DB, Eldrup AB, Bartholomew L, et al. A 7-deaza-adenosine analog is a potent and selective inhibitor of hepatitis C virus replication with excellent pharmacokinetic properties [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 3944-3953.
- [16] Chen YL, Yin Z, Lakshminarayana SB, et al. Inhibition of Dengue virus by an ester prodrug of an adenosine analog [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 3255-3261.
- [17] Chen YL, Yokokawa F, Shi PY. The search for nucleoside/nucleotide analog inhibitors of Dengue virus [J]. *Antiviral Res*, 2015, 122: 12-19.
- [18] Timiri AK, Sinha BN, Jayaprakash V. Progress and prospects on DENV protease inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 117: 125-143.
- [19] De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2009, 33: 307-320.
- [20] Wyles DL. Antiviral resistance and the future landscape of hepatitis C virus infection therapy [J]. *J Infect Dis*, 2013, 207: S33-S39.
- [21] Nitsche C, Behnam MA, Steuer C, et al. Retro peptide-hybrids as selective inhibitors of the Dengue virus NS2B-NS3 protease [J]. *Antiviral Res*, 2012, 94: 72-79.
- [22] Pambudi S, Kawashita N, Phanthanawiboon S, et al. A small compound targeting the interaction between nonstructural proteins 2B and 3 inhibits Dengue virus replication [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440: 393-398.
- [23] Oliveira AS, Silva ML, Oliveira AF, et al. NS3 and NS5 proteins: important targets for anti-dengue drug design [J]. *J Braz Chem Soc*, 2014, 25: 1759-1769.
- [24] Byrd CM, Grosenbach DW, Berhanu A, et al. Novel benzoxazole inhibitor of Dengue virus replication that targets the NS3 helicase [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 1902-1912.
- [25] Aguilera-Pesantes D, Robayo LE, Méndez PE, et al. Discovering key residues of Dengue virus NS2b-NS3-protease: new binding sites for antiviral inhibitors design [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 492: 631-642.
- [26] Leonel CA, Lima WG, Dos Santos M, et al. Pharmacophoric characteristics of Dengue virus NS2B/NS3pro inhibitors: a systematic review of the most promising compounds [J]. *Arch Virol*, 2018, 163: 575-586.
- [27] Lee JC, Chang FR, Chen SR, et al. Anti-dengue virus constituents from formosan zoanthid *Palythoa mutuki* [J]. *Mar Drugs*, 2016, 14: 151.
- [28] de Sousa LR, Wu H, Nebo L, et al. Flavonoids as noncompetitive inhibitors of Dengue virus NS2B-NS3 protease: inhibition kinetics and docking studies [J]. *Bioorg Med Chem*, 2015, 23: 466-470.
- [29] Li L, Basavannacharya C, Chan KW, et al. Structure-guided discovery of a novel non-peptide inhibitor of Dengue virus NS2B-NS3 protease [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2015, 86: 255-264.
- [30] Miller S, Sparacio S, Bartenschlager R. Subcellular localization and membrane topology of the Dengue virus type 2 non-structural protein 4B [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 8854-8863.
- [31] Xie X, Zou J, Wang QY, et al. Targeting dengue virus NS4B protein for drug discovery [J]. *Antiviral Res*, 2015, 118: 39-45.
- [32] Xie X, Wang QY, Xu HY, et al. Inhibition of dengue virus by targeting viral NS4B protein [J]. *J Virol*, 2011, 85: 11183-11195.
- [33] Alen MM, Schols D. Dengue virus entry as target for antiviral therapy [J]. *J Trop Med*, 2012, 2012: 628475.
- [34] De La Guardia C, Lleonart R. Progress in the identification of dengue virus entry/fusion inhibitors [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 825039.
- [35] Hidari K, Abe T, Suzuki T. Carbohydrate-related inhibitors of dengue virus entry [J]. *Viruses*, 2013, 5: 605-618.
- [36] Costin JM, Jenwitheesuk E, Lok SM, et al. Structural optimization and *de novo* design of dengue virus entry inhibitory peptides [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2010, 4: e721.
- [37] Lok SM, Costin JM, Hrobowski YM, et al. Release of dengue virus genome induced by a peptide inhibitor [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e50995.
- [38] Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 6986-6991.
- [39] Jadav SS, Kaptein S, Timiri A, et al. Design, synthesis, optimization and antiviral activity of a class of hybrid dengue virus E protein inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25: 1747-1752.

- [40] Behnam MA, Nitsche C, Boldescu V, et al. The medicinal chemistry of dengue virus [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 5622-5649.
- [41] Ma L, Jones CT, Groesch TD, et al. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101: 3414-3419.
- [42] Byrd CM, Dai D, Grosenbach DW, et al. A novel inhibitor of dengue virus replication that targets the capsid protein [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 15-25.
- [43] Scaturro P, Trist IM, Paul D, et al. Characterization of the mode of action of a potent dengue virus capsid inhibitor [J]. *J Virol*, 2014, 88: 11540-11555.
- [44] Pastorino B, Nougairède A, Wurtz N, et al. Role of host cell factors in flavivirus infection: implications for pathogenesis and development of antiviral drugs [J]. *Antiviral Res*, 2010, 87: 281-294.
- [45] Rodenhuis-Zybert IA, Wilschut J, Smit JM. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67: 2773-2786.
- [46] Wang QY, Bushell S, Qing M, et al. Inhibition of Dengue virus through suppression of host pyrimidine biosynthesis [J]. *J Virol*, 2011, 85: 6548-6556.
- [47] Baltina LA, Tasi YT, Huang SH, et al. Glycyrrhizic acid derivatives as dengue virus inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 126645.