



# 蜚传脑炎病毒非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5 的研究进展

王丰, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方\*

天津大学生命科学学院, 天津 300072

王丰, 肖云杰, 杨海涛, 王泽方. 蜚传脑炎病毒非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5 的研究进展[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3441-3454.  
WANG Feng, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang. Research progress in non-structural proteins NS2B-NS3 and NS5 of tick-borne encephalitis virus[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2023, 63(9): 3441-3454.

**摘要:** 蜚传脑炎病毒是引起严重的中枢神经系统疾病蜚传脑炎的病原体, 每年在欧洲、俄罗斯远东地区、日本和中国北部报道的蜚传脑炎病例数约为 10 000–12 000 例, 且在我国和多个欧洲国家的发病率逐渐增高, 正成为人类健康的潜在危害。主动免疫是预防蜚传脑炎的有效措施, 包括我国在内的多个国家已研制出安全性较高的疫苗, 但在我国流行省份的疫苗接种较为有限, 特异性抗病毒药物的研发或许是治疗蜚传脑炎病毒感染的研究方向之一。蜚传脑炎病毒非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5 因为在病毒基因组复制、加帽和宿主免疫调节中的重要作用, 成为关键的抗病毒药物研发靶点。本文综述了蜚传脑炎病毒非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5 的三维结构和抑制剂研发工作, 为深入探究该病毒感染的分子机制和抗病毒药物研发提供参考。

**关键词:** 蜚传脑炎病毒; 非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5; 三维结构; 抑制剂

资助项目: 国家自然科学基金(31970048)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31970048).

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

Received: 2023-02-06; Accepted: 2023-05-04; Published online: 2023-05-08

# Research progress in non-structural proteins NS2B-NS3 and NS5 of tick-borne encephalitis virus

WANG Feng, XIAO Yunjie, YANG Haitao, WANG Zefang\*

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

**Abstract:** Tick-borne encephalitis virus is the pathogen of tick-borne encephalitis, which causes severe central nervous system symptoms. The number of tick-borne encephalitis cases reported annually in Europe, Russian Far East, Japan, and northern China reaches 10 000–12 000, and the incidence is gradually increasing in China and several European countries. This disease is becoming a potential hazard to human. Active immunization is an effective measure to prevent infection, and vaccines with high safety have been developed in multiple countries including China. However, the vaccination is limited in the provinces where tick-borne encephalitis is popular. The design of specific antivirals may be a feasible way for the treatment of this disease. The non-structural proteins NS2B-NS3 and NS5 of tick-borne encephalitis virus play key roles in viral genome replication, capping, and host immunomodulation, thus becoming key targets for antiviral development. In this review, we outlined the three-dimensional structures and the development of inhibitors of NS2B-NS3 and NS5 of tick-borne encephalitis virus. This review provides a reference for probing into the molecular mechanism of tick-borne encephalitis virus infection and the development of antivirals.

**Keywords:** tick-borne encephalitis virus; non-structural proteins NS2B-NS3 and NS5; three-dimensional structure; inhibitors

蜱传脑炎病毒(Tick-borne encephalitis virus, TBEV)属于黄病毒科黄病毒属<sup>[1]</sup>,是引起人畜共患病蜱传脑炎(Tick-borne encephalitis, TBE)的病原体。人类感染 TBEV 主要通过被病毒感染的蜱虫叮咬,其次也可经消化道途径和器官移植途径感染<sup>[2-3]</sup>。TBEV 感染后无症状者的比例约为 70%–98%<sup>[4-5]</sup>,有症状者的临床表现多为脑膜炎、脑炎、脊髓炎和脊髓瘫痪等中枢神经系统疾病<sup>[5]</sup>。TBE 的致病性和死亡率因病毒亚型而异, TBEV 依抗原性和序列差异主要分为欧洲亚型(European, TBEV-Eu)、西伯利亚亚型(Siberian, TBEV-Sib)和远东亚型(Far-Eastern, TBEV-FE),最近还发现了贝加尔亚型(Baikalian, TBEV-Bkl)

和喜马拉雅亚型(Himalayan, TBEV-Him)<sup>[6]</sup>。TBEV-FE 致病性最强,死亡率高达 40%, TBEV-Eu 和 TBEV-Sib 致病性相对较弱,死亡率约为 0.5%–3%<sup>[7-8]</sup>。TBE 流行于欧洲和亚洲东北部的森林地区,我国 TBE 病例主要分布于东北流行区(黑龙江省、吉林省和内蒙古自治区)、西北流行区(新疆维吾尔自治区)和西南流行区(云南省)<sup>[9]</sup>。TBE 虽不属于我国法定报告传染病,但属于我国职业性传染病和黑龙江省自行管理的乙类传染病。2007 年 1 月至 2018 年 12 月,中国疾病预防控制中心信息系统(CISDCP)共报告大陆医疗机构诊断的 TBE 病例 3 364 例,89.92%的病例分布于东北流行区<sup>[10]</sup>。主动免疫

是预防 TBE 的有效措施,但在我国流行省份的疫苗接种较为有限,未来的疫苗投放和免疫宣传等工作任重而道远<sup>[9]</sup>。特异性抗病毒药物的研发可能是治疗 TBEV 感染的研究方向之一。

TBEV 是具有脂包膜的单股正链 RNA 病毒,直径约为 50 nm,基因组长为 11 kb,包括一个 5'-帽子和开放阅读框(open reading frame, ORF), ORF 的两侧为 5'-和 3'-非编码区(noncoding region, NCR)。ORF 编码病毒单一的多聚蛋白,该多聚蛋白经共翻译和翻译后加工,形成 3 种结构蛋白(structural protein, SP)和 7 种非结构蛋白(non-structural protein, nSP)<sup>[11-12]</sup>(图 1)。三种结构蛋白分别为衣壳蛋白(capsid, C),前膜蛋白(precursor of membrane, prM)和包膜蛋白(envelope, E),结构蛋白与病毒吸附、侵入和病毒颗粒的组装有关<sup>[13]</sup>。七种非结构蛋白分别为 NS1、NS2A、NS2B、NS3、NS4A、NS4B 和 NS5,非结构蛋白和病毒复制、病毒与宿主细胞的相互作用密切相关<sup>[14]</sup>。这些非结构蛋白的关键作用,使其成为非常有前途的抗黄病毒药物研发靶点<sup>[15]</sup>。目前 TBEV 非结构蛋白中 NS3 解旋酶(NS3 helicase, NS3H)、NS5 甲基转移酶(NS5 methyltransferase, NS5 MTase)和 NS5 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(NS5 RNA dependent RNA polymerase, NS5 RdRp)的结构已相继解析,同时

开展的抑制剂和生物学功能研究,共同推动了抗 TBEV 特异性药物的研发。本文对 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶、NS3H、NS5 MTase 和 NS5 RdRp 的三维结构、功能和抑制剂研究进行综述,为深入探究 TBEV 生物学功能和抗病毒药物研究提供参考。

## 1 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的研究进展

TBEV NS2B-NS3 蛋白酶与寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、西尼罗河病毒(West Nile virus, WNV)和登革热病毒(Dengue virus, DENV)等黄病毒属 NS2B-NS3 蛋白酶均为典型的丝氨酸蛋白酶<sup>[16]</sup>。TBEV NS2B 是含有 131 位氨基酸的跨膜蛋白,其 N-端和 C-端分别为跨膜区域,中央约 40 位氨基酸组成亲水区域,该亲水区域是 NS3 N-端蛋白酶结构域的辅因子,与蛋白酶的正确折叠和催化活性密切相关<sup>[17]</sup>。TBEV NS3 是由 621 位氨基酸组成的多功能蛋白,其 N-端 176 位氨基酸为蛋白酶结构域, C-端 445 位氨基酸为解旋酶结构域<sup>[18]</sup>。TBEV NS2B-NS3 蛋白酶由 NS2B 的亲水区域和 NS3 蛋白酶结构域共同组成,该蛋白酶和宿主细胞蛋白酶共同切割 TBEV 多聚蛋白,形成有功能的结构蛋白和非结构蛋白,是病毒完成生命周期的必要条件,因此该蛋

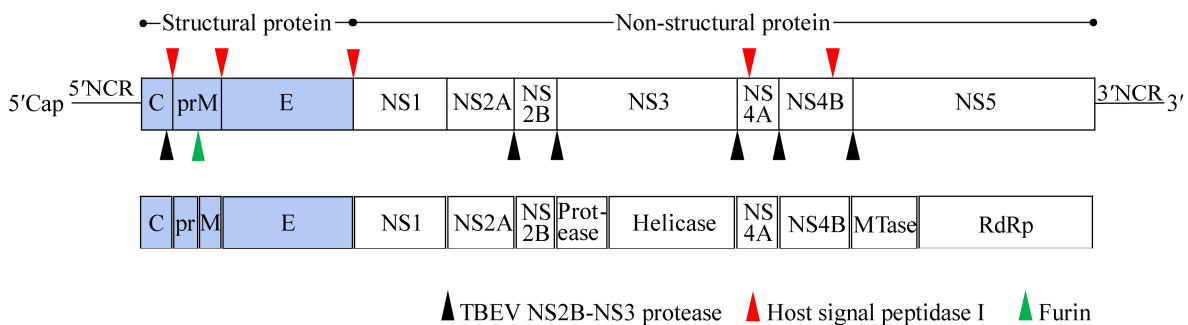


图 1 TBEV 基因组结构和多聚蛋白的切割<sup>[12]</sup>

Figure 1 Genomic organization for TBEV and the cleavage of polyprotein<sup>[12]</sup>.

白酶成为关键的药物靶点。此外，黄病毒 NS2B-NS3 蛋白酶还切割 C 蛋白的 C-端，参与调节病毒粒子的组装过程<sup>[19]</sup>。当前，以 HIV 和 HCV 蛋白酶为靶点研发的药物已批准上市<sup>[20-21]</sup>。

TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的晶体结构尚未解析，针对该蛋白酶的抑制剂和功能研究主要基于建模得到的结构开展。2021 年，Akaberi 研究团队<sup>[22]</sup>对 TBEV Saringe-2009 毒株的 NS2B-NS3 蛋白酶进行三维结构建模。建模结果中的模型“23”具有良好的立体化学性质，其主链与 WNV (PDB: 5IDK)、ZIKV (PDB: 5GPI)和 DENV-3 (PDB: 3U1I) NS2B-NS3 蛋白酶主链进行比对，均方根偏差(root-mean-square deviation, RMSD)分别为 0.73、0.77 和 0.84 Å (图 2A–2C)，由此作为结构分析和抑制剂筛选的模板。模型“23”的活性口袋由 S1'、S1、S2 和 S3 这 4 个亚口袋组成，S1 和 S2 亚口袋带负电荷，倾向与带正电荷的肽类抑制剂结合(图 2D)。S1 和 S2 亚口袋分别包含极其保守的带负电荷的氨基酸残基 Asp75 和 Asp129，其中作为催化三联体之一的 Asp75 在催化过程中主要起稳定中间过渡态的作用；在 DENV-3 NS2B-NS3 蛋白酶与底物 Bz-nKRR-H 的复合物结构(PDB: 3U1I)中，Asp129 和底物 P1 位 Arg 产生电荷-电荷相互作用，促进复合物封

闭构象的形成<sup>[23]</sup>。Asp75 和 Asp129 对 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶活性的发挥也可能具有重要作用。此外，模型“23”的活性口袋体积约为 1 291 Å<sup>3</sup>，与 WNV (1 141 Å<sup>3</sup>)、ZIKV (1 184 Å<sup>3</sup>)和 DENV-3 (1 191 Å<sup>3</sup>) NS2B-NS3 蛋白酶的活性口袋体积相当<sup>[24-25]</sup>，活性口袋的电荷性质和体积等都提示泛黄病毒蛋白酶抑制剂很可能抑制 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶活性。

基于模型“23”的分子对接和体外酶活试验，3 种三肽化合物 Compound 86、104 和 6C 对 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的 IC<sub>50</sub> 分别为 (0.92±0.01) μmol/L、(0.97±0.06) μmol/L 和 (3.72±0.10) μmol/L。抑制作用可能是三肽化合物与 S1 亚口袋关键氨基酸 Asp75 相互作用，影响蛋白酶催化功能的发挥，从而抑制蛋白酶活性；此外，三肽化合物 Arg 的羰基朝向氧阴离子洞，可能破坏氧阴离子洞的稳定性<sup>[22]</sup>。这 3 种化合物是迄今为止首次报道的 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂，为 TBEV 和泛黄病毒 NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂的研发提供参考。同年，Cihlova 研究团队<sup>[26]</sup>建立了一种基于荧光共振能量转移原理的 RNA 病毒高通量抑制剂筛选体系，以 SARS-CoV-2 PLpro 和 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶为例，验证了该体系的有效性和多功能性。文中

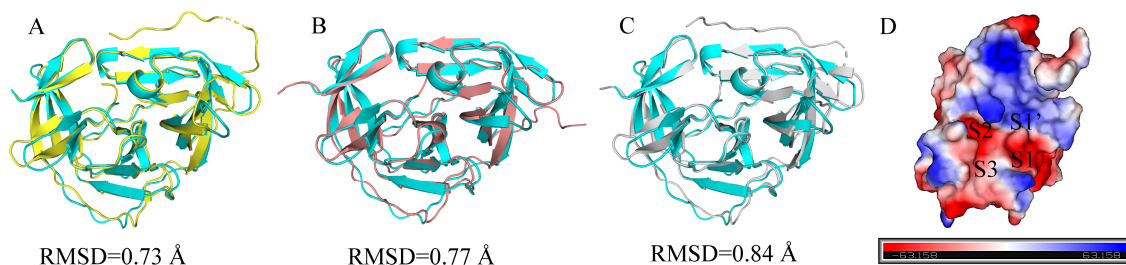


图 2 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶建模结构<sup>[22]</sup>

Figure 2 Molding structure of TBEV NS2B-NS3 protease<sup>[22]</sup>. A–C: Structural comparison of TBEV NS2B-NS3 protease (cyan) with WNV (yellow, PDB: 5IDK), ZIKV (pink, PDB: 5GPI), and DENV-3 (grey, PDB: 3U1I) NS2B-NS3 proteases. D: Electrostatic surface potential of TBEV NS2B-NS3 protease molding structure.

选择胰蛋白酶抑制剂 aprotinin (抑肽酶)、DTNB [5,5'-二硫代双(2-硝基苯甲酸)]和 leupeptin (亮肽素)进行 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶抑制剂筛选, aprotinin 和 DTNB 对 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶具有抑制作用,  $IC_{50}$  分别为 $(1.80 \pm 0.20) \mu\text{mol/L}$  和  $(303.00 \pm 54.00) \mu\text{mol/L}$ , 但抑制机制尚未探明。Aprotinin 含有 58 个氨基酸, 2007 年, Aleshin 研究团队<sup>[27]</sup>发现 aprotinin 以“诱导契合”机制通过底物模拟的方式结合至 WNV NS2B-NS3 蛋白酶的活性位点, 占据 S2'-S2 特异性口袋, 抑制多肽底物的结合和随后水解反应的发生。2016 年, Ang 研究团队<sup>[28]</sup>保留与 WNV NS2B-NS3 蛋白酶结合的 aprotinin 关键残基, 在这由 14 个关键氨基酸残基组成的多肽内部引入二硫键, 得到刚性提高的环肽, 该环肽对 WNV NS2B-NS3 蛋白酶的抑制作用与完整的 aprotinin 相当, 提示抑制剂的截短和环化策略可用于蛋白酶多肽抑制剂的设计。

相较于其他黄病毒属 NS2B-NS3 蛋白酶, TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的三维结构尚未解析, 无法从原子层面揭示该蛋白酶的作用机制, 这可能是后续抑制剂研发中的关键阻碍。正如在同等试验体系下切割同种荧光底物 Bz-nKRR-AMC 的酶活试验中, ZIKV NS2B-NS3 蛋白酶的催化效率( $k_{\text{cat}}/K_m$ )约为 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的 4 305 倍<sup>[22]</sup>, 提示了 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的活性口袋很可能存在独特之处, 或许是口袋周围某些氨基酸产生空间位阻, 或许是底物结合口袋过于平坦不利于底物结合, 具体机制目前不得而知, 这可能是未来 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶活性研究中的重点。近年来, 本团队也开展了黄病毒属 NS2B-NS3 蛋白酶相关研究, 如解析了 apo-ZIKV NS2B-NS3 蛋白酶结构(PDB: 5GXJ)、提出了“自抑制”机制和建立了抗 ZIKV 药物筛选平台等<sup>[29-30]</sup>, 不仅为 ZIKV 抑制剂研发提供了思

路, 也为 TBEV NS2B-NS3 蛋白酶的相关研究提供参考。

## 2 TBEV NS3H 的研究进展

TBEV NS3H 由 NS3 C-端 445 位(177-621)氨基酸组成, TBEV NS3H 属于超家族 2 (superfamily 2, SF2)解旋酶, 解旋酶将双链 RNA 解链为单链 RNA, 是随后 NS5 聚合酶发挥活性的前提<sup>[31]</sup>。TBEV NS3H 还具有核苷三磷酸酶 (nucleotide triphosphatase, NTPase)和 RNA 5'-三磷酸酶(RNA 5'-triphosphatase, RTPase)等多重功能, 在病毒基因组复制中至关重要<sup>[32]</sup>。2020 年, 本团队的 Chen 等<sup>[33]</sup>首次解析了 apo-TBEV NS3H 三维空间结构, 整体呈现为三叶草形状。apo-TBEV NS3H 由 Domain I, II, III 这 3 个结构域组成, 各个结构域之间由 loop 连接。Domain I、II 呈高度保守的 RecA 样折叠, Domain I、II 中共存在的 7 个 motif (motif I-VII)是完成 RNA 解链、水解 ATP 和水解 5'-三磷酸功能所必需的, 其中 TBEV NS3H 的 Glu291 可能参与二价金属离子的识别, Arg463 和 Arg466 可能参与 NTP 三磷酸部分的固定。此外, TBEV NS3H Domain III 与 Domain I 和 II 表面带有正电荷的通道是 RNA 的结合位点<sup>[33-34]</sup>。首次解析的 apo-TBEV NS3H 三维空间结构为探究 TBEV NS3H 水解 ATP 和解链 RNA 的协同作用机制奠定基础。

2022 年, Anindita 研究团队<sup>[35]</sup>利用 X 射线晶体学捕捉到 TBEV NS3H 水解 ATP 的 4 种结构, 基于结构提出 TBEV NS3H 的 ATP 水解循环机制(图 3A-3C):(1) 预水解, 即 ATP 分子与 TBEV NS3H 结合的水解激发态 NS3H-AMPPNP-Mn<sup>2+</sup> (PDB: 7BM0); (2) 水解后中间体, 即结合 ATP 水解物 ADP-Pi 的水解中间态 NS3H-ADP-Pi-Mn<sup>2+</sup> (PDB: 7NXU); (3) 产物解离中间体, 即 ATP 水解物 ADP-Pi 释放 Pi 后结合 ADP 的水解

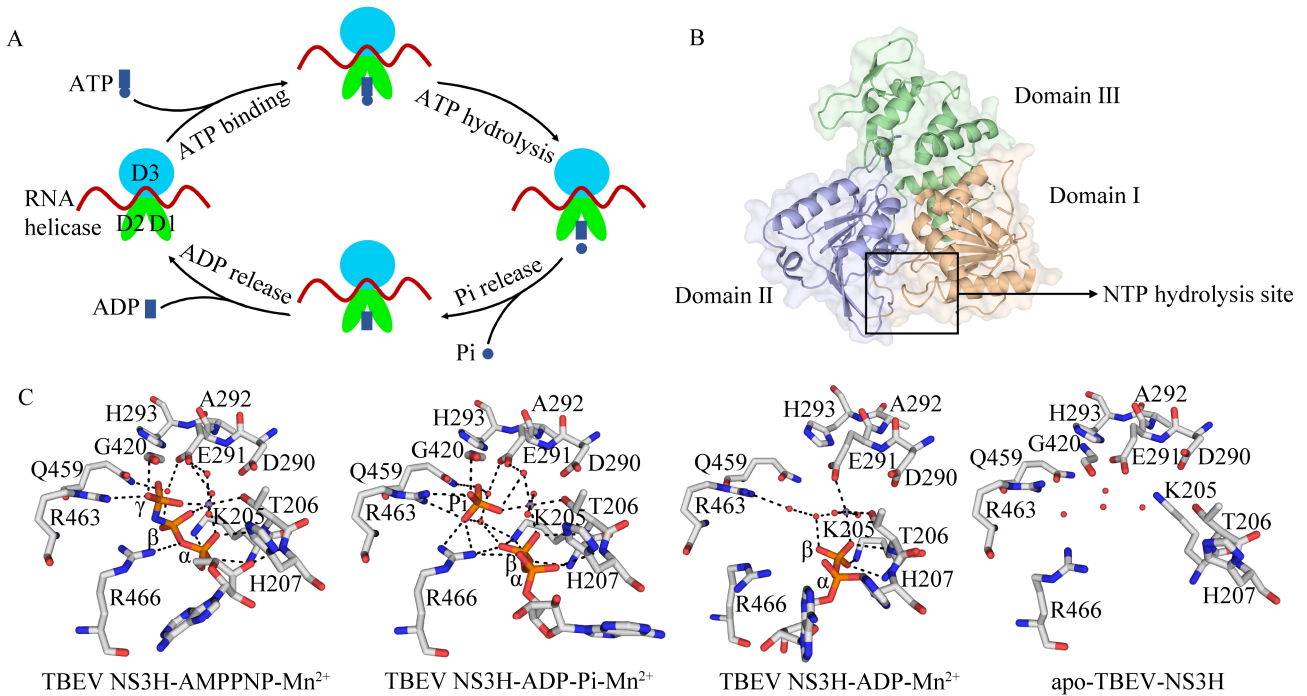


图3 TBEV NS3H 三维空间结构<sup>[35]</sup>

Figure 3 Structure of TBEV NS3 helicase<sup>[35]</sup>. A: ATP hydrolysis mechanism of the TBEV NS3H. Domain I (D1) and Domain II (D2) in green, Domain III (D3) in cyan, RNA and ATP/ADP/Pi in red and blue. B: Overall structure of apo-TBEV-NS3H (PDB: 7OJ4). Black box represents NTP hydrolysis site, and Domain I, II, III are colored wheat, blue, and green. C: Interactions within nucleotide-binding site in apo and nucleotide-bound complexes. Important residues in the NTPase site are shown in sticks. The Mn<sup>2+</sup> and water molecules are represented as purple and red spheres. Hydrogen bonds and metal ion coordination are displayed as black dashed lines.

态 NS3H-ADP-Mn<sup>2+</sup> (PDB: 7BLV); (4) 无核苷酸结合的产物释放态, 即 apo-NS3H (PDB: 7OJ4), 该状态准备与 ATP 结合。此外, 通过建模和分子动力学模拟, 确定了 TBEV NS3H 与单链 RNA 结合的 3 个关键氨基酸(Arg231、Arg274 和 Lys394)。Anindita 团队的研究为 TBEV NS3H 的 ATP 水解循环和 RNA 的结合提供了结构和机制上的见解, 对 TBEV NS3H 靶点的药物研发奠定理论基础。

虽然目前黄病毒 NS3 解旋酶结构域的结构研究广泛开展, 但该靶点的抑制剂研发较为缓慢。以 HCV 为例, HCV NS3 解旋酶抑制剂研发的主要挑战是该解旋酶结构域与细胞马达蛋

白结构相似, 靶向 HCV NS3 解旋酶的抑制剂也可能影响细胞蛋白质的正常功能, 产生细胞毒性<sup>[36]</sup>。关于 TBEV NS3H 抑制剂研发工作相对较少, 2009 年, Singh 研究团队<sup>[37]</sup>对 TBEV NS3H 同源建模, 利用分子对接进行抑制剂的虚拟筛选, 其中 levovirin (左旋韦林)、ribamidine 和 ribavirin (利巴韦林)与 TBEV NS3H 的亲合力较强, 结合能(binding energy)分别为-15.44、-15.34 和-16.13 kcal/mol, 虽然 3 种抑制剂对 TBEV NS3H 的抑制机制尚未探明, 但对 NS3H 抑制剂研发提供良好的起点。2012 年, Mastrangelo 研究团队<sup>[38]</sup>发现广泛使用的抗寄生虫药物 ivermectin (伊维菌素)非竞争性抑制黄病毒属解旋酶, 在



RNA 合成的初始阶段发挥抗病毒活性。Ivermectin 对 TBEV NS3H 也具有抑制作用,  $EC_{50}$  为  $0.2 \mu\text{mol/L}$ 。

黄病毒属解旋酶由于其多功能性在病毒基因组复制中发挥不可取代的作用, 在抗病毒研究中至关重要。2019 年之前报道的黄病毒属解旋酶研究主要针对蚊媒黄病毒开展, 对蜱媒黄病毒解旋酶的结构和功能研究相对较少。2020 年本团队首次解析了 apo-TBEV NS3H 结构, 从原子水平揭示了 TBEV NS3H 的关键特征<sup>[33]</sup>。2022 年 Anindita 研究团队提出的 TBEV NS3H ATP 水解机制为探究 TBEV NS3H 的功能提供了更深入的见解<sup>[35]</sup>。在此基础之上, 未来还可利用 X 射线晶体学开展 TBEV NS3H 与 RNA 和 ATP 的三元复合物结构研究, 揭示 RNA 诱导的变构作用和 ATP 水解机制之间的关联。

### 3 TBEV NS5 的研究进展

NS5 是黄病毒编码的最大和最保守的蛋白质, TBEV NS5 执行两种独立的酶功能, 即 N-端 MTase 功能和 C-端 RdRp 功能, 两个结构域间由 10 个氨基酸残基自然连接而成。TBEV NS5 MTase 负责病毒 RNA 5'帽子的甲基化, 以稳定 RNA 并产生先天免疫逃逸<sup>[39]</sup>。TBEV NS5 RdRp 主要负责病毒 RNA 的复制, 除了聚合酶功能外还与免疫调节、细胞极性等作用有关<sup>[40-42]</sup>。在免疫调节方面, 2018 年, Zheng 研究团队<sup>[40]</sup>发现在人脑胶质母细胞瘤细胞系和原代星形胶质细胞中, TBEV NS5 RdRp 以依赖 RIG-I/MDA5 的方式激活干扰素调节因子 3 (IRF-3)信号通路, 导致 IRF-3 核转位与 RANTES 启动子结合, 诱导 RANTES 表达, 而 RANTES 有效地募集  $CD4^+$ T 细胞, 可能导致人体感染 TBEV 时引起神经细胞功能障碍, 并可能产生脑损伤。在细胞极性研究中, scribble (scrib)蛋白是一种保守的细

胞极性调节因子, 在控制组织生长、分化和定向细胞迁移等方面发挥关键作用, scribble 作为支架蛋白通过其 4 个 PDZ 结构域介导一系列不同的细胞信号通路, 具有抗肿瘤特性<sup>[43]</sup>。TBEV 等病毒可与 scribble 相互作用, 建立支持病毒复制的细胞环境, 与病毒感染后的预后不良有关<sup>[44]</sup>。2022 年, Javorsky 研究团队<sup>[41]</sup>通过等温滴定量热法证实 TBEV NS5 RdRp 通过 C-端 PDZ 结合基序(PBM)与 scribble 的 PDZ3 互作, 而非以往研究认为的只有 TBEV NS5 RdRp 内部 PBM 能与 scribble 的 PDZ4 相互作用<sup>[45]</sup>, 并通过 RdRp C-端 PBM 与 scribble PDZ3 的高分辨晶体结构揭示了详细的互作模式, 该发现为剖析 TBEV 的致病机制和细胞极性信号等提供了有力依据。TBEV NS5 在病毒复制和宿主免疫反应调节中的重要作用, 使其成为抗病毒抑制剂研发极具吸引力的靶点<sup>[42]</sup>。

#### 3.1 TBEV NS5 MTase 的研究进展

TBEV NS5 共 903 位氨基酸, N-端 264 位氨基酸组成 MTase 结构域。TBEV NS5 MTase 具有鸟苷酸转移酶(guanylyltransferase, GTase)活性, 参与形成  $G5'$ -PPP- $5'A$  连接, 并以 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)为甲基供体完成病毒 RNA 帽子结构的 N-7 甲基化和 2'-O 甲基化<sup>[46]</sup>。2021 年, Yang 研究团队<sup>[47]</sup>首次解析了结合 SAM 的 TBEV NS5 MTase 三维空间结构(PDB: 7D6M)。每个不对称单位含有 2 个 MTase 分子, 其构象与已报道的黄病毒属 MTase 相似, 均由 N-端亚结构域、核心亚结构域和 C-端亚结构域三部分组成(图 4A)。核心亚结构域呈罗斯曼折叠(Rossmann fold), 包括两侧的 4 个  $\alpha$  螺旋( $\alpha X$ ,  $\alpha A$ ,  $\alpha D$ ,  $\alpha E$ )和中央的 7 个  $\beta$  折叠片( $\beta 1$ - $\beta 7$ ), 其中  $\beta 1$ 、 $\beta 2$  和  $\alpha A$  参与 SAM 结合口袋的组成<sup>[48]</sup>。TBEV NS5 MTase 的 Ser56、Trp87、His110、Asp131、Val132 和 Asp146 与 SAM 形成氢键, Gly58、Gly81、

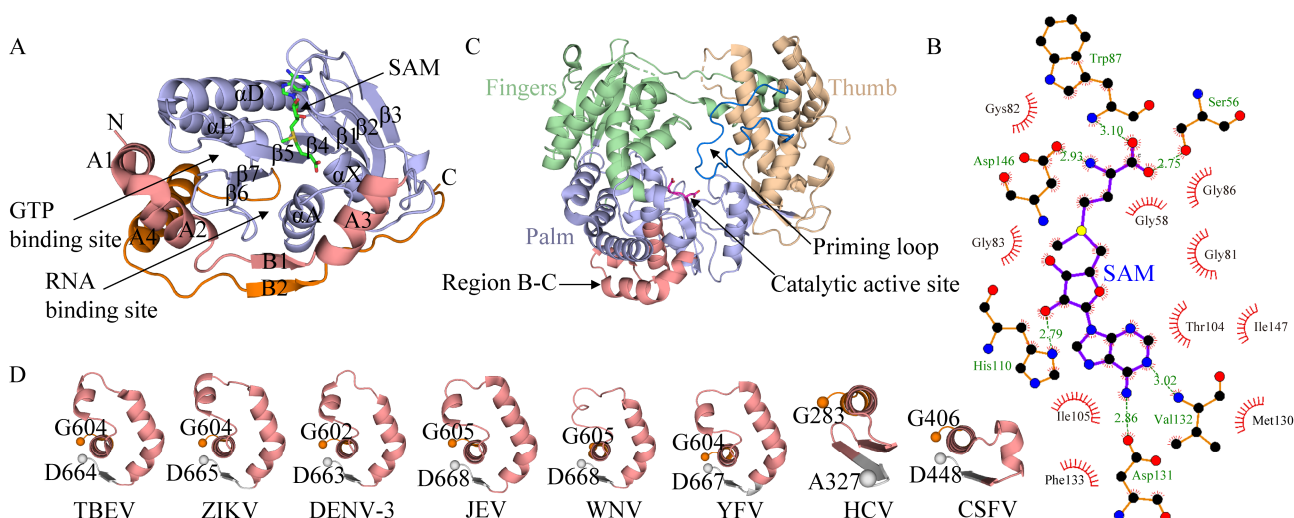


图 4 TBEV NS5 MTase 和 RdRp 的三维空间结构<sup>[47]</sup>

Figure 4 Structure of TBEV NS5 MTase and RdRp<sup>[47]</sup>. A: Complex structure of TBEV NS5 MTase with SAM (PDB: 7D6M), and SAM is presented as sticks. N-terminal subdomain, core subdomain, and C-terminal subdomain are shown in pink, blue, and orange. B: The interaction model of SAM with TBEV NS5 MTase<sup>[49]</sup>. Amino acid residues involved in the formation of hydrogen bonds are displayed as ball-and-stick models, and hydrogen bonds are shown as green dotted lines. Amino acid residues involved in the formation of hydrophobic interaction are represented by red eyelashes. C: Overall structure of TBEV RdRp (PDB: 7D6N). TBEV RdRp has right-hand conformation comprising fingers (green), palm (blue), and thumb (wheat) subdomains, and region B-C in pink. D: The structure of region B-C of *Flaviviridae* NS5 RdRps. The region B-C of TBEV (PDB: 7D6N), ZIKV (PDB: 5U0C), DENV-3 (PDB: 2J7U), JEV (Japanese encephalitis virus, PDB: 4MTP), WNV (PDB: 2HFZ), YFV (Yellow fever virus, PDB: 6QSN), HCV (Hepatitis C virus, PDB: 3MWV), CSFV (Classical swine fever virus, PDB: 5Y6R) are shown as cartoon structures. Motif B in orange, region B-C in pink, and motif C in grey.

Cys82、Gly83、Gly86、Thr104、Ile105、Met130、Phe133 和 Ile147 与 SAM 形成疏水相互作用，共同参与 SAM 的固定<sup>[49]</sup>(图 4B)。此外，催化四联体 Lys61-Asp146-Lys183-Glu219 (K-D-K-E) 在黄病毒属中高度保守，完整的 K-D-K-E 基序对于 2'-O 甲基化必不可少，但 N-7 甲基化只需要 Asp 146，其他 3 个氨基酸促进 N-7 甲基化，但不是必需的<sup>[50]</sup>。

黄病毒属 NS5 MTase 在稳定病毒 mRNA 和进行有效翻译中的关键作用，使其成为抑制剂研发的重要靶点之一，但依赖 SAM 的 MTase 核心亚结构域在宿主 MTase 和病毒 MTase 之间是保守的，因此在不影响宿主 MTase 活性的前提下，研发选择性抑制黄病毒属 MTase 的抑制剂具有

挑战性。2010 年，Dong 研究团队<sup>[51]</sup>发现黄病毒属 MTase 的 SAM 结合口袋旁边存在一个疏水空腔，该空腔在黄病毒属 MTase 中是保守的，但在宿主 MTase 中不存在。2011 年，Lim 研究团队<sup>[52]</sup>设计的 SAM 类似物 Compound 10 靶向该疏水空腔，选择性地抑制黄病毒 MTase，但 Compound 10 需要提高细胞渗透性，才可能在细胞培养中实现抗病毒活性。

TBEV NS5 MTase 与 SAM 的复合物结构解析后，未来有很多工作可以开展。例如，SAM 作为甲基供体，甲基化反应产物为 S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)，TBEV NS5 MTase 在催化过程中结合底物和产物发生的构象变化还不清楚，未



来可探索结合不同底物时 MTase 的构象变化, 为完整的 TBEV NS5 MTase 催化机制的提出提供原子水平的依据。其次, 以 TBEV NS5 MTase 为靶点的抑制剂研究尚无文献报道, 基于结构的抑制剂筛选工作也可能成为未来 TBEV NS5 MTase 研究的又一方向。

### 3.2 TBEV NS5 RdRp 的研究进展

TBEV NS5 C-端 628 位(275–903)氨基酸为 RdRp 结构域, RdRp 的功能是以 TBEV RNA 为模板, 无需引物合成子链 RNA, 是病毒基因组复制和转录的核心。2021 年, Yang 研究团队<sup>[47]</sup>首次解析了 TBEV RdRp 的三维空间结构(PDB: 7D6N), 每个不对称单位含有 10 个 RdRp 分子, 以五聚体的二聚体的方式堆积。TBEV RdRp 由 N-端延伸、核心聚合酶和启动环 3 部分组成, 核心聚合酶呈右手螺旋, 包括手掌、手指和拇指 3 个亚结构域, 这 3 个亚结构域包围聚合酶活性位点(图 4C)。核心聚合酶含有的 7 个 motif (motif A–G)共同调控子代 RNA 合成<sup>[48]</sup>。TBEV RdRp 与其他黄病毒属 RdRp 结构高度相似, 但存在于 motif B 和 motif C 之间的 B–C 连接区(region B–C)在 RNA 病毒家族中出现结构和序列长度的多样性(图 4D)。B–C 连接区开始于 motif B 长螺旋的中心部分, 结束于 motif C N-端  $\beta$ -链的开始, 该区域位于 RdRp 手掌亚结构域的底部, 可溶于溶剂, 因此可能与病毒和/或宿主因子相互作用, 或介导 RNA 合成以外的过程。Yang 研究团队设计了 TBEV 和 JEV 之间 B–C 连接区的替换突变, 经过酶学试验和细胞试验发现, B–C 连接区虽未对 RdRp 催化活性产生本质影响, 但 B–C 连接区突变后的病毒 RNA 含量在细胞内降低, 提示 B–C 连接区很可能参与了 RdRp 催化以外与病毒增殖相关的重要过程<sup>[47]</sup>。通过鉴定蜃媒黄病毒和蚊媒黄病毒 RdRp B–C 连接区的细微差异, 指出该区域可能与宿主适应性相关, 为病毒 RdRp

的调控机制研究及 RdRp 相关的宿主适应研究提供重要线索。

黄病毒属 RdRp 的聚合酶活性对于病毒复制至关重要, 且在人体中无同源蛋白, RdRp 抑制剂出现严重细胞毒性的概率较低, 是抑制剂研发的关键靶点<sup>[53]</sup>。目前针对 TBEV RdRp 的抑制剂主要为核苷或核苷类似物, 这类化合物进入胞内磷酸化后转化为 5'-三磷酸代谢物, 竞争性地结合到病毒 RNA 新生链中, 从而合成非功能性的病毒 RNA, 在抗病毒药物研发中应用广泛<sup>[54]</sup>。2015 年, Eyer 研究团队<sup>[55]</sup>通过计算机模拟得到 3 种 2'-C-甲基核苷类似物, 其中 7-deaza-2'-CMA (7-脱氮-2'-C-甲基腺苷)的抑制作用最强, 是因为该化合物在 RdRp Ser331 活性位点附近形成位阻, 影响 TBEV RNA 的正常合成, 且其细胞毒性低, 可作为候选药物。2016 年, 该团队<sup>[54]</sup>又评估了 29 种核苷衍生物在细胞水平抑制 TBEV 复制的能力, 其中核苷类似物 C-2'-甲基化或 C-4'-叠氮化修饰具有较强的抑制 TBEV 活性( $EC_{50}$  为 0.3–11.1 mmol/L)和较低的细胞毒性, 而 O-2'和 O-3'的取代则导致抗 TBEV 活性完全丧失( $EC_{50}>50$  mmol/L)。2'-、3'-和 4'-位置上的核苷修饰具有相对严格的构效关系, 为药物设计奠定基础。同年, Lo 研究团队<sup>[56]</sup>发现对蚊媒黄病毒具有抑制作用的腺苷类似物 NITD008 对包括 TBEV 在内的多种蜃媒黄病毒同样具有抑制作用, NITD008 在病毒 RNA 合成过程中起链终止子的作用, 但临床前动物试验发现该化合物的毒性较大。2017 年, Eyer 研究团队<sup>[57]</sup>发现亚氨基-C-核苷类似物 BCX4430 通过改变糖环与 TBEV RdRp 之间的静电作用, 可阻断核苷酸与 RdRp 的结合, 终止 TBEV RNA 合成, 发挥抗病毒活性。同时在细胞水平发现 BCX4430 抑制 TBEV 复制且细胞毒性弱, 具有良好的药代动力学特性, 已进入 I 期临床试验。2021 年, Eyer 研

究团队<sup>[58]</sup>发现氟取代核苷 3'-脱氧-3'-氟腺苷在体外具有抗 TBEV 和 WNV 等黄病毒的活性,在体内该化合物的抗病毒作用相对较弱,但可延长被该病毒感染小鼠的平均存活时间,是一类具有良好潜力的生物活性分子。虽然目前针对 TBEV RdRp 的抑制剂研发大多集中于核苷类似物,但已发现 TBEV RdRp 的 S603T 突变和 E460D 突变分别产生对 2'-核苷和 BCX4430 的抗性<sup>[59-60]</sup>,可能是未来 TBEV RdRp 抑制剂研发工作中的挑战。

## 4 TBE 的防治

每年在欧洲、俄罗斯远东地区、日本和中国北部报道的 TBE 病例数约为 10 000–12 000 例<sup>[9]</sup>,目前由于整体气候环境的变化和病毒检测手段的提升, TBEV 感染率在不断增加,我国报告的 TBE 病例由东北林区逐渐出现向南迁移的趋势<sup>[10]</sup>。在我国流行省份的 TBE 疫苗接种较为有限,对于抗 TBEV 特异性药物的研发可能是治疗 TBEV 感染的方向之一<sup>[61]</sup>。

针对 TBEV 小分子抗病毒药物的研发,一方面基于 TBEV 的非结构蛋白开展, TBEV 非结构蛋白中 NS3H、NS5 MTase 和 NS5 RdRp 的三维空间结构已相继解析<sup>[33,35,47]</sup>,基于结构的抗病毒药物设计逐渐成为药物研发中的重点和热点;另一方面基于 TBEV 的结构蛋白开展,主要为 E 蛋白。存在于 E 蛋白 Domain II 和 III 铰链区与配体结合相关的  $\beta$ -OG 口袋,参与调控病毒包膜与宿主细胞膜融合的 pH、病毒在宿主体内的神经毒性等,可影响病毒侵入和复制周期的早期阶段<sup>[62]</sup>。目前已发现抗生素类似物,如阿奇霉素类似物 SA-17<sup>[63]</sup>、替考拉宁类似物 LCTA-949 等很可能通过与  $\beta$ -OG 口袋相互作用阻止病毒进入,发挥抗 TBEV 活性,其中 LCTA-949 的抗病毒活性较强, EC<sub>50</sub> 达到 0.3  $\mu$ mol/L<sup>[64-65]</sup>。此外,

含有脂肪族、芳香族取代基和金刚烷骨架的 4-氨基嘧啶 N-氧化物也可通过与 E 蛋白  $\beta$ -OG 口袋相互作用,抑制 TBEV 进入宿主细胞,可作为 TBEV E 蛋白靶点合理药物设计的基础<sup>[66]</sup>。

除了小分子抗病毒药物,免疫疗法也可用于抗 TBEV 的治疗,包括人源化单抗或人鼠嵌合单抗,多克隆抗体等<sup>[65]</sup>。其中鼠单克隆抗体 Fab 19/1786 与 TBEV E 蛋白的 Domain III 结合,可能抑制 E 蛋白二聚体构象重排成三聚体,使得 Fab 19/1786 在病毒进入宿主细胞期间有效干扰病毒包膜和内体膜融合过程,这可能是单克隆抗体中和 TBEV 的关键机制。此外, Fab 19/1786 不与其他黄病毒发生交叉反应,具有较大的治疗潜力<sup>[11]</sup>。当然,在人类治疗中使用鼠源单抗可能存在诱导人体产生免疫反应、在人体内鼠源单抗更易清除等缺点,这些也是未来开发抗病毒免疫疗法的关注重点<sup>[65]</sup>。

## 5 总结与展望

TBEV 非结构蛋白 NS2B-NS3 与 NS5 主要参与 TBEV 的基因组复制、病毒颗粒的组装和与宿主细胞蛋白质的相互作用等,是抗 TBEV 药物研发的关键靶点。高分辨率三维空间结构的解析从原子层面揭示其关键特征,有助于深入了解这些非结构蛋白在病毒生命周期中的作用、探索病毒的致病机制。当然,未来关于 TBEV 非结构蛋白的研究仍然任重道远:一方面,部分关键的非结构蛋白靶点如 TBEV NS1、NS2B-NS3 蛋白酶等结构尚未解析,相关的抗体和蛋白酶抑制剂研发工作相对匮乏,并且部分生化试验得到的抑制剂其抑制机理也需要进一步阐明,才能为抗病毒药物研发奠定基础;另一方面,已解析三维结构的非结构蛋白多数开展了相关抑制剂研究,这些抑制剂的发现有利于合理药物设计的开展,但存在的胞内利用率低、产生细

胞毒性等负面作用,使得相关研究困难重重,提示今后抑制剂研发工作要更关注其生物利用率等问题;最后,当前生物信息学飞速发展,计算机辅助药物设计可模拟受体和配体之间的相互作用模式,从而发现先导药物,极大地提升了传统药物研发中的效率问题,为抗病毒药物的研发提供有力支撑,为抗 TBEV 治疗带来新的希望。

## 参考文献

- [1] van LEUR SW, HEUNIS T, MUNNUR D, SANYAL S. Pathogenesis and virulence of flavivirus infections[J]. *Virulence*, 2021, 12(1): 2814-2838.
- [2] KRÍZ B, BENES C, DANIEL M. Alimentary transmission of tick-borne encephalitis in the Czech Republic (1997–2008)[J]. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Casopis Spolecnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii Ceske Lekarske Spolecnosti J E Purkyne*, 2009, 58(2): 98-103.
- [3] LIPOWSKI D, POPIEL M, PERLEJEWSKI K, NAKAMURA S, BUKOWSKA-OŚKO I, RZADKIEWICZ E, DZIECIĄTKOWSKI T, MILECKA A, WENSKI W, CISZEK M, DĘBSKA-ŚLIZIEŃ A, IGNACAK E, CORTES KC, PAWEŁCZYK A, HORBAN A, RADKOWSKI M, LASKUS T. A cluster of fatal tick-borne encephalitis virus infection in organ transplant setting[J]. *The Journal of Infectious Diseases*, 2017, 215(6): 896-901.
- [4] KAISER R. Tick-borne encephalitis[J]. *Infectious Disease Clinics of North America*, 2008, 22(3): 561-575.
- [5] BOGOVIC P. Tick-borne encephalitis: a review of epidemiology, clinical characteristics, and management[J]. *World Journal of Clinical Cases*, 2015, 3(5): 430-441.
- [6] BONDARYUK AN, SIDOROVA EA, ADELISHIN RV, ANDAEV EI, BALAKHONOV SV. Reporting of new tick-borne encephalitis virus strains isolated in Eastern Siberia (*Russia*) in 1960–2011 and explaining them in an evolutionary context using Bayesian phylogenetic inference[J]. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2020, 11(5): 101496.
- [7] TABA P, SCHMUTZHARD E, FORSBERG P, LUTSAR I, LJØSTAD U, MYGLAND Å, LEVCHENKO I, STRLE F, STEINER I. EAN consensus review on prevention, diagnosis and management of tick-borne encephalitis[J]. *European Journal of Neurology*, 2017, 24(10): 1214-e61.
- [8] PULKKINEN LIA, BUTCHER SJ, ANASTASINA M. Tick-borne encephalitis virus: a structural view[J]. *Viruses*, 2018, 10(7): 350.
- [9] SUN RX, LAI SJ, YANG Y, LI XL, LIU K, YAO HW, ZHOU H, LI Y, WANG LP, MU D, YIN WW, FANG LQ, YU HJ, CAO WC. Mapping the distribution of tick-borne encephalitis in mainland China[J]. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 2017, 8(4): 631-639.
- [10] 陈晓菁. 中国蜱传脑炎流行病学分析及北方地区蜱传病毒调查[D]. 广州: 暨南大学硕士学位论文, 2020. CHEN XJ. Epidemiology of tick-borne encephalitis in China and investigation of tick-borne virus in northern China[D]. Guangzhou: Master's Thesis of Jinan University, 2020 (in Chinese).
- [11] FÜZIK T, FORMANOVÁ P, RŮŽEK D, YOSHII K, NIEDRIG M, PLEVKA P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody[J]. *Nature Communications*, 2018, 9: 436.
- [12] VELAY A, PAZ M, CESBRON M, GANTNER P, SOLIS M, SOULIER E, ARGEMI X, MARTINOT M, HANSMANN Y, FAFI-KREMER S. Tick-borne encephalitis virus: molecular determinants of neuropathogenesis of an emerging pathogen[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(4): 472-493.
- [13] 温中华. 蜱传脑炎病毒中和抗体研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院硕士学位论文, 2017. WEN ZH. Study on neutralizing antibodies of tick-borne encephalitis virus[D]. Beijing: Master's Thesis of Academy of Military Medical Sciences, 2017 (in Chinese).
- [14] LATANOVA A, STARODUBOVA E, KARPOV V. *Flaviviridae* nonstructural proteins: the role in molecular mechanisms of triggering inflammation[J]. *Viruses*, 2022, 14(8): 1808.
- [15] van der ELSEN K, CHEW BLA, HO JS, LUO DH. *Flavivirus* nonstructural proteins and replication complexes as antiviral drug targets[J]. *Current Opinion in Virology*, 2023, 59: 101305.
- [16] BRECHER M, ZHANG J, LI HM. The flavivirus protease as a target for drug discovery[J]. *Virologica Sinica*, 2013, 28(6): 326-336.
- [17] BELIKOV SI, KONDRATOV IG, POTAPOVA UV, LEONOVA GN. The relationship between the structure of the tick-borne encephalitis virus strains and their pathogenic properties[J]. *PLoS One*, 2014,

- 9(4): e94946.
- [18] POTAPOVA UV, FERANCHUK SI, POTAPOV VV, KULAKOVA NV, KONDRATOV IG, LEONOVA GN, BELIKOV SI. NS2B/NS3 protease: allosteric effect of mutations associated with the pathogenicity of tick-borne encephalitis virus[J]. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2012, 30(6): 638-651.
- [19] PIERSON TC, DIAMOND MS. The continued threat of emerging flaviviruses[J]. *Nature Microbiology*, 2020, 5(6): 796-812.
- [20] PATICK AK, POTTS KE. Protease inhibitors as antiviral agents[J]. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998, 11(4): 614-627.
- [21] de LEUW P, STEPHAN C. Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection[J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2018, 19(6): 577-587.
- [22] AKABERI D, BÄHLSTRÖM A, CHINTHAKINDI PK, NYMAN T, SANDSTRÖM A, JÄRHULT JD, PALANISAMY N, LUNDKVIST Å, LENNERSTRAND J. Targeting the NS2B-NS3 protease of tick-borne encephalitis virus with pan-flaviviral protease inhibitors[J]. *Antiviral Research*, 2021, 190: 105074.
- [23] NOBLE CG, SEH CC, CHAO AT, SHI PY. Ligand-bound structures of the dengue virus protease reveal the active conformation[J]. *Journal of Virology*, 2012, 86(1): 438-446.
- [24] BEHNAM MAM, GRAF D, BARTENSCHLAGER R, ZLOTOS DP, KLEIN CD. Discovery of nanomolar dengue and West Nile virus protease inhibitors containing a 4-benzyloxyphenylglycine residue[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2015, 58(23): 9354-9370.
- [25] KUIPER BD, SLATER K, SPELLMON N, HOLCOMB J, MEDAPUREDDY P, MUZZARELLI KM, YANG Z, OVADIA R, AMBLARD F, KOVARI IA, SCHINAZI RF, KOVARI LC. Increased activity of unlinked Zika virus NS2B/NS3 protease compared to linked Zika virus protease[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2017, 492(4): 668-673.
- [26] CIHLOVA B, HUSKOVA A, BÖSERLE J, NENCKA R, BOURA E, SILHAN J. High-throughput fluorescent assay for inhibitor screening of proteases from RNA viruses[J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3792.
- [27] ALESHIN AE, SHIRYAEV SA, STRONGIN AY, LIDDINGTON RC. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the *Flaviviridae* fold[J]. *Protein Science*, 2007, 16(5): 795-806.
- [28] ANG MJY, LIM HA, POULSEN A, WEE JLK, NG FM, JOY J, HILL J, CHIA CSB. Miniature bovine pancreatic trypsin inhibitors (m-BPTIs) of the West Nile virus NS2B-NS3 protease[J]. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 2016, 31(sup2): 194-200.
- [29] 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[J]. *Cell Research*, 2016, 26(11): 1260-1263.
- [30] 夏正保. 寨卡病毒 NS2B-NS3 的酶学研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2017.
- XIA ZB. Enzymology research of the ZIKA virus NS2B-NS3[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2017 (in Chinese).
- [31] DAVIDSON RB, HENDRIX J, GEISS BJ, MCCULLAGH M. RNA-dependent structures of the RNA-binding loop in the *Flavivirus* NS3 helicase[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2020, 124(12): 2371-2381.
- [32] LI KH, PHOO WW, LUO DH. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors[J]. *Virologica Sinica*, 2014, 29(2): 74-85.
- [33] CHEN C, HAN X, CHEN C, WANG FH, HUANG JH, ZHANG L, WANG ZF, YANG HT. Crystal structure of the NS3 helicase of tick-borne encephalitis virus[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2020, 528(3): 601-606.
- [34] 韩旭. 蜱传脑炎病毒解旋酶的结构研究[D]. 天津: 天津大学硕士学位论文, 2019.
- HAN X. Structural study of tick-borne encephalitis virus helicase[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University, 2019 (in Chinese).
- [35] ANINDITA PD, HALBEISEN M, ŘEHA D, TUMA R, FRANTA Z. Mechanistic insight into the RNA-stimulated ATPase activity of tick-borne encephalitis virus helicase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2022, 298(10): 102383.
- [36] SALAM KA, AKIMITSU N. Hepatitis C virus NS3 inhibitors: current and future perspectives[J]. *BioMed Research International*, 2013: 467869.
- [37] SINGH V, SOMVANSHI P. Structural Modeling of the NS 3 helicase of Tick-borne encephalitis virus and their virtual screening of potent drugs using molecular

- docking[J]. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, 2009, 1(3): 168-172.
- [38] MASTRANGELO E, PEZZULLO M, de BURGHGRAEVE T, KAPTEIN S, PASTORINO B, DALLMEIER K, de LAMBALLERIE X, NEYTS J, HANSON AM, FRICK DN, BOLOGNESI M, MILANI M. Ivermectin is a potent inhibitor of flavivirus replication specifically targeting NS3 helicase activity: new prospects for an old drug[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2012, 67(8): 1884-1894.
- [39] GARCÍA-ARIZA LL, ROCHA-ROA C, PADILLA-SANABRIA L, CASTAÑO-OSORIO JC. Virtual screening of drug-like compounds as potential inhibitors of the dengue virus NS5 protein[J]. *Frontiers in Chemistry*, 2022, 10: 637266.
- [40] ZHENG ZF, YANG JY, JIANG X, LIU YL, ZHANG XW, LI M, ZHANG MD, FU M, HU K, WANG HZ, LUO MH, GONG P, HU QX. Tick-borne encephalitis virus nonstructural protein NS5 induces RANTES expression dependent on the RNA-dependent RNA polymerase activity[J]. *The Journal of Immunology*, 2018, 201(1): 53-68.
- [41] JAVORSKY A, HUMBERT PO, KVANSAKUL M. Molecular basis of tick born encephalitis virus NS5 mediated subversion of apico-basal cell polarity signalling[J]. *Biochemical Journal*, 2022, 479(12): 1303-1315.
- [42] RAMASWAMY K, RASHID M, RAMASAMY S, JAYAVELU T, VENKATARAMAN S. Revisiting viral RNA-dependent RNA polymerases: insights from recent structural studies[J]. *Viruses*, 2022, 14(10): 2200.
- [43] STEPHENS R, LIM K, PORTELA M, KVANSAKUL M, HUMBERT PO, RICHARDSON HE. The scribble cell polarity module in the regulation of cell signaling in tissue development and tumorigenesis[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2018, 430(19): 3585-3612.
- [44] WERME K, WIGERIUS M, JOHANSSON M. Tick-borne encephalitis virus NS5 associates with membrane protein scribble and impairs interferon-stimulated JAK-STAT signalling[J]. *Cellular Microbiology*, 2008, 10(3): 696-712.
- [45] MELIK W, ELLENCRONA K, WIGERIUS M, HEDSTRÖM C, ELVÄNG A, JOHANSSON M. Two PDZ binding motifs within NS5 have roles in tick-borne encephalitis virus replication[J]. *Virus Research*, 2012, 169(1): 54-62.
- [46] DONG HP, FINK K, ZÜST R, LIM SP, QIN CF, SHI PY. *Flavivirus* RNA methylation[J]. *Journal of General Virology*, 2014, 95(4): 763-778.
- [47] YANG JY, JING XP, YI WF, LI XD, YAO C, ZHANG B, ZHENG ZH, WANG HZ, GONG P. Crystal structure of a tick-borne flavivirus RNA-dependent RNA polymerase suggests a host adaptation hotspot in RNA viruses[J]. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49(3): 1567-1580.
- [48] 黄星耀, 叶青, 李晓峰, 秦成峰. 寨卡病毒非结构蛋白 NS5 的结构与功能研究进展[J]. *科学通报*, 2019, 64(26): 2677-2688.
- HUANG XY, YE Q, LI XF, QIN CF. Advance in structure and functions of the nonstructural protein 5 of Zika virus[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2019, 64(26): 2677-2688 (in Chinese).
- [49] LASKOWSKI RA, SWINDELLS MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery[J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2011, 51(10): 2778-2786.
- [50] DONG HP, ZHANG B, SHI PY. *Flavivirus* methyltransferase: a novel antiviral target[J]. *Antiviral Research*, 2008, 80(1): 1-10.
- [51] DONG HP, CHANG DC, XIE XP, TOH YX, CHUNG KY, ZOU G, LESCAR J, LIM SP, SHI PY. Biochemical and genetic characterization of dengue virus methyltransferase[J]. *Virology*, 2010, 405(2): 568-578.
- [52] LIM SP, SONNTAG LS, NOBLE C, NILAR SH, NG RH, ZOU G, MONAGHAN P, CHUNG KY, DONG HP, LIU BP, BODENREIDER C, LEE G, DING M, CHAN WL, WANG G, JIAN YL, CHAO AT, LESCAR J, YIN Z, VEDANANDA TR, KELLER TH, SHI PY. Small molecule inhibitors that selectively block dengue virus methyltransferase[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(8): 6233-6240.
- [53] 薛建霞, 周光凤, 何严萍, 郑永唐. 基于 NS5 蛋白为靶点的登革病毒抑制剂研究进展[J]. *中国药物化学杂志*, 2022, 32(9): 726-734.
- XUE JX, ZHOU GF, HE YP, ZHENG YT. Research progress of dengue virus inhibitors targeting NS5 protein[J]. *Chinese Journal of Medicinal Chemistry*, 2022, 32(9): 726-734 (in Chinese).
- [54] EYER L, ŠMÍDKOVÁ M, NENCKA R, NEČA J, KASTL T, PALUS M, de CLERCQ E, RŮŽEK D. Structure-activity relationships of nucleoside analogues for inhibition of tick-borne encephalitis virus[J]. *Antiviral Research*, 2016, 133: 119-129.



- [55] EYER L, VALDÉS JJ, GIL VA, NENCKA R, HŘEBABECKÝ H, ŠÁLA M, SALÁT J, ČERNÝ J, PALUS M, de CLERCQ E, RŮŽEK D. Nucleoside inhibitors of tick-borne encephalitis virus[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(9): 5483-5493.
- [56] LO MK, SHI PY, CHEN YL, FLINT M, SPIROPOULOU CF. *In vitro* antiviral activity of adenosine analog NITD008 against tick-borne flaviviruses[J]. *Antiviral Research*, 2016, 130: 46-49.
- [57] EYER L, ZOUHAROVÁ D, ŠIRMAROVÁ J, FOJTÍKOVÁ M, ŠTEFÁNIK M, HAVIERNIK J, NENCKA R, de CLERCQ E, RŮŽEK D. Antiviral activity of the adenosine analogue BCX4430 against West Nile virus and tick-borne flaviviruses[J]. *Antiviral Research*, 2017, 142: 63-67.
- [58] EYER L, SVOBODA P, BALVAN J, VIČAR T, RAUDENSKÁ M, ŠTEFÁNIK M, HAVIERNIK J, HUVAROVÁ I, STRAKOVÁ P, RUDOLF I, HUBÁLEK Z, SELEY-RADTKE K, de CLERCQ E, RŮŽEK D. Broad-spectrum antiviral activity of 3'-deoxy-3'-fluoroadenosine against emerging flaviviruses[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2021, 65(2): e01522-20.
- [59] EYER L, KONDO H, ZOUHAROVA D, HIRANO M, VALDÉS JJ, MUTO M, KASTL T, KOBAYASHI S, HAVIERNIK J, IGARASHI M, KARIWA H, VACULOVICOVA M, CERNY J, KIZEK R, KRÖGER A, LIENENKLAUS S, DEJMEK M, NENCKA R, PALUS M, SALAT J, et al. Escape of tick-borne *Flavivirus* from 2'-C-methylated nucleoside antivirals is mediated by a single conservative mutation in NS5 that has a dramatic effect on viral fitness[J]. *Journal of Virology*, 2017, 91(21): e01028-17.
- [60] EYER L, NOUGAIREDE A, UHLIROVA M, DRIOUICH JS, ZOUHAROVA D, VALDES JJ, HAVIERNIK J, GOULD EA, DE CLERCQ E, DE LAMBALLERIE X, RUZEK D. An E460D substitution in the NS5 protein of tick-borne encephalitis virus confers resistance to the inhibitor Galidesivir (BCX4430) and also attenuates the virus for mice[J]. *Journal of Virology*, 2019, 93(16): e00367-19.
- [61] XING Y, SCHMITT HJ, ARGUEDAS A, YANG JF. Tick-borne encephalitis in China: a review of epidemiology and vaccines[J]. *Vaccine*, 2017, 35(9): 1227-1237.
- [62] OSOLODKIN DI, KOZLOVSKAYA LI, DUEVA EV, DOTSENKO VV, ROGOVA YV, FROLOV KA, KRIVOKOLYSKO SG, ROMANOVA EG, MOROZOV AS, KARGANOVA GG, PALLYULIN VA, PENTKOVSKI VM, ZEFIROV NS. Inhibitors of tick-borne *Flavivirus* reproduction from structure-based virtual screening[J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 4(9): 869-874.
- [63] PERERA R, KHALIQ M, KUHN RJ. Closing the door on flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design[J]. *Antiviral Research*, 2008, 80(1): 11-22.
- [64] de BURGHGRAEVE T, KAPTEIN SJF, AYALA-NUNEZ NV, MONDOTTE JA, PASTORINO B, PRINTSEVSKAYA SS, de LAMBALLERIE X, JACOBS M, PREOBRAZHENS KAYA M, GAMARNIK AV, SMIT JM, NEYTS J. An analogue of the antibiotic teicoplanin prevents *Flavivirus* entry *in vitro*[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37244.
- [65] EYER L, SELEY-RADTKE K, RUZEK D. New directions in the experimental therapy of tick-borne encephalitis[J]. *Antiviral Research*, 2023, 210: 105504.
- [66] SEDENKOVA KN, DUEVA EV, AVERINA EB, GRISHIN YK, OSOLODKIN DI, KOZLOVSKAYA LI, PALLYULIN VA, SAVELYEV EN, ORLINSON BS, NOVAKOV IA, BUTOV GM, KUZNETSOVA TS, KARGANOVA GG, ZEFIROV NS. Synthesis and assessment of 4-aminotetrahydroquinazoline derivatives as tick-borne encephalitis virus reproduction inhibitors[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2015, 13(11): 3406-3415.