



黄病毒 NS2B-NS3pro 蛋白酶的结构研究进展

武晨, 杨海涛, 王泽方*

天津大学生命科学学院, 天津 300072

摘要: 黄病毒能引起严重的人类疾病, 但是并无特定药物来治疗病毒感染。黄病毒非结构蛋白 NS3 的 N 端区域及其辅因子 NS2B 构成蛋白酶, 该酶切割病毒的多聚蛋白形成成熟的结构蛋白和非结构蛋白来帮助病毒完成增殖过程。NS2B-NS3pro 蛋白酶在黄病毒生命周期中起关键的作用, 使之成为抗病毒药物研发的重要靶标。本文综述了黄病毒属中寨卡病毒、登革热病毒、西尼罗病毒的 NS2B-NS3pro 蛋白酶结构的研究进展, 并介绍了相关抑制剂与蛋白酶形成的复合物结构, 以期研发抗黄病毒药物提供必要的参考。

关键词: 黄病毒, 蛋白酶, 抑制剂, 晶体结构

黄病毒属病毒, 如登革热病毒(DENV)、西尼罗病毒(WNV)等均属于高致病性病毒, 给人类的健康和生命带来威胁, 由于动物迁徙、气候变化、城市化和国际旅游等原因, 黄病毒感染和流行仍对全球具有潜在的威胁。全球每年数十亿人存在感染 DENV 风险, 并且主要集中在蚊虫流行的热带和亚热带气候地区^[1]。最近, 又一种黄病毒属病毒——寨卡病毒(ZIKV)在世界范围内迅速传播并爆发^[2-4], 世界卫生组织甚至宣布 ZIKV 为全球公共卫生紧急事件^[5]。

黄病毒均为单股正链 RNA 病毒, 其基因组长约 11 kb, 病毒增殖过程产生的多聚蛋白立即被宿

主细胞蛋白酶和病毒自身编码的蛋白酶切割, 产生 3 种结构蛋白: 衣壳蛋白(C)、膜蛋白(prM/M)和包膜蛋白(E), 以及 7 种非结构蛋白: NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5(图 1)^[6], 各自发挥其功能。研究表明, 抑制黄病毒非结构蛋白功能是靶向抗病毒药物开发的基础^[7-8]。黄病毒 NS2B-NS3pro 蛋白酶是一种高度保守的复制关键酶, 在病毒生命周期中起着至关重要的作用, 是理想的药物靶点。NS3 蛋白酶结构域需要在 NS2B 辅因子参与下才能发挥酶活性, NS2B 中心区的 47 个氨基酸充当蛋白酶辅因子, 对于蛋白酶的正确折叠和催化活性都是必需的。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2015CB859800)

*通信作者。E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

收稿日期: 2018-05-13; 修回日期: 2018-10-08; 网络出版日期: 2019-03-06

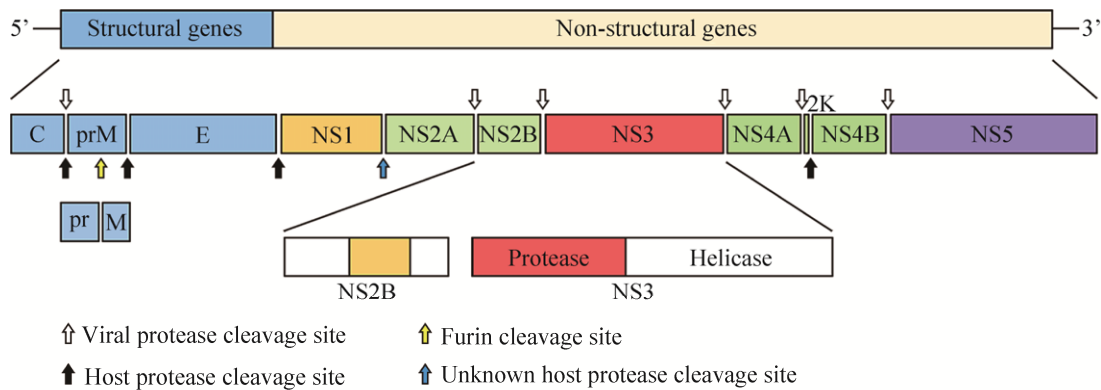


图 1. 黄病毒基因组和多聚蛋白酶切过程^[6]

Figure 1. Flavivirus genome and polyproteinase cleavage^[6]. Flavivirus has a single-stranded positive-sense genome. The proteolytic processing cascade produces precursors and mature proteins, arrows represent cleavage sites. Cofactor NS2B and protease region of NS3 constitute protease.

目前, 针对黄病毒并无特定疗法和抗病毒药物来治疗病毒感染, 因此研究黄病毒的致病机理、进一步设计抗病毒药物的任务紧迫。虽然已有疫苗来应对几种黄病毒^[9-10], 但由于黄病毒的种类多而复杂, 特定的药物和疫苗开发仍面临严峻挑战。基于蛋白酶结构, 针对丙肝病毒 NS3 蛋白酶的几种药物已经获得美国食品和药物管理局(FDA)的批准并进入临床^[11], 这表明了针对黄病毒蛋白酶靶向开发抗病毒药物的可行性, 通过研究其结构并进一步开发抗病毒药物具有重要的研究价值。国内外已有多个研究组开展了黄病毒 NS2B-NS3 蛋白酶的结构研究, 针对目前已解析的黄病毒蛋白酶结构, 本文综述了 ZIKV、DENV 和 WNV 三种黄病毒 NS2B-NS3pro 蛋白酶及其抑制剂复合物的结构研究进展。

1 寨卡病毒(ZIKV)蛋白酶及其复合物结构研究进展

寨卡病毒(ZIKV)与小头畸形症的发生密切相关, 能够引起格林-巴利综合征(Guillain-Barre

syndrome, GBS), 严重者甚至引起致死性呼吸麻痹和双侧面瘫^[12-16]。到目前为止, 还没有能用于临床上治疗 ZIKV 感染的疫苗或特效药物。目前已有几个研究组报道了 ZIKV 蛋白酶母体和抑制剂结合复合物的结构, 根据载体构建分为三类, 分别命名为 aZVP、bZVP 和 cZVP^[17-21]。

aZVP 是将 NS3 蛋白酶结构域与 NS2B 通过由甘氨酸和丝氨酸组成的 linker (GGGSGGGG) 连接进行融合表达。aZVP 捕获到 NS2B-NS3pro 与硼酸盐抑制剂 cn-716 的复合物 2.7 Å 分辨率结构(图 2-A 5LC0), 该状态下蛋白酶处于闭合构象^[17], 硼原子与 Ser135 共价结合, 活性口袋 P1 处的保守氨基酸 Asp129 与 cn-716 中 Arg 形成盐键; aZVP 同样捕获到 NS2B-NS3pro 母体 2.6 Å 分辨率结构, 该状态为开放构象^[18], NS2B 的 C 端处于自由摆动的状态(图 2-A 5GXJ)。在没有底物或抑制剂结合的情况下, NS2B 的 C 端部分处于开放的构象, 蛋白酶处于失活状态; 当底物与活性口袋结合时, NS2B 的 C 端部分围绕 NS3 形成闭合构象, 蛋白酶行使其功能活性^[18]。去除 NS2B 后, 蛋白酶活性大大降低, 也证明了 NS3 蛋白酶功能需要 NS2B

构象变化来实现^[22-23]。NS3pro 的 C 端 loop-S1 (152-167 位氨基酸)和 NS2B 的 C 端 loop-S2(69-87 位氨基酸)构象发生适当变化才能形成活性口袋 S1 和 S2 位点, 去除任意一个 loop 都会使蛋白酶失活, 这为揭示 ZIKV 蛋白酶的激活和抑制机制提供了重要的结构信息。值得关注的是, loop-S1 会被相邻蛋白酶分子的 29-32 位氨基酸推开, 不能形成 S1 导致蛋白酶处于自抑制的状态, 同样的情况也出现在乙型脑炎病毒(JEV)蛋白酶构象中。这个区域可以作为全新的药物靶点, 使蛋白酶处于“自抑制”状态^[18]。

bZVP 是将 NS2B 去掉跨膜区部分,通过含有原

始酶切位点的 45-96 位氨基酸与 NS3 蛋白酶结构域直接连接。bZVP 捕获了 NS2B-NS3pro 的 1.84 Å 高分辨率结构, NS2B 的 C 端最后四位氨基酸 TGKR 被酶切后结合到 NS3 的活性口袋(图 2-B 5GJ4)。蛋白酶自酶切后处于闭合的构象, 活性抑制的状态, 这表明 TGKR 与 cn-716 在结合活性口袋上具有相似性。该结构揭示了生理状态下病毒多聚蛋白被蛋白酶水解后的精确构象以及 NS2B 的 C 端与蛋白酶活性位点之间的相互作用。P1 和 P2 的正电荷残基非常明显, TGKR 肽段 Gly128 没有完全填充在 S3 结合口袋, 这与 DENV、WNV 蛋白酶有所差异, 该结构信息可以用于设计更精准的特异性抑制剂^[19]。

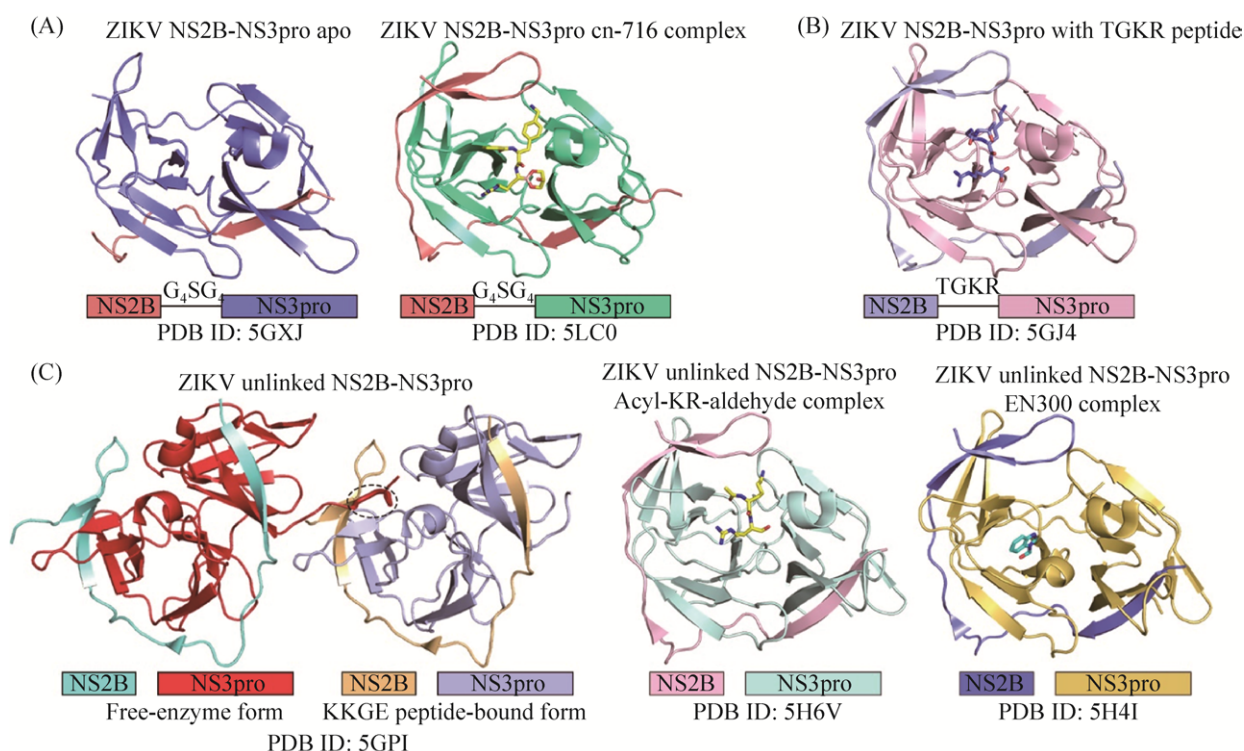


图 2. 寨卡病毒蛋白酶的结构^[17-21]

Figure 2. Structures of ZIKV NS2B-NS3pro^[17-21]. A: ZIKV NS2B-NS3pro apo form structure with G₄SG₄ linker (PDB ID: 5GXJ) and complex structure with cn-716 (PDB ID: 5LC0), the inhibitor is shown as sticks. B: Overall structure of linked ZIKV NS2B-NS3pro in complex with TGKR peptide (PDB ID: 5GJ4). C: Free-enzyme form and KKGE (black dotted frame) peptide-bound form of ZIKV unlinked NS2B-NS3pro (PDB ID: 5GPI). Overall structure of ZIKV unlinked NS2B-NS3pro in complex with Acyl-KR-aldehyde (PDB ID: 5H6V). Structure of ZIKV unlinked NS2B-NS3pro in complex with EN300 (PDB ID: 5H4I).

cZVP 是将 NS2B 和 NS3 蛋白酶结构域进行共表达, 未用 linker 连接, 这样可以更好地还原蛋白酶功能状态。cZVP 同样捕获到处于闭合构象的蛋白酶, 该状态下蛋白酶构象存在两种(图 2-C PDB ID: 5GPI): 一种是 NS3 蛋白酶 N 端的 KKGE 肽段结合到相邻 NS3 蛋白酶分子的活性口袋, 而使蛋白酶处于闭合构象; 另一种是活性口袋没有底物或抑制剂结合而构成的闭合构象。两种状态的闭合构象非常稳定, 这也是首次捕获到黄病毒蛋白酶没有结合底物或抑制剂的封闭构象。当 Acyl-KR-aldehyde (图 2C PDB ID: 5H6V) 和 EN300 (图 2-C PDB ID: 5H4I) 分别与蛋白酶结合时, 蛋白酶的闭合构象没有发生明显的变化^[20]。通过对三种构建载体得到的结构信息进行比较, 分析 linker(GGGGSGGG)可能会导致空间位阻, 干扰蛋白酶正确折叠并影响酶活性^[24-25]。

2 登革热病毒(DENV)蛋白酶及其复合物结构研究进展

登革热病毒(DENV)有着极高的感染率和发病率^[26-27], 病毒会首先攻击树突细胞和巨噬细胞进而破坏人体免疫功能^[28-30]。登革出血热和登革休克综合症的严重性和恶化程度不可忽视, 目前的治疗方法仅限于补液和医疗护理。虽然墨西哥在 2015 年批准了第一种疫苗 CYD-TDV^[31], 但是抗 DENV 小分子药物的研发非常缓慢, DENV 的不同血清型也使得抗 DENV 药物的研发变得复杂^[32]。

DENV 血清型 III(DENV-3)蛋白酶的整体结构与 DENV-1 和 DENV-2 的结构非常相似, 只是在 NS3 蛋白酶的两个 loop 区(119-120 位和 155-159 位氨基酸)处存在偏移, 在这里我们介绍 DENV-3 的蛋白酶共价结合肽抑制剂 Bz-nKRR-H 的晶体结

构和蛋白酶与 aprotinin 复合物的晶体结构。

DENV-3 蛋白酶与 Bz-nKRR-H 的复合物晶体结构中, 肽 n-KRR 是针对活性口袋设计的 P1-P4 最佳识别底物, 活性中心保守氨基酸 Ser135 与 Bz-nKRR-H 形成共价键, 并且 Bz-nKRR-H 的羟基与 NS3pro 的 H51 相互作用。P1 侧链与 D129 形成表面电荷相互作用, P2 和 P3 侧链分别与 NS3pro 的 G82 和 NS2B 的 M84 相互作用, 这些相互作用稳定了闭合构象中 NS2B 的 β 发卡结构(图 3-A PDB ID: 3U1I)^[8]。NS2B 与配体结合的构象和 WNV 结构中的构象非常相似, 表明了 DENV 和 WNV 蛋白酶活性位点的相似性^[33]。由于 NS2B 的构象变化影响蛋白酶的催化活性, 研究发现减少 NS2B 和 NS3pro 之间 linker 的长度会明显降低蛋白酶活性^[34]。通过结构分析, NS2B 围绕 NS3pro 会形成一个分子相对面上的口袋, 该空腔口袋被认为是抗病毒抑制剂的潜在结合位点, 如果设计化合物能与该口袋结合, 使 NS2B 的 β 发卡锁定在适当位置, 就能阻止 NS2B 构象变化激活蛋白酶活性, 或者防止底物与蛋白酶结合^[22]。所以, 靶向该空腔口袋来设计小分子药物也为抗病毒药物研发提供新的切入点。

DENV-3 蛋白酶与 aprotinin 的复合物晶体结构中, NS2B 的 β 发卡结构与 aprotinin 没有直接接触, 表明 aprotinin 与蛋白酶活性位点的结合不需要同 NS2B 相互作用, 因此 NS2B 在很大程度上是自由灵活的^[8]。由于 aprotinin 是一种较大的多肽, 推测其亲和力很可能来自多种相互作用, 其结构空间位阻影响底物与蛋白酶活性位点的结合, 从而抑制蛋白酶的活性(图 3-B PDB ID: 3U1J)^[35]。P1 易与 Ser 产生相互作用, P2 的 Arg 指向溶剂, P3 同样易与 Ser 产生相互作用, P4 易与 Gly 产生相互作用。上述两种 DENV-3 蛋白酶

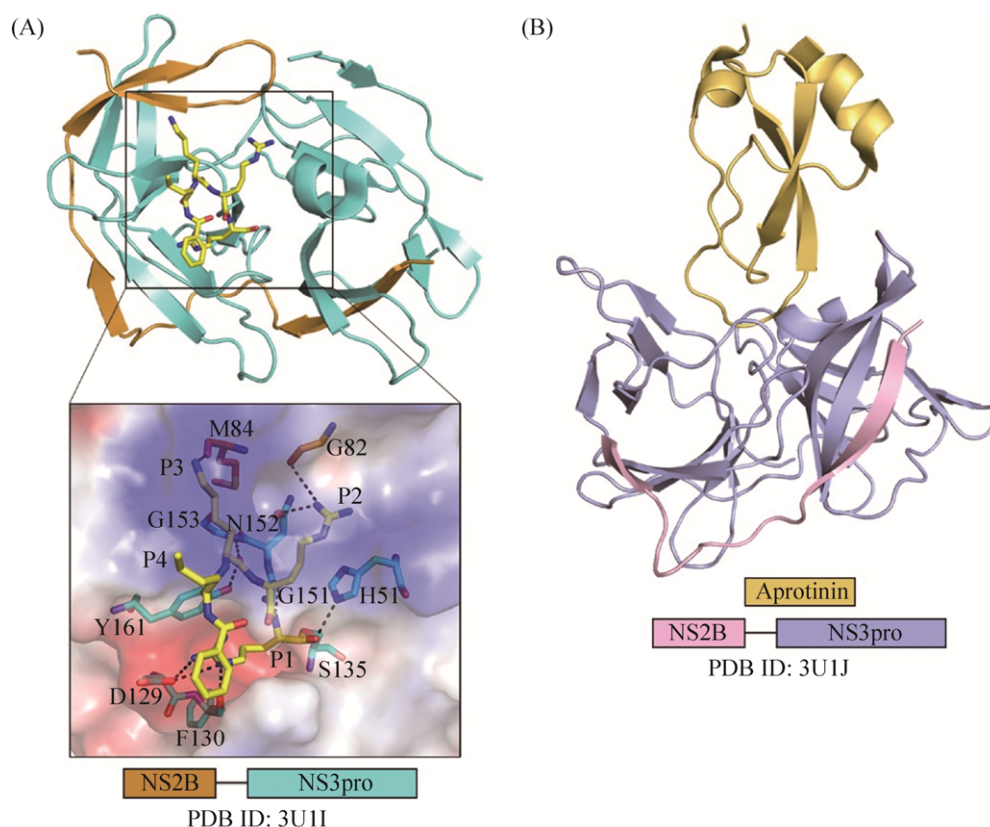


图 3. 登革热Ⅲ型病毒蛋白酶的复合物结构^[8, 35]

Figure 3. Structures of DENV-3 NS2B-NS3pro complexes^[8, 35]. A: Overall structure of DENV-3 NS2B-NS3pro in complex with Bz-Nkrr-H. The interactions between DENV-3 NS2B-NS3pro and the peptide are shown in the figure, hydrogen bonds are labelled as dashes (PDB: 3U1I). B: Structure of DENV-3 NS2B-NS3pro with aprotinin (PDB: 3U1J).

复合物结构中, 氧离子孔洞由 G133、T134 和活性中心 S135 的 NH 基团形成, 水分子和硫酸盐占据氧离子孔洞^[8]。

3 西尼罗病毒(WNV)蛋白酶及其复合物结构研究进展

西尼罗病毒(WNV)能够引起严重的脑炎或脑膜炎等神经疾病, 具有极高的致死率, 目前没有特定药物和临床疫苗可以用于治疗 WNV 感染^[36]。我们介绍 WNV 蛋白酶的 3 种晶体结构: 蛋白酶

母体结构、蛋白酶与 aprotinin 复合物结构、蛋白酶与抑制剂 Naph-KKR-H 复合物结构。虽然这 3 个结构中的信息有所差异, 但其总体构象非常相似。

WNV 蛋白酶与 aprotinin 复合物的晶体结构的整体构象与 DENV-3 蛋白酶 aprotinin 复合物的构象相似, 其活性位点位于 NS3pro 的 N 端和 C 端部分的界面(图 4-B PDB ID: 2IJO), NS2B 片段(64–96 位氨基酸)的 C 端部分形成一个围绕 NS3pro 的带。Aprotinin 占据了蛋白酶的 S2-S2' 所有主要特异性区域, 其主链的 13–19 位氨基酸(PCKARII)和 WNV 的 β 发卡结构形成反向平行的 β 片, 而

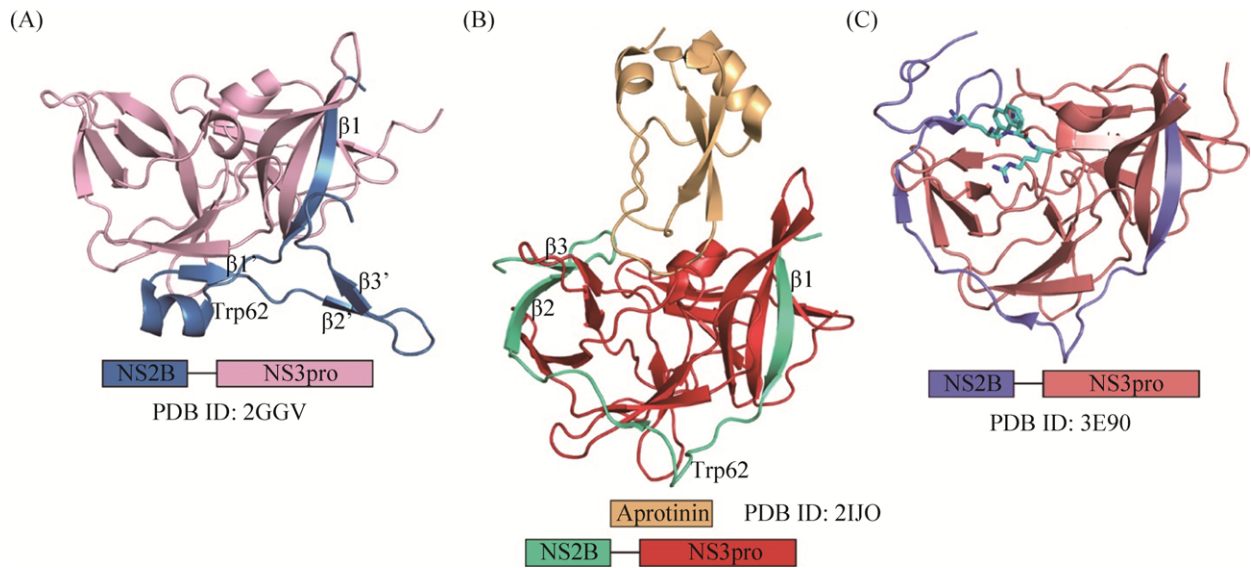


图 4. 西尼罗病毒蛋白酶及其复合物的结构^[37-38]

Figure 4. Structures of WNV NS2B-NS3pro apo-form and complexes^[37-38]. A: The apo form of WNV NS2B-NS3pro (PDB: 2GGV). B: Structure of WNV NS2B-NS3pro in complex with aprotinin (PDB: 2IJO). Trp62 is labeled in free-enzyme and aprotinin-bound structures, the C-terminal conformations after Trp62 in (A) and (B) change significantly. C: Overall structure of WNV NS2B-NS3pro with Naph-KKR-H, Naph-KKR-H is shown in stick (PDB: 3E90).

侧链占据了 S3-S1 和 S1'-S4', Aprotinin 的第二个 loop 36-39 位氨基酸 (GGCR) 也与蛋白酶存在相互作用^[37]。蛋白酶与 Naph-KKR-H 复合物的结构与上述结构相比较, 活性位点存在着重要差异, 特别是活性位点保守氨基酸 His51, 该差异或许可以为抑制剂进入蛋白酶的机制提供参考, 该结构中氧原子(来自水或者配体)在维持活性位点 His51 构象上起重要作用。His51 的构象旋转与活性口袋 P1-O 的方向有关, 推测 P1-O 的方向可能会调控组氨酸构象变化(图 4-C PDB ID: 3E90)^[38]。这些相互作用的信息可能也为设计抗病毒抑制剂提供新的改进方向。

WNV 蛋白酶母体结构与抑制剂复合物结构之间的主要区别在于 NS2B 的构象, 母体结构 NS2B 的 $\beta 1$ 链构象与 aprotinin 复合物中构象一致, 稳定了 NS3pro 的 N 端的 β 片; NS2B 中 Trp62 的构象与 aprotinin 复合物中一致, Trp62 被包埋在 NS3 的 C 端口袋中, 就像是一个“锚”^[37]。有研

究表明, 突变 NS2B 的 Trp62 或者 NS3 的 Gln96(其为 Trp62 的受体口袋残基)会使蛋白酶失活^[23,39]。然而在 Trp62 之后的部分, NS2B 采用不同的构象, 母体结构中在 G70 处由一个螺旋结构让 C 端逆转方向, 并由一个含 4 个氨基酸的 β 链来稳定 NS3pro 的 C 端结构的 β 片, 继续沿着这个方向朝向 NS2B 的 N 端, 即母体结构与抑制剂复合物结构中 NS2B 的 N 端延伸方向相反(图 4-A PDB ID: 2GGV 和 PDB ID: 2IJO)^[37]。虽然两种构象的 NS2B 部分发生了变化, 但 NS3 蛋白酶结构域无明显变化。

WNV 蛋白酶中与底物相互作用的 β 片有助于将底物稳定在活性口袋, 酶与底物主链相互作用是高度保守的^[40]。除了已解析结构中观察到的保守区域, 也有研究提出了 WNV 的全新活性位点^[41], 只是暂无晶体结构, 这同样为药物设计提供了新的指导策略。

4 抑制剂的筛选和研发策略

基于上述结构, 黄病毒属蛋白酶归为两种主要构象: NS2B 辅因子区域无序而形成的开放构象; NS2B 辅因子与 NS3pro 结合形成的闭合构象, 进而催化蛋白酶的活性。基于上述蛋白酶复合物结构中抑制剂对 NS2B-NS3pro 蛋白酶的影响, 结合目前蛋白酶抑制剂开发和抗病毒药物筛选的研究工作, 抑制剂的筛选和研发策略如下。

(1) 设计底物多肽类似物: 底物活性口袋位置是最好的切入点, 将底物多肽添加上亲电子的弹头可以使其转变为靶向的抑制剂, 利用这种方法可以提供非常有效的抑制剂^[17,42-43]。(2) 阻止 NS2B 与 NS3 之间的相互作用: 有研究通过一种定量高通量筛选方法筛选到了抑制剂, 并且证实这些药物可以有效阻断 NS2B 与 NS3 之间相互作用来抑制黄病毒^[44]; 另有研究基于结构提出全新药物设计理念, 使蛋白酶处于“自抑制”状态, 例如设计抑制剂阻止 ZIKV 蛋白酶形成 S1 使蛋白酶处于“自抑制”状态^[18], 设计抑制剂与 DENV 蛋白酶中 NS2B 和 NS3pro 形成分子相对面上的口袋相结合, 使 NS2B 的 β 发卡锁定在适当位置而阻止 NS2B 构象变化抑制蛋白酶活性^[22]。因此, 靶向黄病毒属蛋白酶 NS2B 与 NS3 相互作用位置, 破坏蛋白酶的基本功能, 为抑制剂研发提供了新的方向。(3) 大分子抑制剂形成空间位阻影响底物与蛋白酶的结合: 例如分子量较大的 aprotinin, 其与蛋白酶相互作用后形成空间位阻影响底物与蛋白酶活性位点的结合, 从而抑制蛋白酶的活性^[35]。筛选和设计此类大分子抑制剂也是一种有效的途径。(4) 虚拟筛选: 基于已经解析的蛋白酶结构, 利用计算机建模进行分子对接, 根据活性口袋 S1-S4 的氨基酸偏好性来设计多肽类或非多肽类的抑制剂^[45-46]。有研究表明 ZIKV 蛋白酶 S1 偏

好 L-Arg/L-Lys, S2 偏好 L-Orn (100%)/L-Arg (40%)/L-Lys (38%)/L-Arg(17%), S3 偏好 L-Lys, S4 偏好大部分氨基酸(特别是 D-Lys)^[47]。(5) 高通量筛选: 利用高通量筛选方法从药物库中进行有效抑制剂的筛选, 通过生物物理实验或结构研究进行抑制剂的优化^[46]。

5 讨论与展望

对于黄病毒属的所有成员来讲, 蛋白酶对病毒的复制至关重要, 因此蛋白酶也被认为是最理想的药物靶点。黄病毒蛋白酶需要由 NS2B 和含有催化三联体(H51, D75 和 S135)的 NS3pro 构成, NS2B 的中心辅因子区域的正确折叠对蛋白酶的催化活性是必需的^[24]。鉴于黄病毒的高序列相似度, 这些蛋白酶的结构非常相似, 对比 ZIKV、DENV、WNV 蛋白酶的母体结构, NS2B 部分均呈现自由摆动的灵活构象, NS3pro 结构非常相似(图 5)。

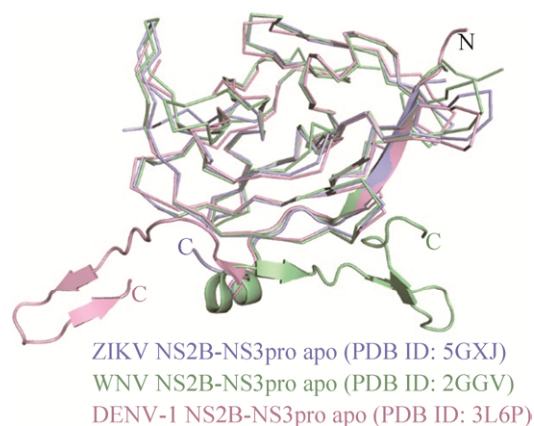


图 5. 黄病毒蛋白酶的结构比较^[18,34,37]

Figure 5. Structural comparison of flavivirus NS2B-NS3pro^[18,34,37]. Structural comparison of NS2B-NS3pro of ZIKV, DENV-1 and WNV. The regions of NS3pro are similar and the C-terminal parts of NS2B are flexible.

虽然有多种蛋白酶抑制剂的筛选和研发方法,但到目前为止没有抑制剂能够进入临床阶段。底物多肽类似物抑制剂细胞活性差、药代动力学弱;通过虚拟筛选和高通量筛选得到的有效抑制剂,活性位点的成药性低,同样表现出较差的细胞活性和较弱的药代动力学^[25,48];而设计靶向全新位点的抑制剂,缺乏工作基础,还需要更长时间的探索。通常情况下,设计可以口服的蛋白酶抑制剂是非常困难的,黄病毒蛋白酶的活性位点底物结合口袋较浅且电荷性高,更是增加了抑制剂设计的难度^[42]。

基于蛋白酶结构的研究可以有效降低这些难度,通过结构信息优化添加弹头的极性多肽,降低其分子量,可以使其转化为潜在药物^[49]。黄病毒蛋白酶结构具有很高的相似性,利用已解析的 ZIKV、DENV 和 WNV 蛋白酶结构,可以相互借鉴而解决很多问题,近期对 ZIKV 蛋白酶的大量结构研究也表明其在抗黄病毒药物设计中的优势。基于结构的药物研发是非常实用的一种策略,我们通过回顾黄病毒属中寨卡病毒、登革热病毒、西尼罗病毒的 NS2B-NS3pro 蛋白酶及其抑制剂复合物的结构研究,希望以目前已解析的黄病毒蛋白酶的结构为基础,为研发抗黄病毒抑制剂和药物提供必要的参考。

参考文献

- [1] Brecher M, Li Z, Liu BB, Zhang J, Koetzner CA, Alifarag A, Jones SA, Lin QS, Kramer LD, Li HM. A conformational switch high-throughput screening assay and allosteric inhibition of the flavivirus NS2B-NS3 protease. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(5): e1006411.
- [2] Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, Tschoeke DA, Schrago CG, Thompson FL, Brasil P, dos Santos FB, Nogueira RMR, Tanuri A, de Filippis AMB. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(6): 653–660.
- [3] Chen LH, Hamer DH. Zika virus: rapid spread in the western hemisphere. *Annals of Internal Medicine*, 2016, 164(9): 613–615.
- [4] Possas C, Brasil P, Marzochi MC, Tanuri A, Martins RM, Marques ET, Bonaldo MC, Ferreira AG, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira RMR, Sequeira PC, Marzochi KB, Homma A. Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2017, 112(5): 319–327.
- [5] Gulland A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. *BMJ*, 2016, 352: i657.
- [6] Lindenbach BD, Thiel HJ, Rice CM. *Flaviviridae: the viruses and their replication*//Knipe DM, Howley PM. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 2007.
- [7] Lim SP, Wang QY, Noble CG, Chen YL, Dong HP, Zou B, Yokokawa F, Nilar S, Smith P, Beer D, Lescar J, Shi PY. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Research*, 2013, 100(2): 500–519.
- [8] Noble CG, Seh CC, Chao AT, Shi PY. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation. *Journal of Virology*, 2012, 86(1): 438–446.
- [9] Verma R, Khanna P, Chawla S. Yellow fever vaccine: an effective vaccine for travelers. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(1): 126–128.
- [10] Yun SI, Lee YM. Japanese encephalitis: the virus and vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, 10(2): 263–279.
- [11] Salam KA, Akimitsu N. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: current and future perspectives. *Biomed Research International*, 2013, 2013: 467869.
- [12] Zika virus outbreaks in the Americas. *Weekly Epidemiological Record*, 2015, 90(45): 609–610.
- [13] Thomas DL, Sharp TM, Torres J, Armstrong PA, Munoz-Jordan J, Ryff KR, Martinez-Quiñones A, Arias-Berríos J, Maysack M, Garayalde GJ, Saavedra S, Luciano CA, Valencia-Prado M, Waterman S, Rivera-García

- B. Local transmission of zika virus—puerto rico, November 23, 2015–January 28, 2016. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016, 65(6): 154–158.
- [14] Meaney-Delman D, Hills SL, Williams C, Galang RR, Iyengar P, Hennenfent AK, Rabe IB, Panella A, Oduyebo T, Honein MA, Zaki S, Lindsey N, Lehman JA, Kwit N, Bertolli J, Ellington S, Igbinosa I, Minta AA, Petersen EE, Mead P, Rasmussen SA, Jamieson DJ. Zika virus infection among U.S. pregnant travelers - August 2015–February 2016. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2016, 65(8): 211–214.
- [15] Oliveira Melo AS, Malinge G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filippis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 2016, 47(1): 6–7.
- [16] Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, Mysorekar IU, Diamond MS. Zika virus infection during pregnancy in mice causes placental damage and fetal demise. *Cell*, 2016, 165(5): 1081–1091.
- [17] Lei J, Hansen G, Nitsche C, Klein CD, Zhang LL, Hilgenfeld R. Crystal structure of Zika virus NS2B-NS3 protease in complex with a boronate inhibitor. *Science*, 2016, 353(6298): 503–505.
- [18] Chen X, Yang KL, Wu C, Chen C, Hu C, Buzovetsky O, Wang ZF, Ji XY, Xiong Y, Yang HT. Mechanisms of activation and inhibition of Zika virus NS2B-NS3 protease. *Cell Research*, 2016, 26(11): 1260–1263.
- [19] Phoo WW, Li Y, Zhang ZZ, Lee MY, Loh YR, Tan YB, Ng EY, Lescar J, Kang CB, Luo DH. Structure of the NS2B-NS3 protease from Zika virus after self-cleavage. *Nature Communications*, 2016, 7: 13410.
- [20] Zhang ZZ, Li Y, Loh YR, Phoo WW, Hung AW, Kang CB, Luo DH. Crystal structure of unlinked NS2B-NS3 protease from Zika virus. *Science*, 2016, 354(6319): 1597–1600.
- [21] Li Y, Zhang ZZ, Phoo WW, Loh YR, Wang WL, Liu S, Chen MW, Hung AW, Keller TH, Luo DH, Kang CB. Structural dynamics of zika virus NS2B-NS3 protease binding to dipeptide inhibitors. *Structure*, 2017, 25(8): 1242–1250.
- [22] Chappell KJ, Stoermer MJ, Fairlie DP, Young PR. Mutagenesis of the West Nile virus NS2B cofactor domain reveals two regions essential for protease activity. *Journal of General Virology*, 2008, 89: 1010–1014.
- [23] Niyomrattanakit P, Winoyanu Wattikun P, Chanprapaph S, Angsuthanasombat C, Panyim S, Katzenmeier G. Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *Journal of Virology*, 2004, 78(24): 13708–13716.
- [24] Luo DH, Vasudevan SG, Lescar J. The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Research*, 2015, 118: 148–158.
- [25] Nitsche C, Holloway S, Schirmeister T, Klein CD. Biochemistry and medicinal chemistry of the dengue virus protease. *Chemical Reviews*, 2014, 114(22): 11348–11381.
- [26] Collins MH, Metz SW. Progress and works in progress: update on flavivirus vaccine development. *Clinical Therapeutics*, 2017, 39(8): 1519–1536.
- [27] Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, Hay SI, Bedi N, Bensenor IM, Castañeda-Orjuela CA, Chuang TW, Gibney KB, Memish ZA, Rafay A, Ukwaja KN, Yonemoto N, Murray CJL. The global burden of dengue: an analysis from the global burden of disease study 2013. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(6): 712–723.
- [28] Duyen HTL, Cerny D, Trung DT, Pang J, Velumani S, Toh YX, Qui PT, van Hao N, Simmons C, Haniffa M, Wills B, Fink K. Skin dendritic cell and T cell activation associated with dengue shock syndrome. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 14224.
- [29] Ivory MO, Birchall JC, Piguat V. Early dengue virus infection in human skin: a cycle of inflammation and infectivity. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(7): 1711–1712.
- [30] Schaeffer E, Flacher V, Papageorgiou V, Decossas M, Fauny JD, Krämer M, Mueller CG. Dermal CD14⁺ dendritic cell and macrophage infection by dengue virus is stimulated by interleukin-4. *Journal of Investigative Dermatology*, 2015, 135(7): 1743–1751.
- [31] Warfield KL, Plummer EM, Sayce AC, Alonzi DS, Tang W, Tyrrell BE, Hill ML, Caputo AT, Killingbeck SS, Beatty PR, Harris E, Iwaki R, Kinami K, Ide D, Kiappes JL, Kato A, Buck MD, King K, Eddy W, Khaliq M, Sampath A, Treston AM, Dwek RA, Enterlein SG, Miller JL, Zitzmann N, Ramstedt U, Shresta S. Inhibition of endoplasmic reticulum glucosidases is required for *in vitro* and *in vivo* dengue

- antiviral activity by the iminosugar UV-4. *Antiviral Research*, 2016, 129: 93–98.
- [32] Tian YS, Zhou Y, Takagi T, Kameoka M, Kawashita N. Dengue virus and its inhibitors: a brief review. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 2018, 66(3): 191–206.
- [33] Erbel P, Schiering N, D'Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2006, 13(4): 372–373.
- [34] Chandramouli S, Joseph JS, Daudenarde S, Gatchalian J, Cornillez-Ty C, Kuhn P. Serotype-specific structural differences in the protease-cofactor complexes of the dengue virus family. *Journal of Virology*, 2010, 84(6): 3059–3067.
- [35] Li J, Lim SP, Beer D, Patel V, Wen DY, Tumanut C, Tully DC, Williams JA, Jiricek J, Priestle JP, Harris JL, Vasudevan SG. Functional profiling of recombinant NS3 proteases from all four serotypes of dengue virus using tetrapeptide and octapeptide substrate libraries. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280(31): 28766–28774.
- [36] Acharya D, Bai F. An overview of current approaches toward the treatment and prevention of west nile virus infection//Colpitts TM. West Nile Virus: Methods and Protocols. New York, NY: Humana Press, 2016: 249–291.
- [37] Aleshin AE, Shiryayev SA, Strongin AY, Liddington RC. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein Science*, 2007, 16(5): 795–806.
- [38] Robin G, Chappell K, Stoermer MJ, Hu SH, Young PR, Fairlie DP, Martin JL. Structure of West Nile virus NS3 protease: ligand stabilization of the catalytic conformation. *Journal of Molecular Biology*, 2009, 385(5): 1568–1577.
- [39] Matusan AE, Kelley PG, Pryor MJ, Whisstock JC, Davidson AD, Wright PJ. Mutagenesis of the dengue virus type 2 NS3 proteinase and the production of growth-restricted virus. *Journal of General Virology*, 2001, 82: 1647–1656.
- [40] Perona JJ, Craik CS. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science*, 1995, 4(3): 337–360.
- [41] Schöne T, Grimm LL, Sakai N, Zhang LL, Hilgenfeld R, Peters T. STD-NMR experiments identify a structural motif with novel second-site activity against West Nile virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Research*, 2017, 146: 174–183.
- [42] Poulsen A, Kang CB, Keller TH. Drug design for flavivirus proteases: what are we missing? *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(21): 3422–3427.
- [43] Steuer C, Gege C, Fischl W, Heinonen KH, Bartenschlager R, Klein CD. Synthesis and biological evaluation of α -ketoamides as inhibitors of the Dengue virus protease with antiviral activity in cell-culture. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2011, 19(13): 4067–4074.
- [44] Li Z, Brecher M, Deng YQ, Zhang J, Sakamuru S, Liu BB, Huang RL, Koetzner CA, Allen CA, Jones SA, Chen HY, Zhang NN, Tian M, Gao FS, Lin QS, Banavali N, Zhou J, Boles N, Xia MH, Kramer LD, Qin CF, Li HM. Existing drugs as broad-spectrum and potent inhibitors for Zika virus by targeting NS2B-NS3 interaction. *Cell Research*, 2017, 27(8): 1046–1064.
- [45] Li LF, Basavannacharya C, Chan KWK, Shang LQ, Vasudevan SG, Yin Z. Structure-guided discovery of a novel non-peptide inhibitor of dengue virus NS2B-NS3 protease. *Chemical Biology & Drug Design*, 2015, 86(3): 255–264.
- [46] Lee H, Ren JH, Nocadello S, Rice AJ, Ojeda I, Light S, Minasov G, Vargas J, Nagarathnam D, Anderson WF, Johnson ME. Identification of novel small molecule inhibitors against NS2B/NS3 serine protease from Zika virus. *Antiviral Research*, 2017, 139: 49–58.
- [47] Rut W, Zhang LL, Kasperkiewicz P, Poreba M, Hilgenfeld R, Drąg M. Extended substrate specificity and first potent irreversible inhibitor/activity-based probe design for Zika virus NS2B-NS3 protease. *Antiviral Research*, 2017, 139: 88–94.
- [48] Yin Z, Patel SJ, Wang WL, Wang G, Chan WL, Rao KRR, Alam J, Jeyaraj DA, Ngew X, Patel V, Beer D, Lim SP, Vasudevan SG, Keller TH. Peptide inhibitors of dengue virus NS3 protease. Part 1: warhead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2006, 16(1): 36–39.
- [49] Kang CB, Keller TH, Luo DH. Zika virus protease: an antiviral drug target. *Trends in Microbiology*, 2017, 25(10): 797–808.

Research progress on structure of Flavivirus NS2B-NS3 protease

Chen Wu, Haitao Yang, Zefang Wang*

School of Life Sciences, Tianjin University, Tianjin 300072, China

Abstract: Flavivirus infection causes severe human disease, but no specific drugs are available to treat flavivirus infection. The N terminal region of non-structural protein 3 (NS3) of flavivirus and its cofactor NS2B constitute protease, and the polyprotein produced by virus is cleaved by protease into structural and non-structural proteins that are essential for the replication of the virus. NS2B-NS3pro represents an attractive drug target due to its critical role in the life cycle of flavivirus. Here we review the structural advances of NS2B-NS3pro of Zika Virus, Dengue Virus and West Nile Virus as well as the complex structures of some protease with inhibitors, these will provide necessary references for the future antiviral drug design.

Keywords: flavivirus, protease, inhibitor, crystal structure

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Basic Research Program of China (973) (2015CB859800)

*Corresponding author. E-mail: zefangwang@tju.edu.cn

Received: 13 May 2018; Revised: 8 October 2018; Published online: 6 March 2019