



蛋白类病毒感染失活剂: “遇敌即杀”的利器

苏霄洁, 姜世勃, 陆路*

复旦大学医学分子病毒学教育部/卫健委/中国医科院重点实验室暨病原生物学系基础医学院, 上海 200032

* 联系人, E-mail: lul@fudan.edu.cn

收稿日期: 2021-06-24; 接受日期: 2021-07-03; 网络版发表日期: 2021-12-27

摘要 由包膜病毒, 例如人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)及严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)等引发的传染病, 对人类健康和全球公共卫生造成了很大的威胁. 目前已有的抗病毒药物大多数通过作用于病毒入侵细胞时或进入细胞后的生活周期来抑制感染. 这些药物在遇到游离的病毒时, 并不能导致病毒失去感染性, 而是等待病毒感染细胞后发挥抑制作用. 蛋白类病毒感染失活剂是一类可直接作用于游离病毒并导致其失去感染性的抗病毒蛋白或多肽, 其主要通过与病毒颗粒上包膜蛋白(envelope glycoproteins, Envs)中的一个或多个位点相互作用, 引发病毒包膜蛋白功能丧失或病毒基因组释放等, 从而使病毒失去感染性. 值得注意的是, 蛋白类病毒感染失活剂有望比传统的抗病毒药物具有更高的利用率, 且在体内应用时比化学类失活剂更安全, 因此越来越受到关注. 本文选择一些研究较多的代表性病毒, 重点介绍了HIV, SARS-CoV及SARS-CoV-2, 登革病毒(dengue virus, DENV)及寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)的蛋白类病毒感染失活剂研究的最新进展, 以及其用于紧急应对新发和再现病毒大暴发、大流行的潜力.

关键词 包膜病毒, 包膜蛋白, 病毒感染失活剂, 新发和再现病毒, 新型冠状病毒

近年来, 由高致病性包膜病毒引发的传染病持续对全球公共卫生构成严重威胁, 开发有效且安全的抗病毒药物对于抵御这些传染病至关重要^[1,2]. 目前, 中国、美国及欧洲等各国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了近百种抗病毒药物: 它们主要用于治疗和预防人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒(influenza virus)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)等病毒的感染(<https://www.nmpa.gov.cn/>, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>). 这些抗病毒药物的早期研发思路主要是基于病毒感染细胞的生活周期, 针对病毒的入侵、细胞内复制、蛋白组装、子代包装出芽等环节设计和开发可有效阻断这些过程的药物, 从而抑制病毒在机体内的增殖. 但研究发现, 这类药物只有在靶细胞存在的情况下才能发挥抗病毒作用, 对游离的病毒颗粒较难起到失活的作用. 也就是说, 用药之后, 尽管机体体液中药物浓度可以达到很高, 并能够与游离的病毒颗粒密切接触, 但并不能使病毒失去感染性. 这种只能被动地等待病毒感染靶细胞后再发挥作用的药物机制, 可能导致药物在抑制病毒的机会到来之前

近年来, 由高致病性包膜病毒引发的传染病持续对全球公共卫生构成严重威胁, 开发有效且安全的抗病毒药物对于抵御这些传染病至关重要^[1,2]. 目前, 中国、美国及欧洲等各国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)已经批准了近百种抗病毒药物: 它们主要用于治疗和预防人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒(influenza virus)、乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)、丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)和单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)等病毒的感染(<https://www.nmpa.gov.cn/>, <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/>). 这些抗病毒药物的早期研发思路主要是基于病毒感染细胞的生活周期, 针对病毒的入侵、细胞内复制、蛋白组装、子代包装出芽等环节设计和开发可有效阻断这些过程的药物, 从而抑制病毒在机体内的增殖. 但研究发现, 这类药物只有在靶细胞存在的情况下才能发挥抗病毒作用, 对游离的病毒颗粒较难起到失活的作用. 也就是说, 用药之后, 尽管机体体液中药物浓度可以达到很高, 并能够与游离的病毒颗粒密切接触, 但并不能使病毒失去感染性. 这种只能被动地等待病毒感染靶细胞后再发挥作用的药物机制, 可能导致药物在抑制病毒的机会到来之前

引用格式: 苏霄洁, 姜世勃, 陆路. 蛋白类病毒感染失活剂: “遇敌即杀”的利器. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 2-18

Su X J, Jiang S B, Lu L. Protein-based virus inactivators: immediate inactivators of circulating virions (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2023, 53: 2-18, doi: 10.1360/SSV-2021-0046

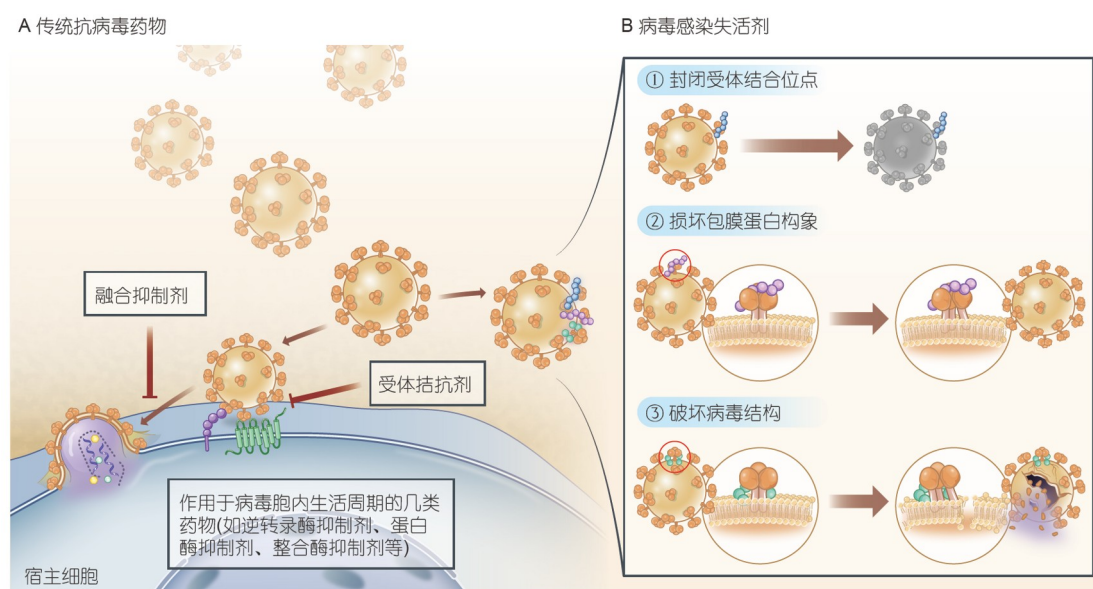


图 1 传统抗病毒药物和蛋白类病毒感染失活剂的作用机制比较. A: 传统抗病毒药物必须在有靶细胞存在的情况下才能发挥作用; B: 病毒感染失活剂通过三种不同的机制直接作用于游离病毒

Figure 1 Mechanism comparison of conventional antiviral drugs and the protein-based virus inactivators. A: Conventional antiviral drugs only have a function in the presence of target cells; B: protein-based virus inactivators act directly on free virions through 3 different mechanisms

就被机体代谢, 利用率低, 随之带来用量大、毒副作用强等一系列问题(图1A). 因此, 本团队及一些研究组提出了研发蛋白类病毒感染失活剂的策略: 根据病毒包膜蛋白(envelope glycoproteins, Envs)的结构及功能特征, 设计“主动进攻游离病毒, 使其失去感染性”的新型蛋白类抗病毒药物(图1)^[3]. 该类药物变“被动防御”为“主动进攻”, 在其遇到病毒的第一时间发挥作用——“遇敌即杀”, 主动进攻并快速失活游离病毒, 这有望从一个新的角度解决上述传统抗病毒药物可能遇到的问题.

蛋白类病毒感染失活剂(简称蛋白类失活剂), 顾名思义, 是针对游离的包膜病毒, 可使毒粒失去感染性的特异性蛋白类(多肽、重组蛋白等)药物, 其与非特异性破膜的化学类去污剂有着本质区别, 具有靶向病毒的高特异性和安全性. 包膜病毒的膜上存在一种或多种包膜蛋白, 其功能主要是介导病毒入侵靶细胞的过程, 包括病毒与靶细胞受体的结合以及膜融合等过程^[4,5]. 封闭天然构象的包膜蛋白使其无法与受体结合, 改变包膜蛋白构象从而使其彻底丧失进入宿主细胞的能力, 或是靶向包膜蛋白从而破坏毒粒结构导致基因组释放等策略(图1B), 都可以达到使游离病毒失

去感染性的目的. 因此, 天然构象的包膜蛋白成为蛋白类病毒感染失活剂设计的主要靶点. 基于不同病毒包膜蛋白的结构和功能特征, 可设计出针对该类病毒特异性的高效失活剂.

本文选取蛋白类失活剂研发较多的几种代表性病毒, 详细介绍了它们包膜蛋白的结构和功能, 以及相关蛋白类失活剂的设计策略和研究进展. 同时, 本文还将讨论了它们与传统抗病毒药物相比的优缺点, 以及用于紧急应对新发和再现病毒感染的潜力.

1 HIV的包膜蛋白及蛋白类失活剂研究进展

HIV是一类慢病毒, 主要感染人体的免疫细胞, 很多感染者最终会发展为获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome, AIDS), 免疫系统持续衰竭进而危及生命^[6]. 目前已经获得美国FDA批准的特异性抗HIV药物主要分为以下几类: 以恩夫韦肽(也称为T20)^[7~9]和小分子CCR5拮抗剂maraviroc^[10]为代表的入侵抑制剂(entry inhibitors, EIs)、逆转录酶抑制剂(reverse transcriptase inhibitors, RTIs, 包括核苷

类和非核苷类)、蛋白酶抑制剂(protease inhibitors, PIs)以及整合酶抑制剂(integrase inhibitors, INIs)等^[11]。尽管它们能够有效降低AIDS的发病率和死亡率, 但均需要在HIV感染靶细胞时或感染后发挥作用, 无法主动进攻游离病毒, 因而可能加剧药物利用率低、需频繁使用、毒副作用高等缺点。而蛋白类病毒感染失活剂在病毒与靶细胞受体结合之前就能高效失活游离病毒, 为解决上述问题提供了新的思路。

HIV-1包膜表面仅有一种包膜糖蛋白Env, 其最初以gp160糖蛋白前体的形式被表达出来, 长度约为850个氨基酸(图2A), 经病毒蛋白酶剪切形成非共价连接的gp120和gp41异源二聚体, 三个这样的二聚体进而组成高度糖基化的三聚体^[12](图2B)。如图2A, 表面亚基gp120包括V1~V5几个可变区和其余较为保守的区域^[13], 研究证实其表面存在细胞受体CD4的结合位点(CD4 binding-site, CD4bs)(图2B), 在病毒进入细胞的过程中, 能够与受体结合从而起始感染。跨膜亚基gp41由融合肽(fusion peptide, FP)、N端七肽重复序列(N-terminal heptad repeats, NHR)、C端七肽重复序列(C-terminal heptad repeats, CHR)、膜外近膜区(membrane-proximal external region, MPER)、跨膜区(transmembrane, TM)和膜内区(cytoplasmic region, CP)组成, 主要介导膜融合过程。具体的过程可简述为, 在感染起始时, gp120与靶细胞表面的CD4分子相互作用, 导致gp120发生构象变化暴露出辅受体结合位点(co-receptor binding site, CoRbs), 从而与其辅受体CCR5或CXCR4结合。随后gp120脱离, gp41的FP插入到靶细胞膜中, 形成一个前发卡融合中间态构象(prehairpin fusion intermediate, PFI)。接着三个gp41亚基的NHR和CHR反向折叠形成六螺旋束(6-helix bundle, 6-HB)结构, 从而将靶细胞膜和病毒包膜拉近, 导致膜融合的发生。因此, gp120和gp41所组成的包膜蛋白Env是介导HIV-1感染靶细胞的重要蛋白, 也是HIV-1蛋白类失活剂研发的关键靶点^[14]。

在HIV-1药物研发的早期, 陆续有研究人员研发出几种可能具有HIV-1失活活性的蛋白或多肽, 但在对其抗病毒活性的检测上, 主要是分析了在靶细胞存在的情况下, 它们对HIV-1感染细胞的抑制活性, 并未严格测试在没有靶细胞存在时是否能失活游离的HIV-1毒粒。这一类蛋白基本都是基于CD4分子开发的。完整的CD4分子由N端疏水的信号肽、4个胞外结构域、一

段疏水的跨膜区以及胞内区组成。可溶性CD4蛋白(soluble CD4, sCD4)作为特异性的抗HIV-1药物最早被研发, 包括CD4分子的胞外D1-D4结构域, 或D1和D2结构域^[15,16]。其靶向gp120的CD4结合位点, 理论上可以通过结合HIV-1 gp120, 使其无法再与细胞受体CD4结合从而达到使病毒失去感染性的效果。实际上, 体外研究也表明, sCD4确实可以抑制HIV-1感染, IC_{50} (半数抑制浓度, 指抑制50%病毒感染所需的药物浓度)范围为40~700 nmol/L^[17,18]。在体内实验中, 其有效地降低了血液中的病毒滴度, 且没有明显的毒性。遗憾的是, sCD4的半衰期相当短, 在一些感染者中病毒迅速反弹, 没有明显的疗效^[19,20]。另外, 此外还有一些研究发现, sCD4在低浓度时(<20 nmol/L)不但不能有效抑制HIV-1感染, 反而会增强某些临床毒株的感染^[21]。其机制很可能是sCD4结合到gp120的CD4结合位点会导致辅受体结合位点的暴露, 诱导出一个gp41 NHR部分暴露的gp120/gp41融合中间态, 某些病毒株的PFI甚至可以在室温稳定存在1 h以上^[22]。如果在PFI稳定性丧失之前接触到了靶细胞, 病毒会立即与辅受体结合而开启融合过程, 因而病毒更容易感染包含辅受体的靶细胞。因此, 单独的sCD4无法作为蛋白类失活剂用于艾滋病的治疗, 但通过各种途径改造sCD4或模拟sCD4的作用机制, 成为蛋白类失活剂设计的主要策略之一。

有研究组将CD4的结构域D1D2和人免疫球蛋白IgG2的恒定区融合表达, 形成融合蛋白CD4-IgG2^[23]。CD4-IgG2的作用机制与sCD4类似, 理论上也对游离的HIV-1具有失活作用, 但是尚未有对其失活能力验证的数据。传统的病毒抑制实验结果表明, 与sCD4相比, CD4-IgG2对HIV-1感染的抑制效果更好: 体外实验中其针对HIV-1临床分离株展现出了较好的抑制活性, IC_{50} 为5~80 nmol/L^[24]; 且其能够在啮齿类动物模型中降低病毒滴度^[25]。同时, 临床试验结果表明, CD4-IgG2在体内有3~4天的半衰期, 比sCD4更长^[26], 并且对于严重的病症, 其可达80%的响应率, 患者体内的病毒滴度在用药之后的几个星期内显著降低^[27]。然而, 关于sCD4的结合会增强某些毒株感染性的问题, 尚未有研究对CD4-IgG2进行类似评估, 但不能排除其同样存在增强感染性的风险。另外, 还有研究人员将CD4分子侧链上结合gp120的9个关键残基替换至蝎毒素短肽scyllatoxin的结构同源区域, 形成了27个氨基酸的多肽CD4M9^[28]。CD4M9能结合gp120上的CD4bs, 从而干扰

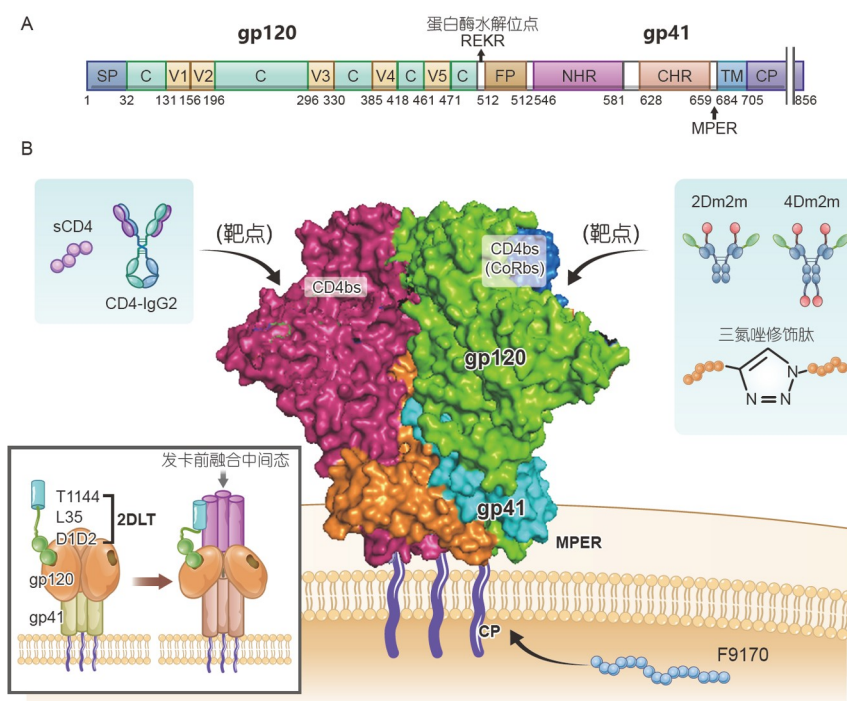


图 2 抗HIV-1的蛋白类病毒感染失活剂的设计。A: HIV-1包膜蛋白的序列组成示意图; B: Env天然状态的构象(PDB ID: 5V8M)及在研的针对HIV-1的蛋白类失活剂。三个gp120亚基分别标注为绿色、紫红色和海蓝色, 三个gp41亚基分别标为橙色、蓝绿色和灰色(隐藏)。从此侧视图上看, 失活剂的主要靶点CD4bs大致位于一个浅的口袋中, 即箭头所指的位置

Figure 2 The design of protein-based HIV-1 inactivators. A: Schematic representation of HIV-1 Env composition; B: Env prefusion conformation (PDB ID: 5V8M) and protein-based HIV-1 inactivators under investigation. Three gp120 subunits are colored in green, amaranth, and marine, and three gp41 subunits in orange, cyan, and gray (hidden), respectively. Observed from a side view, CD4bs, the main target of HIV-1 inactivators, lies in the shallow pocket, pointed to by the arrows

CD4和gp120的结合, 理论上应该能在一定程度上失活HIV-1, 但尚未有研究对其进行失活能力的验证。传统的病毒抑制实验结果表明, CD4M9能够抑制HIV-1实验室适应株X4及R5的感染, IC_{50} 为0.4~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 。随后, 研究人员又在CD4M9的基础上设计了二价和三价的小蛋白, 实验结果表明, 虽然它们的抑制活性有所提升, 但仍然远不及sCD4^[29,30]。

由于sCD4分子量较大, 制备成本较高, 而CD4分子的D1区域不稳定且与gp120亲和力较低, 因而有研究人员利用噬菌体展示库技术, 从大的D1突变体库中筛选出两种高度稳定且可溶性好的D1突变体mD1.1和mD1.2, 同时它们对gp120的亲和力也更高^[31,32]。随后, 他们又结合蛋白表面填充策略与噬菌体展示库技术, 分离出了一个mD1.2的突变体mD1.22, 其在第55位氨基酸上发生了单个突变(A55→V55)。相比于mD1.2, mD1.22具有更高的热稳定性和可溶性, 与gp120的结合能力也得到增强; 在体外实验中, 其抑制HIV-1原始

R5分离株Bal和JRFL的活性是D1D2和mD1.2的7倍^[33]。而为了进一步提高mD1.22的抑制活性及广谱性, 研究人员将mD1.22与高效的HIV-1抑制剂m36.4(抗体的一个结构域, 靶向gp120上的辅受体结合位点CoRbs)融合, 构建了三种双特异性的多价融合蛋白2Dm2m, 4Dm2m和6Dm2m, 分别包含2, 4和6个mD1.22和2个m36.4, 能够同时靶向gp120上的CD4bs和CoRbs。实验结果表明, 对于用于检测的所有HIV-1毒株, 它们均具有很好的抑制活性: 以中国主要流行的41个HIV-1分离株为例, 2Dm2m, 4Dm2m和6Dm2m均能中和所有的毒株, 其平均 IC_{50} 分别为1.70, 0.22和0.20 nmol/L; 其中4Dm2m及6Dm2m的抑制活性比美国FDA批准的多肽抑制剂T20以及CD4-IgG2分别高出50倍和200倍。此外, 理论上它们具备失活HIV-1毒粒的能力, 然而遗憾的是文章中并未进行对游离病毒失活能力的检测^[33]。

随着研究的逐渐深入, 一些研究组意识到这种靶向病毒包膜蛋白的抗病毒药物可能具有独特的抗病毒

优势——主动失活游离的病毒颗粒。因此, Lu等人^[3,34]在全球范围内首次明确提出了研发蛋白类病毒感染失活剂的策略及其潜在的优势, 并在没有靶细胞存在的情况下对其所设计的蛋白类失活剂失活HIV-1毒粒的能力进行了测试。该研究组设计了一种双特异性的蛋白质分子, 命名为2DLT, 从N端到C端依次是CD4的D1D2区域、35个氨基酸的linker以及衍生于gp41 CHR的多肽T1144(第三代HIV融合抑制剂)^[35,36]。如上所述, D1D2与gp120 CD4bs结合后会诱导出一个gp41 NHR部分暴露的gp120/gp41前发卡融合中间态^[22], 而T1144会强力结合此部分暴露的gp41 NHR, 使中间态失去稳定性, 从而能够快速失活游离病毒。实验结果表明, 2DLT的失活效果显著优于D1D2, 其失活HIV-1 Bal, HIV-1 IIIB以及不同亚型的R5临床分离株的 EC_{50} 范围为17.3~78.6 nmol/L, 活性是D1D2的2~6倍, 而T20和T1144在浓度高于500 nmol/L时仍未表现出显著的失活活性; 且2DLT不会像D1D2那样有增强HIV-1感染的效应。此外, 如果2DLT未能失活HIV-1毒粒, T1144区域还能抑制病毒与靶细胞的融合, 形成第二道保护屏障。因此2DLT有望发展成为新一类的抗HIV-1药物, 预防或治疗HIV-1感染, 以及作为预防HIV-1性传播的杀微生物剂。随后, 他们还探究了2DLT与不同抗病毒药物联用的效果, 包括HIV-1入侵抑制剂、核苷及非核苷类反转录酶抑制剂和蛋白酶抑制剂。实验结果表明, 将2DLT与这些抗病毒药物联用后, 对于抑制X4和R5嗜性的HIV-1毒株感染具有很强的协同效应^[37]。此外, 该研究组还检测了全长的sCD4, D1D2以及上文所述的mD1.22, m36.4, 2Dm2m及4Dm2m失活HIV-1毒粒的能力, 包括X4嗜性的实验室适应株IIIB和R5嗜性的实验室适应株Bal。结果表明, mD1.22, 2Dm2m和4Dm2m确实能比sCD4和D1D2更加高效地失活HIV-1: 它们失活IIIB的 EC_{50} 分别为3.13, 1.10和0.31 nmol/L, 而sCD4和D1D2却分别高达153和64.7 nmol/L^[38]。

除了上述的对sCD4进行改造的各类蛋白及多肽, 还有一些较为独特的策略也值得借鉴。使用噬菌体展示库技术, 研究人员筛选出一个12个氨基酸的多肽12p1(RINNIPWSEAMM), 该多肽能同时抑制gp120与sCD4及单克隆抗体17b的互作, 其中17b是一种靶向gp120 CoRbs的中和抗体, 表明12p1能同时结合CD4bs以及CoRbs^[39,40]。但是, 12p1对gp120的亲合力比较低, 只能达到微摩尔级别。后续有研究组对多肽12p1的结

构和活性进行优化, 衍生出一类三氮唑修饰的多肽^[41]。它们能以较高的亲和力同时结合gp120上的CD4bs和CoRbs, 导致包膜糖蛋白的崩坏, 从而不可逆地失活病毒^[42]。其中一条三氮唑修饰的多肽KR13, 可以同时诱导gp120脱落和衣壳蛋白p24从HIV-1假病毒释放^[43,44]。研究人员还发现, 与金纳米颗粒偶联的KR13(AuNP-KR13)比单一的多肽KR13展现出更强的病毒失活效应, 因为AuNP-KR13比KR13含有更多gp120结合位点^[45]。遗憾的是, 文章仅测试了多肽对假病毒的失活能力, 并未对三氮唑修饰的多肽失活HIV-1活病毒的能力进行测试。Chaiken研究组^[46,47]还报道了一种重组蛋白DAVEI(双效杀病毒进入抑制剂), 由蓝藻抗病毒蛋白(cyanovirin-N, CVN)和来源于HIV-1 gp41 MPER的序列组成。实验结果表明, DAVEI能够有效失活HIV-1假病毒Bal.01, EC_{50} 为28.3 nmol/L。探究其机制发现CVN能结合HIV-1 gp120上的糖基化位点, MPER能和HIV-1 gp41互作, 而单独的CVN或单独的MPER多肽并不能失活病毒; 因而DAVEI对病毒的裂解失活依赖于其能够同时结合HIV-1的gp120和gp41, 破坏病毒的包膜蛋白。同样遗憾的是, 文章也仅测试了蛋白对假病毒的失活能力。

最近有研究报道了一条来源于gp41膜内区融膜肽3(lentiviral lytic peptide-3, LLP3)序列的两亲性多肽F9170^[48]。该多肽通过筛选来自HIV包膜蛋白的肽库获得, 能够失活21种不同亚型和嗜性的临床毒株, 及T20抗性的突变株, EC_{50} 为0.09~0.95 μ mol/L。此外, F9170还能诱导HIV-1感染细胞的坏死, 并激活潜伏感染的细胞。动物实验结果表明, F9170能够将慢性感染SIV的恒河猴体内的病毒载量控制在检测限以下。值得一提的是, F9170的失活机制得到了深入的探究: 突变实验的结果证实F9170可能结合及靶向包膜蛋白保守的膜内尾部融膜肽1(LLP1)位点; 且Western和RT-qPCR的结果表明, 其能破坏病毒颗粒的完整性并释放基因组RNA, 从而达到失活病毒的效果^[48]。该研究所采用的探究病毒失活剂失活机制的系列方法也将对后续的研究起到重要的提示作用。

总体来说, HIV蛋白类失活剂的靶点大致可分为如下几类(图2B): 靶向gp120上的CD4结合位点; 同时靶向gp120的CD4结合位点和辅受体结合位点; 同时靶向gp120的CD4结合位点和诱导出的gp41前发卡融合中间态; 同时靶向gp120多糖位点和gp41上的某段序列

(例如MPER); 以及靶向最新发现的gp41 LLP1位点等. HIV蛋白类失活剂研究最为多样化, 而下文所述其他病毒蛋白类失活剂的设计也在一定程度上借鉴了这些思路.

2 冠状病毒的包膜蛋白及蛋白类失活剂研究进展

由严重急性呼吸综合征冠状病毒2(severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2, 简称新冠病毒)引发的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease, COVID-19)疫情将全世界的目光再次引向了冠状病毒这一大类病毒家族. 冠状病毒是一类有包膜的单股正链RNA病毒, 分为 α , β , γ , δ 四个属, 而 β 属又分为A, B, C, D四个亚属^[49]. 其中, 有7种冠状病毒可以感染人类, 包括 α 属的HCoV-229E和HCoV-NL63以及 β 属的HCoV-OC43, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV和SARS-CoV-2^[1,50]. HCoV-229E, HCoV-NL63和HCoV-OC43感染人后一般引起普通感冒及自限性呼吸道症状^[50], 但也会在儿童、老人或免疫力低下的患者中引起严重疾病甚至威胁生命; 而SARS-CoV, MERS-CoV以及SARS-CoV-2感染人后则是轻症和重症都存在, 轻则普通感冒, 重则导致严重的肺炎, 引发肺水肿和急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[1,51,52]. 目前已有多种针对冠状病毒的新药及疗法获得FDA批准上市, 包括瑞德西韦^[53]、中和抗体疗法REGEN-COV2^[54]和获得紧急使用授权(Emergency Use Authorization, EUA)的COVID-19单抗sotrovimab^[55]. 尽管针对SARS-CoV-2的临床药物推进速度较快, 但同时也应该关注那些更为广谱的抗冠状病毒药物. 借鉴上述HIV蛋白类失活剂的设计思路, 有可能较快设计出针对冠状病毒的蛋白类失活剂.

冠状病毒的包膜表面有三个重要的结构蛋白: 刺突蛋白S、包膜蛋白E以及膜蛋白M. S蛋白是一个180~200 kD的跨膜糖蛋白, 其组成的三聚体具有独特的球状茎部和皇冠样的头部环状结构, 这也是冠状病毒命名的由来^[56](图3B). S蛋白包括S1和S2两个亚基: S1亚基介导对细胞受体的结合, 包括N端结构域(N-terminal domain, NTD)和C端的受体结合结构域(receptor binding domain, RBD)两个亚结构域(图3A). MERS-

CoV利用RBD结合受体二肽基肽酶4(dipeptidyl peptidase-4, DPP4)^[57], 而SARS-CoV和SARS-CoV-2均利用RBD去结合受体血管紧张素转化酶II(angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)^[1,58]. 最近也有一些报道显示, SARS-CoV-2还可通过NTD或RBD结合其他细胞蛋白^[59,60]来感染细胞或增强对细胞的感染. S2亚基由融合肽、七肽重复序列1和2(HR1和HR2), 跨膜区及膜内区等部分组成, 主要介导膜融合过程. 为了使膜融合过程发生, 还需要有合适的蛋白酶在S1和S2交界面上进行剪切, 使S1和S2亚基仅通过非共价键连接. 多种蛋白酶都能参与这个过程, 而病毒最终通过直接融合还是内吞途径进入细胞(即膜融合过程在细胞膜上还是内体膜上发生)可能取决于直接融合途径是否有足够的蛋白酶来催化这个过程, 若没有, 融合过程则可能在内体膜上发生^[61,62]. 以SARS-CoV-2为例, S蛋白所介导的冠状病毒入侵靶细胞的过程可简述为: S蛋白通过S1亚基结合细胞表面受体后, 经过细胞表面或内体中蛋白酶对S1/S2的加工, 由天然构象变构为融合前的亚稳状态^[63]. 随后S蛋白发生一系列构象变化, 暴露出S2亚基的FP, 其插入靶细胞膜中, 形成前发卡融合中间体构象. 接着3个HR1区域组装成卷曲螺旋的三聚体, 3个HR2区以反平行方式结合到HR1三聚体的疏水沟槽中, 形成6-HB结构, 将病毒和细胞膜或内体膜拉近, 最终完成融合过程, 病毒得以将基因组释放至胞内^[64].

由于SARS-CoV和SARS-CoV-2的研究相对较多, 因此本文以其为代表总结和讨论针对冠状病毒的蛋白类失活剂的研究进展. 与HIV-1基于sCD4蛋白的一系列失活剂类似, 基于可溶形式的ACE2蛋白(sACE2)可能是最快的失活剂研发策略之一. 理论上, sACE2由于能够阻断受体结合位点, 因此也具有能失活游离的SARS-CoV和SARS-CoV-2毒粒的能力, 并且还能有效地抵御SARS-CoV-2 S蛋白未来可能发生的突变性耐药^[2]. sACE2还有一个优势是可直接治疗肺炎的病理生理症状. 部分SARS-CoV和SARS-CoV-2感染的患者会出现肺炎症状, 其特点是肺水肿和ARDS^[65,66]. 之前的研究证实了sACE2可通过水解血管紧张素小肽来调节血压, 从而改善急性肺损伤^[67,68], 而ARDS的部分原因可能是病毒诱导的ACE2蛋白脱落及ACE2表达下调, 而这两者均是由于S蛋白结合ACE2导致^[69]. 多个临床前研究结果证明, sACE2能减轻人呼吸道合胞病毒或流感病毒感染等因素导致的ARDS. 两年多前, 人

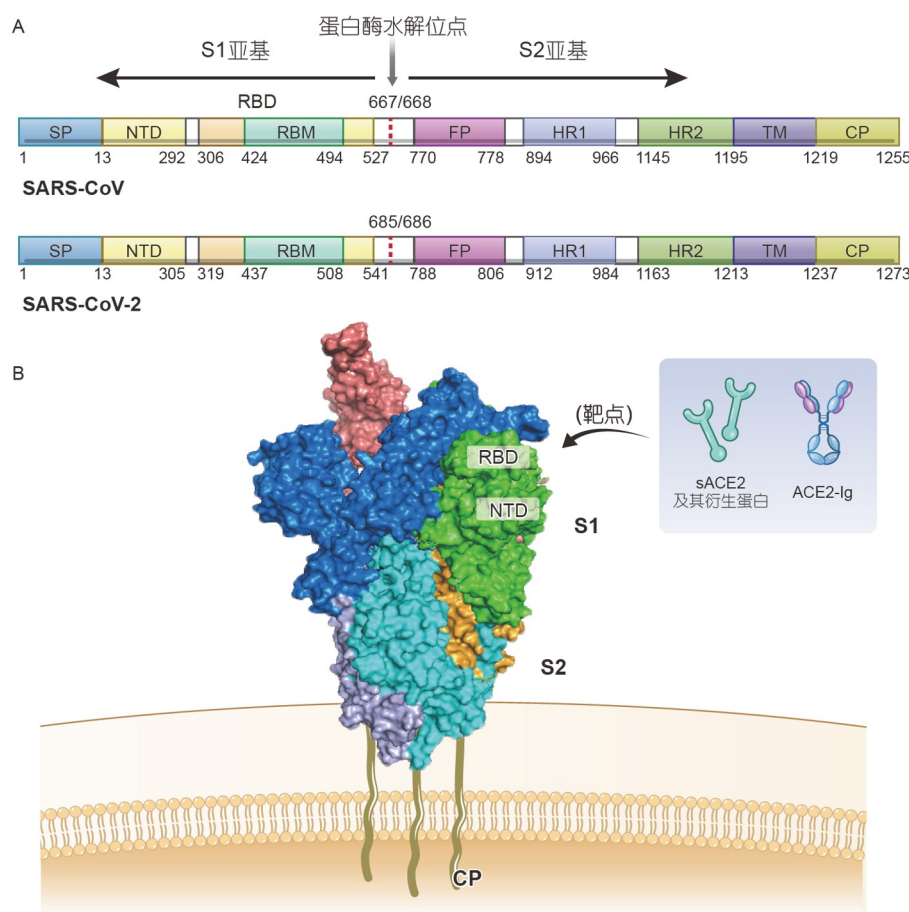


图 3 抗冠状病毒的蛋白类病毒感染失活剂的设计. A: SARS-CoV和SARS-CoV-2 S蛋白的序列组成示意图; B: S蛋白天然状态的构象(PDB ID: 6Z97)及在研的针对SARS-CoV和SARS-CoV-2的蛋白类失活剂. 三个S1亚基分别标注为绿色、海蓝色和浅红色, 三个S2亚基分别标为橙色、蓝绿色和灰色(隐藏)

Figure 3 The design of protein-based inactivators against coronaviruses. A: Schematic representation of SARS-CoV and SARS-CoV-2 S protein composition; B: S protein prefusion conformation (PDB ID: 6Z97), and protein-based SARS-CoV and SARS-CoV-2 inactivators under investigation. Three S1 subunits are colored in green, marine, and salmon, and three S2 subunits in orange, cyan, and gray (hidden), respectively

源重组可溶形式的ACE2(human recombinant soluble ACE2, hrsACE2)健康志愿者的药动学研究及ARDS患者的II期临床试验已经完成^[70,71], 该临床试验结果表明, hrsACE2能对ARDS患者的肺部起到保护作用^[71]. 因而, 可溶性ACE2作为蛋白类失活剂在治疗SARS-CoV或SARS-CoV-2导致的ARDS时可能起到一箭双雕的效果. 目前关于hrsACE2对COVID-19的疗效, II期临床试验正在欧洲开展. 此外, 重组的ACE2已被证明对非感染性的肾病具有疗效, 尤其是糖尿病性肾病, 因而也被提倡作为血管紧张素II介导的肾脏疾病的治疗方案^[72,73], 这样能实现一药多用的目标, 避免医疗资源的浪费. 因此, 基于ACE2的蛋白类失活剂具有较广阔的应用前景, 受到了较多的关注和研究.

早在10多年前SARS-CoV暴发时, 就有实验结果表明sACE2能够抑制SARS-CoV假病毒对293T细胞的感染^[74]. 最近的一项研究报道了临床级别的hrsACE2能将SARS-CoV-2对Vero-E6细胞的感染降低多个数量级; 类器官的实验结果还表明, 新冠病毒能直接感染由干细胞诱导培养出的类血管和类肾脏器官, 而hrsACE2能大幅降低病毒对多个类器官包括类血管和类肾脏的感染^[75]. 但是, 也有另外的研究表明, sACE2对SARS-CoV-2 S蛋白的亲合力并不高, 约为15 nmol/L^[56], 且只有在高浓度时才能抑制病毒感染^[74-76], 因而并不是一个抑制活性很好的分子.

基于之前对ACE2突变体的研究, 通过深度突变的方法, 研究人员发现了与S蛋白亲和力明显提高的

sACE2 突变体^[76]. 分析发现 sACE2 的突变位点遍及与 S 蛋白的互作界面, 包括 N90-多糖基序及一些包埋着的位点. 他们选取了单个氨基酸的突变体 sACE2.v2 进行纯化和鉴定, 发现该突变体与野生型的 sACE2 相似度很高, 仍保留着催化活性. 在体外实验中, 相对于野生型 sACE2 二聚体(即 sACE2₂(WT))和另一种突变体单体(sACE2.v2.4)来说, sACE2.v2.4 的二聚体(sACE2₂.v2.4)能更有效地抑制 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的感染, IC₅₀ 可达到皮摩尔级别^[76]. 此类 sACE2 突变体, 由于对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的 S 蛋白均具有很强的结合能力, 因而很可能会不可逆地失活毒粒, 有望被开发成极佳的蛋白类失活剂. 还有研究人员通过在 ACE2 末端引入折叠子 foldon 或者三螺旋束(3HB)制备了三聚化的 ACE2. 两种三聚体对三聚的 SARS-CoV-2 S 蛋白外功能区均具有皮摩尔级别的亲和力, 抑制 SARS-CoV-2 多种假病毒突变株及活毒的 IC₅₀ 均在皮摩尔至低纳摩尔级别^[77].

除了对 sACE2 进行突变及多聚化外, 借鉴基于 CD4 的 HIV-1 蛋白类失活剂的研究思路, 将 sACE2 与人源免疫球蛋白的 Fc 区域连接构建融合蛋白也是重要的策略之一. 引入 Fc 不仅能延长 sACE2 的半衰期, 还能引发免疫系统的抗病毒反应, 如抗体依赖细胞介导的细胞毒性效应(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)^[2]. 研究人员将 ACE2 的胞外区与人 IgG1 的 Fc 区域连接, 构建了一个重组融合蛋白 ACE2-Ig^[78]. 在体外实验中, 该融合蛋白能够抑制细胞融合并能中和 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 的假病毒. 但是这种方法也有一些缺点: 这样的融合蛋白会结合细胞表面的 FcR γ , 发生内吞, 导致蛋白在血液中不能稳定存在; 内吞的发生还有可能增强冠状病毒的感染, 类似于登革病毒(dengue virus, DENV)的抗体导致的抗体依赖的感染增强效应(antibody-dependent enhancement, ADE). 因而, 最近有研究对上述融合蛋白进行了优化^[79], 通过 LALA 突变, 去除此类融合蛋白结合 FcR γ 的能力, 仅保留结合新生儿 Fc 受体(FcRn)的能力. 实验结果表明, 优化后的蛋白在血清中的浓度较为稳定, 半衰期长达 145 h, 且肺泡灌洗液中也能达到治疗所需浓度, 说明融合蛋白能够被转运至肺泡间隙. 在小鼠动物模型中, 应用该融合蛋白能显著降低新冠病毒的感染. 值得注意的是, 该融合蛋白同时还突变了 ACE2 催化结构域的单个氨基酸, 显著增强了对 S 蛋白的结合能力但也

完全丧失了酶活性^[80]. 但如上文所述, ACE2 的催化活性可能对缓解肺部损伤有益, 因而对其催化结构域的突变应当慎重^[2]. 总的来说, 将 sACE2 与 Fc 区域融合以延长半衰期, 并注意去除其结合 FcR γ 的能力, 能使针对冠状病毒的蛋白类失活剂长效化, 有可能在临床上达到较好的疗效.

此外, 基于 ACE2 上结合 S 蛋白区域所设计的多肽也可能对蛋白类失活剂的设计起到关键作用. 基于最近解析的 ACE2 的冷冻电镜结构, 采用分子动力学模拟的方法, 研究人员观察到 ACE2 肽酶结构域(peptidase domain, PD) α 1 螺旋对于结合新冠病毒的 RBD 具有重要作用^[81]. 他们合成了源于 ACE2 PD α 1 螺旋的 23 个氨基酸的多肽(氨基酸位置 21~43), 实验结果表明, 该多肽能以低纳摩尔的亲和力结合新冠病毒的 S 蛋白, 阻断 S 蛋白与 ACE2 的结合. 遗憾的是, 文中并未对该多肽的抑制及失活活性进行测试. 此外, 基于之前的研究结果^[82,83], 还有研究推测, ACE2 的 N 端 21~119 位氨基酸(tACE2)会与 RBD 相互作用. 他们通过计算机模拟, 初步证实 tACE2 对 RBD 的结合亲和力比 ACE2 更强^[84]. 然而具体的结合、抑制乃至失活活性如何, 有待进一步确认.

在上述源于 ACE2 的多肽或功能蛋白抗病毒活性确定的情况下, 参考 HIV 的失活剂 2DLT 的设计思路, 也可将它们与抑制六螺旋形成的多肽连接, 构建针对冠状病毒的高效失活剂. 近一段时间以来, Xia 等人^[63,85]先后报道了广谱的抗冠状病毒多肽 EK1 和 EK1C4 多肽, 为后续构建针对冠状病毒的蛋白类失活剂提供了重要的支撑. 但是 SARS-CoV 或 SARS-CoV-2 的 S 蛋白结构及融合过程毕竟还是与 HIV 存在一定的差异, 是否能失活病毒还需要进一步的实验来证明.

综上, 冠状病毒的 S 蛋白目前是蛋白类失活剂研发的主要靶点, 而 ACE2 衍生出的各种重组蛋白及多肽是目前针对 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 失活剂的主要研发方向(图 3B). 如上所述的一项研究报道了可溶性的人 AXL 蛋白能阻断 SARS-CoV-2 假病毒对高表达 AXL 受体细胞的感染^[59]; 还有研究揭示了 SARS-CoV-2 S 蛋白对细胞的结合同时依赖于 ACE2 和肝素^[86], 且肝素能够高效地阻断 SARS-CoV-2 S 蛋白的结合、SARS-CoV-2 假病毒及活毒的感染^[86,87]. 因此这些新的蛋白均可能是潜在的失活剂. 抗病毒活性评估主要还是在靶细胞存在的条件下检测抑制感染的能力, 缺乏对游离

病毒失活活性的评估, 所以冠状病毒蛋白类失活剂的研究还需进一步的验证和探索。

3 黄病毒的包膜蛋白及蛋白类失活剂研究进展

黄病毒是一类有包膜的正义单链RNA病毒, 主要通过吸血的节肢动物(蚊子等)传播, 会导致神经系统疾病、内脏营养缺陷或出血性疾病等^[88]。黄病毒属包括多种人类病原体, 例如DENV、寨卡病毒(Zika virus, ZIKV)、黄热病毒(yellow fever virus, YFV)、西尼罗病毒(West Nile virus, WNV)等^[89], 前两种病毒近年来均有较多感染病例报道。DENV有4个血清型(DENV1, 2, 3, 4), 是蚊虫传播的主要病毒类病原体。DENV在全球超过100个国家存在, 一项研究估计每年有3.9亿人被登革病毒感染, 其中9600万人会出现症状^[90]。感染DENV之后, 一些个体会表现出流感样的症状, 另一些则会发生更严重的登革出血热和休克综合征(dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome, DHF/DSS)。ZIKV感染通常症状比较轻, 例如皮疹、发热、头痛和关节痛等; 在某些情况下也会导致比较严重的症状, 例如新生儿的小头症^[91,92]、格林-巴雷综合征、脑膜炎和脊髓炎等。目前已经有几个抗ZIKV的药物处于临床试验中, 但尚没有抗DENV及ZIKV的药物获得临床使用许可^[93,94]。

黄病毒属的病毒有相似的基因组组成和毒粒结构, 其表面有180个E蛋白和180个M蛋白, 形成90个E-M异源二聚体, 将病毒表面几乎完全覆盖住^[88]。以DENV为例, 每个E蛋白单体的外功能区包含三个结构域, 结构域I(DI)和II(DII)包含能够起始感染的高度疏水的融合环结构, 而结构域III(DIII)则包含可能的受体结合位点, DIII的C端是茎部以及膜锚定区域(图4A)。茎部在黄病毒中高度保守, 被折叠形成helix-loop-helix结构, 位于E蛋白外功能区下方, 部分包埋在病毒包膜内^[95](图4B)。M蛋白有75个氨基酸, 包括40个氨基酸的外功能区和余下的跨膜区; 外功能区有一个疏水的环状结构, 随后是一个两亲性的螺旋, 在病毒颗粒表面介导和E蛋白的互作。有研究解析了DENV表面E和M蛋白的互作情况, 发现M蛋白是一种pH敏感分子伴侣, 在病毒的感染和成熟过程中扮演重要角色^[96]。在感染起始时, E蛋白的DIII识别细胞表面的受体, 随后

通过内吞作用进入细胞中的内体。由于内体中的酸性环境, E蛋白二聚体发生解离。紧接着DII向外伸出, 暴露出的融合环插入到内体膜中, 促进亚基重新聚集成延伸的三聚中间体构象。随后, 每个亚基的DIII发生反向折叠, 驱动病毒包膜和内体膜相互靠近, 从而导致融合发生^[97,98]。

E蛋白在受体识别以及膜融合过程中发挥重要作用, 无疑是蛋白类失活剂设计的重要靶点。近10多年来, 利用核磁共振、X射线和冷冻电子显微镜等技术^[95], DENV E蛋白的结构已经被解析得比较透彻, 因而研究者们可以利用此高分辨率的蛋白结构, 使用计算机辅助分子药物设计的方法, 进行有针对性的蛋白类失活剂的设计^[99]。E蛋白的某些区域可作为蛋白类失活剂的靶点。先前的研究发现, E蛋白DI和DII的交界面上有一个疏水的口袋, 可作为E蛋白结构重排的铰链, 并能和去污剂 β -N-辛基-葡萄糖苷互作^[100]。Panya等人^[101]采用计算机辅助分子设计的方法, 靶向此位点设计了几条短肽, 其中二肽Glu-Phe(EF)能够抑制所有DENV四种血清型的感染。从其作用机制上看, EF结合游离病毒的疏水口袋之后可使其暂时失去感染性, 但是否能失活病毒还需进一步的实验验证。此外, DIII的侧环已经被证明在病毒-受体的互作中扮演重要角色, 因而也是一个可行的蛋白失活剂靶点^[102,103]。研究人员利用BioMoDroid算法, 筛选出靶向DENV-2 E蛋白DIII侧环中短序列(残基380~389)的抗DENV多肽。其中DET2和DET4能够较为有效地抑制DENV-2, IC_{50} 分别为500和35 μ mol/L。遗憾的是, 文章并未对多肽的失活能力进行验证, 仅使用透射电子显微镜进行了观察, 表明DET2和DET4确实能导致毒粒表面变得粗糙和不完整, 但具体的机制还有待进一步探究^[104]。

如上所述, 病毒自身的某些序列常常能对自身或同类病毒有抑制或失活活性^[48], 因而E蛋白也是黄病毒蛋白类失活剂设计的重要序列来源。Hrobowski等人^[105]利用Wimley-White界面疏水量表(Wimley-White interfacial hydrophobicity scale, WWIHS), 结合已知的结构数据, 寻找来源于DENV E蛋白的可能的多肽抑制剂。有较高WWIHS分数的区域被认为有更大概率在蛋白-蛋白或蛋白-脂质互作中发挥作用, 因而来源于这些区域的多肽更有可能抑制病毒感染。他们合成了DN57, DN59, DN80和DN81几条多肽, 发现DN59的抑制效果最好。后续的研究表明, DN59多肽可以抑制

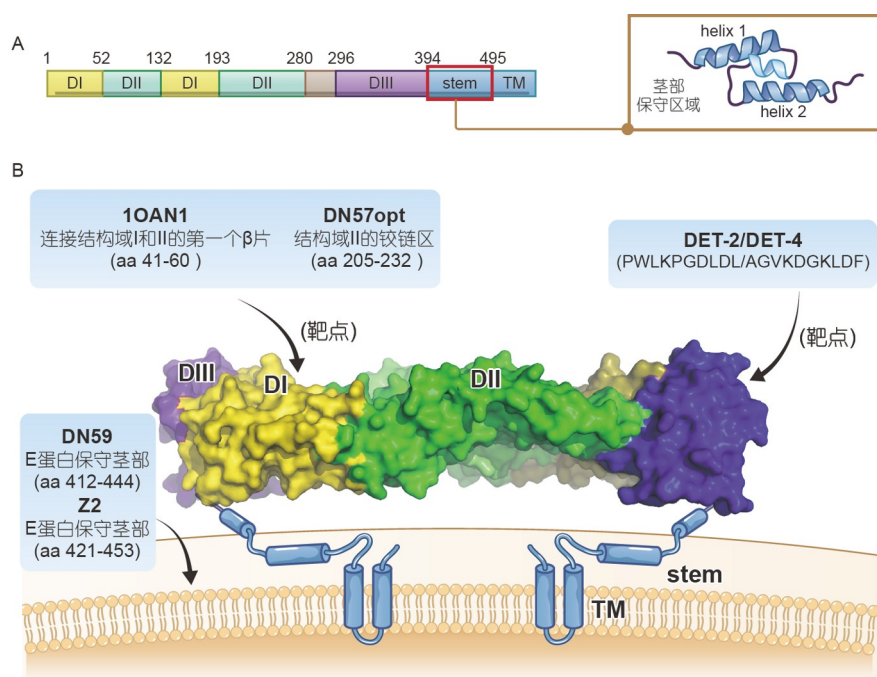


图 4 抗黄病毒的蛋白类病毒感染失活剂的设计. A: E蛋白的序列组成示意图; B: E蛋白天然状态的构象(PDB ID: 1OAN)及在研的针对DENV和ZIKV的蛋白类失活剂. 结构域 I, II 和 III 分别标注为黄色、绿色和蓝紫色

Figure 4 The design of protein-based inactivators against flaviviruses. A: Schematic representation of HIV-1 Env composition; B: E protein prefusion conformation (PDB ID: 1OAN), and protein-based DENV and ZIKV inactivators under investigation. DI, DII, and DIII are colored in yellow, green, and violet, respectively

所有四种血清型的DENV的感染, IC_{50} 为2~5 $\mu\text{mol/L}$, 且其对其他一些黄病毒也有效, 例如黄热病病毒^[106]. DN59多肽来源于具有两亲性和膜结合能力的DENV-2 E蛋白茎部区域的螺旋-环-螺旋序列(残基692~724), 具有膜互作和两亲性的特征. 机制研究表明, DN59是一种高效的DENV感染失活剂, 其能通过和游离的病毒颗粒互作, 在病毒包膜上诱导孔洞形成, 导致病毒RNA基因组的释放, 从而使DENV失去感染性^[106~108].

由于E蛋白茎部在黄病毒属中高度保守, 上述结果提示在ZIKV的蛋白类失活剂研发中, 茎部也可能是重要的序列来源. 因而研究人员设计并合成了来源于ZIKV E蛋白保守茎部(421~453残基)的多肽Z2, 发现其在体外实验中能够有效抑制不同ZIKV毒株和其他一些黄病毒的感染, 而失活ZIKV的 EC_{50} 为2.52 $\mu\text{mol/L}$. 在体实验结果表明, Z2能保护小鼠不受致死剂量的ZIKV感染; 且Z2还能穿过胎盘屏障, 阻断ZIKV在孕鼠和胎鼠之间的垂直传播. 此外, 还有研究表明, Z2可降低睾丸组织中ZIKV RNA的拷贝数, 减轻感染ZIKV对雄鼠睾丸组织的损伤^[109]. 深入探究其机

制发现, Z2能与E蛋白互作, 在病毒包膜上形成孔洞, 破坏病毒包膜的完整性从而失活病毒^[110]. 尽管Z2无法进入胎鼠脑部, 但通过在胎盘或脐带等部位将病毒失活, Z2依旧能有效降低胎鼠脑部的病毒量, 为克服血脑屏障的阻药效应提供了新的思路, 也显示出失活剂的独特优势.

除了保守的茎部之外, E蛋白上还有一些序列也可能成为蛋白类失活剂的来源. 2010年, Costin等人^[111]根据DENV-2 E蛋白的天然二聚体的高分辨率结构数据, 通过预测策略和计算机优化, 设计了多个具有抑制活性的多肽. 其中DN57opt和1OAN1两条多肽活性最佳: 前者衍生于DII的铰链区(205~232残基), 后者衍生于连接DI和DII的第一个beta折叠(41~60残基), IC_{50} 分别约为8和7 $\mu\text{mol/L}$. 生物层干涉的实验结果表明, DN57opt及1OAN1多肽都能结合可溶性的DENV-2 E蛋白; 用冷冻电子显微镜观察发现, DN57opt及1OAN1多肽处理过的DENV-2表面变得比较粗糙, 不再呈现二十面对称的结构, 表明包膜上的E蛋白可能发生了一定程度的重排或结构遭到了破坏^[111]. 遗憾的

是, 文章并未进行对多肽的失活能力进行系统的验证, 具体机制也有待进一步探究。

此外, 还有研究表明, M蛋白可与天然的E蛋白互作从而改变其构象, 表明模拟M蛋白结构来设计蛋白类失活剂可能也是一种可行的策略。Panya等人^[112]设计了一种新的抗DENV多肽MLH40, 模拟M蛋白保守的膜外功能区。MLH40能够抑制DENV四种血清型的感染, IC_{50} 为24~31 $\mu\text{mol/L}$ 。采用分子对接的方法预测MLH40的结合, 表明其N端的环状结构可能和天然E蛋白互作从而改变其二聚体的构象。然而实际情况下, MLH40是否能和E蛋白互作从而使病毒失活还需进一步的实验验证。

总的来说, 关于DENV和ZIKV失活剂的蛋白类失活剂的研究仍不够全面: 它们几乎都是多肽, 更大分子量的蛋白失活剂缺乏相应的研究(图4B); 多数多肽的病毒失活活性尚未通过失活实验进行验证, 并且大多数失活剂的特异性靶标和作用机制尚未得到清晰的阐明。此外, 一些可能的靶标, 包括DIII的受体结合位点, 由于黄病毒的受体尚未明确, 因而并未像HIV gp120中的CD4结合位点那样得到充分利用^[113]。尽管存在这些不足, 但针对DENV和ZIKV的蛋白类失活剂仍可作为新发或再现病毒蛋白类失活剂的研发范例。

4 讨论

本文总结并讨论了针对几种代表性包膜病毒的蛋白类病毒感染失活剂的研究进展和设计策略。蛋白类失活剂通过与病毒包膜蛋白上一个或多个位点发生特异性相互作用而主动攻击并失活血液中游离的毒粒, 因此它们有望比目前的抗病毒药物有更高的利用率。已知的蛋白类失活剂的作用机制包括: (i) 封闭病毒包膜蛋白上的受体结合位点, (ii) 诱导病毒包膜蛋白的构象变化从而使毒粒彻底丧失进入宿主细胞的能力, (iii) 与包膜蛋白茎部或病毒的脂膜结合, 破坏病毒包膜的完整性, 导致病毒基因组的释放(图1)。除了这些机制外, 部分蛋白类失活剂的确切机制仍有待探索。尽管不同病毒的融合/进入过程互不相同, 但可以使用一些常用技术来发现或设计出蛋白类失活剂、评价它

们的功效及研究它们的靶点, 包括(i) 重组融合蛋白设计、构建和表达技术, 如构建出高效蛋白类HIV-1失活剂2DLT和2Dm2m^[3,33]; (ii) 噬菌体展示肽库构建技术, 如筛选出多肽12p1及衍生于12p1的HIV-1失活剂三氮唑KR13^[43,44]; (iii) 计算机辅助设计靶向受体结合位点的蛋白或多肽的技术, 如HIV-1 gp120上的CD4结合位点和冠状病毒S1上的受体结合域RBD, 或DENV和ZIKV E蛋白保守的茎部; (iv) 病毒失活实验技术, 如评估蛋白类失活剂对HIV-1或ZIKV的失活能力^[3,110]。应用这些技术和策略, 可设计针对其他包膜病毒的失活剂, 尤其是针对可能导致全球大流行的新发或再现病毒。

一般来说, 蛋白质和肽类药物比小分子化学药物对人类更安全, 因为这些大分子不会进入宿主细胞, 因此对细胞内蛋白质的功能没有副作用。然而, 与化学类失活剂相比, 蛋白类失活剂通常具有较短的半衰期且不能口服, 因此每周需要注射多次。由于它们的生产成本相对小分子化合物而言较高, 对于慢性病毒感染的长期治疗来说使用蛋白类失活剂较为昂贵。基于慢病毒载体的基因疗法来持续递送分泌型的某种蛋白类失活剂可能是降低成本的方法之一^[114-117]。值得注意的是, 在紧急情况下, 救治高致病性新发或再现病毒的感染患者时, 上述蛋白类失活剂的缺点可能会被弱化, 例如应对埃博拉病毒等。机体需要数天时间才能产生抵抗病毒的保护性抗体, 因而在急救中药物的及时和快速治疗, 可能发挥关键性的作用^[118,119]。针对该类情况的用药特点是短期使用(1~3周), 治疗成本将显著降低。并且患者病危虚弱, 因而对药物安全性要求高, 蛋白类药物可能将具有优势。同时, 由于需快速应用, 急救药物一般通过注射给药, 这也与蛋白类失活剂的注射要求相一致。因此, 在临床上紧急救治高致病性新发或再现病毒的感染, 蛋白类病毒感染失活剂由于高效、安全, 可能具有更好的优势和潜力。

如今, 包括抗体药物在内的多种蛋白质和多肽类药物已被批准用于临床。由于具有上述优点, 相信将开发出越来越多的蛋白类病毒感染失活剂用于治疗 and 预防病毒感染, 特别是在对抗新发突发病毒的大流行时, 其有望成为防治药物和策略中重要的候选之一。

致谢 衷心感谢广州赛哲生物有限公司提供高质量插图。特别感谢中国工程院院士、复旦大学上海医学院闻玉梅教授对蛋白类病毒感染失活剂中文名称和概念的建议。

参考文献

- 1 Zhou P, Yang X L, Wang X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, 579: 270–273
- 2 Seyed Hosseini E, Riahi Kashani N, Nikzad H, et al. The novel coronavirus disease-2019 (COVID-19): mechanism of action, detection and recent therapeutic strategies. *Virology*, 2020, 551: 1–9
- 3 Lu L, Pan C, Li Y, et al. A bivalent recombinant protein inactivates HIV-1 by targeting the gp41 prehairpin fusion intermediate induced by CD4 D1D2 domains. *Retrovirology*, 2012, 9: 104
- 4 Lu L, Yu F, Cai L, et al. Development of small-molecule HIV entry inhibitors specifically targeting gp120 or gp41. *Curr Top Med Chem*, 2016, 16: 1074–1090
- 5 Vigant F, Santos N C, Lee B. Broad-spectrum antivirals against viral fusion. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13: 426–437
- 6 Moir S, Chun T W, Fauci A S. Pathogenic mechanisms of HIV disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 2011, 6: 223–248
- 7 Wild C T, Shugars D C, Greenwell T K, et al. Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 9770–9774
- 8 Lalezari J P, Henry K, O’Hearn M, et al. Enfuvirtide, an HIV-1 fusion inhibitor, for drug-resistant HIV infection in North and South America. *N Engl J Med*, 2003, 348: 2175–2185
- 9 Jiang S, Lin K, Strick N, et al. HIV-1 inhibition by a peptide. *Nature*, 1993, 365: 113
- 10 Fätkenheuer G, Pozniak A L, Johnson M A, et al. Efficacy of short-term monotherapy with maraviroc, a new CCR5 antagonist, in patients infected with HIV-1. *Nat Med*, 2005, 11: 1170–1172
- 11 Deeks S G, Overbaugh J, Phillips A, et al. HIV infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2015, 1: 15035
- 12 Liu J, Bartsaghi A, Borgnia M J, et al. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature*, 2008, 455: 109–113
- 13 Starcich B R, Hahn B H, Shaw G M, et al. Identification and characterization of conserved and variable regions in the envelope gene of HTLV-III/LAV, the retrovirus of AIDS. *Cell*, 1986, 45: 637–648
- 14 D’Souza M P, Cairns J S, Plaeger S F. Current evidence and future directions for targeting HIV entry. *JAMA*, 2000, 284: 215
- 15 Deen K C, McDougal J S, Inacker R, et al. soluble form of CD4 (T4) protein inhibits AIDS virus infection. *Nature*, 1988, 331: 82–84
- 16 Trauneker A, Lüke W, Karjalainen K. Soluble CD4 molecules neutralize human immunodeficiency virus type 1. *Nature*, 1988, 331: 84–86
- 17 Daar E S, Li X L, Moudgil T, et al. High concentrations of recombinant soluble CD4 are required to neutralize primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 6574–6578
- 18 Orloff S L, Kennedy M S, Belperron A A, et al. Two mechanisms of soluble CD4 (sCD4)-mediated inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infectivity and their relation to primary HIV-1 isolates with reduced sensitivity to sCD4. *J Virol*, 1993, 67: 1461–1471
- 19 Kahn J O, Allan J D, Hodges T L, et al. The safety and pharmacokinetics of recombinant soluble CD4 (rCD4) in subjects with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I study. *Ann Intern Med*, 1990, 112: 254–261
- 20 Schooley R T, Merigan T C, Gaut P, et al. Recombinant soluble CD4 therapy in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and AIDS-related complex. A phase I-II escalating dosage trial. *Ann Intern Med*, 1990, 112: 247–253
- 21 Sullivan N, Sun Y, Binley J, et al. Determinants of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein activation by soluble CD4 and monoclonal antibodies. *J Virol*, 1998, 72: 6332–6338
- 22 Haim H, Si Z, Madani N, et al. Soluble CD4 and CD4-mimetic compounds inhibit HIV-1 infection by induction of a short-lived activated state. *PLoS Pathog*, 2009, 5: e1000360
- 23 Allaway G P, Davis-Bruno K L, Beaudry G A, et al. Expression and characterization of CD4-IgG₂, a novel heterotetramer that neutralizes primary HIV type 1 isolates. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 1995, 11: 533–539
- 24 Trkola A, Pomaes A B, Yuan H, et al. Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol*, 1995, 69: 6609–6617
- 25 Gauduin M C, Allaway G P, Olson W C, et al. CD4-immunoglobulin G2 protects Hu-PBL-SCID mice against challenge by primary human immunodeficiency virus type 1 isolates. *J Virol*, 1998, 72: 3475–3478
- 26 Jacobson J M, Lowy I, Fletcher C V, et al. Single-dose safety, pharmacology, and antiviral activity of the human immunodeficiency virus (HIV) type 1 entry inhibitor PRO 542 in HIV-infected adults. *J Infect Dis*, 2000, 182: 326–329

- 27 Jacobson J M, Israel R J, Lowy I, et al. Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48: 423–429
- 28 Vita C, Drakopoulou E, Vizzavona J, et al. Rational engineering of a miniprotein that reproduces the core of the CD4 site interacting with HIV-1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13091–13096
- 29 Li H, Song H, Heredia A, et al. Synthetic bivalent CD4-mimetic miniproteins show enhanced anti-HIV activity over the monovalent miniprotein. *Bioconjug Chem*, 2004, 15: 783–789
- 30 Li H, Guan Y, Szczepanska A, et al. Synthesis and anti-HIV activity of trivalent CD4-mimetic miniproteins. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 4220–4228
- 31 Sharma D, Balamurali M M, Chakraborty K, et al. Protein minimization of the gp120 binding region of human CD4. *Biochemistry*, 2005, 44: 16192–16202
- 32 Chen W, Feng Y, Gong R, et al. Engineered single human CD4 domains as potent HIV-1 inhibitors and components of vaccine immunogens. *J Virol*, 2011, 85: 9395–9405
- 33 Chen W, Feng Y, Prabakaran P, et al. Exceptionally potent and broadly cross-reactive, bispecific multivalent HIV-1 inhibitors based on single human CD4 and antibody domains. *J Virol*, 2014, 88: 1125–1139
- 34 Sanders R W. HIV takes double hit before entry. *BMC Biol*, 2012, 10: 99
- 35 Pan C, Cai L, Lu H, et al. Combinations of the first and next generations of human immunodeficiency virus (HIV) fusion inhibitors exhibit a highly potent synergistic effect against enfuvirtide- sensitive and -resistant HIV type 1 strains. *J Virol*, 2009, 83: 7862–7872
- 36 Li W, Yu F, Wang Q, et al. Co-delivery of HIV-1 entry inhibitor and nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor shuttled by nanoparticles: cocktail therapeutic strategy for antiviral therapy. *AIDS*, 2016, 30: 827–838
- 37 Xu W, Wang Q, Yu F, et al. Synergistic effect resulting from combinations of a bifunctional HIV-1 antagonist with antiretroviral drugs. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 67: 1–6
- 38 Qi Q, Wang Q, Chen W, et al. HIV-1 gp41-targeting fusion inhibitory peptides enhance the gp120-targeting protein-mediated inactivation of HIV-1 virions. *Emerg Microbes Infect*, 2017, 6: 1–7
- 39 Ferrer M, Harrison S C. Peptide ligands to human immunodeficiency virus type 1 gp120 identified from phage display libraries. *J Virol*, 1999, 73: 5795–5802
- 40 Biorn A C, Cocklin S, Madani N, et al. Mode of action for linear peptide inhibitors of HIV-1 gp120 interactions. *Biochemistry*, 2004, 43: 1928–1938
- 41 Chaiken I, Rashad A A. Peptide triazole inactivators of HIV-1: how do they work and what is their potential? *Future Med Chem*, 2015, 7: 2305–2310
- 42 Aneja R, Rashad A A, Li H, et al. Peptide triazole inactivators of HIV-1 utilize a conserved two-cavity binding site at the junction of the inner and outer domains of Env gp120. *J Med Chem*, 2015, 58: 3843–3858
- 43 Bastian A R, Kantharaju A R, McFadden K, et al. Cell-free HIV-1 virucidal action by modified peptide triazole inhibitors of Env gp120. *Chemmedchem*, 2011, 6: 1335–1339
- 44 Bastian A R, Contarino M, Bailey L D, et al. Interactions of peptide triazole thiols with Env gp120 induce irreversible breakdown and inactivation of HIV-1 virions. *Retrovirology*, 2013, 10: 153
- 45 Rosemary Bastian A, Nangarli A, Bailey L D, et al. Mechanism of multivalent nanoparticle encounter with HIV-1 for potency enhancement of peptide triazole virus inactivation. *J Biol Chem*, 2015, 290: 529–543
- 46 Parajuli B, Acharya K, Yu R, et al. Lytic inactivation of human immunodeficiency virus by dual engagement of gp120 and gp41 domains in the virus Env protein trimer. *Biochemistry*, 2016, 55: 6100–6114
- 47 Parajuli B, Acharya K, Bach H C, et al. Restricted HIV-1 Env glycan engagement by lectin-reengineered DAVEI protein chimera is sufficient for lytic inactivation of the virus. *Biochem J*, 2018, 475: 931–957
- 48 Wang Q, Su S, Xue J, et al. An amphipathic peptide targeting the gp41 cytoplasmic tail kills HIV-1 virions and infected cells. *Sci Transl Med*, 2020, 12: eaaz2254
- 49 Woo P C Y, Lau S K P, Lam C S F, et al. Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus *Deltacoronavirus* supports bat coronaviruses as the gene source of *Alphacoronavirus* and *Betacoronavirus* and avian coronaviruses as the gene source of *Gammacoronavirus* and *Deltacoronavirus*. *J Virol*, 2012, 86: 3995–4008

- 50 Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends Microbiol*, 2016, 24: 490–502
- 51 Peiris J, Lai S T, Poon L, et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet*, 2003, 361: 1319–1325
- 52 Zaki A M, van Boheemen S, Bestebroer T M, et al. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N Engl J Med*, 2012, 367: 1814–1820
- 53 Lamb Y N. Remdesivir: first approval. *Drugs*, 2020, 80: 1355–1363
- 54 Weinreich D M, Sivapalasingam S, Norton T, et al. REGN-COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with COVID-19. *N Engl J Med*, 2021, 384: 238–251
- 55 An EUA for sotrovimab for treatment of COVID-19. *Med Lett Drugs Ther*, 2021, 63: 97–98
- 56 Wrapp D, Wang N, Corbett K S, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 2020, 367: 1260–1263
- 57 Raj V S, Mou H, Smits S L, et al. Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 2013, 495: 251–254
- 58 Li W, Moore M J, Vasilieva N, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 2003, 426: 450–454
- 59 Wang S, Qiu Z, Hou Y, et al. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res*, 2021, 31: 126–140
- 60 Wei C, Wan L, Yan Q, et al. HDL-scavenger receptor B type 1 facilitates SARS-CoV-2 entry. *Nat Metab*, 2020, 2: 1391–1400
- 61 Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell*, 2020, 181: 271–280.e8
- 62 Xia S, Lan Q, Su S, et al. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 92
- 63 Xia S, Liu M, Wang C, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*, 2020, 30: 343–355
- 64 Xia S, Zhu Y, Liu M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*, 2020, 17: 765–767
- 65 Ksiazek T G, Erdman D, Goldsmith C S, et al. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348: 1953–1966
- 66 Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727–733
- 67 Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, 2005, 436: 112–116
- 68 Hemnes A R, Rathinasabapathy A, Austin E A, et al. A potential therapeutic role for angiotensin-converting enzyme 2 in human pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*, 2018, 51: 1702638
- 69 Kuba K, Imai Y, Rao S, et al. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury. *Nat Med*, 2005, 11: 875–879
- 70 Haschke M, Schuster M, Poglitsch M, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in healthy human subjects. *Clin Pharmacokinet*, 2013, 52: 783–792
- 71 Khan A, Benthin C, Zeno B, et al. A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Crit Care*, 2017, 21: 234
- 72 Battle D, Wysocki J, Satchell K. Soluble angiotensin-converting enzyme 2: a potential approach for coronavirus infection therapy? *Clin Sci*, 2020, 134: 543–545
- 73 Alhenc-Gelas F, Drueke T B. Blockade of SARS-CoV-2 infection by recombinant soluble ACE2. *Kidney Int*, 2020, 97: 1091–1093
- 74 Hofmann H, Geier M, Marzi A, et al. Susceptibility to SARS coronavirus S protein-driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 319: 1216–1221
- 75 Monteil V, Kwon H, Prado P, et al. Inhibition of SARS-CoV-2 infections in engineered human tissues using clinical-grade soluble human ACE2. *Cell*, 2020, 181: 905–913.e7
- 76 Chan K K, Dorosky D, Sharma P, et al. Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2. *Science*, 2020, 369: 1261–1265

- 77 Guo L, Bi W, Wang X, et al. Engineered trimeric ACE2 binds viral spike protein and locks it in “Three-up” conformation to potently inhibit SARS-CoV-2 infection. *Cell Res*, 2021, 31: 98–100
- 78 Lei C, Qian K, Li T, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 spike pseudotyped virus by recombinant ACE2-Ig. *Nat Commun*, 2020, 11: 2070
- 79 Iwanaga N, Cooper L, Rong L, et al. Novel ACE2-IgG1 fusions with improved *in vitro* and *in vivo* activity against SARS-CoV2. *bioRxiv*, 2020.06.15.152157
- 80 Moore M J, Dorfman T, Li W, et al. Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2. *J Virol*, 2004, 78: 10628–10635
- 81 Zhang G, Pomplun S, Loftis A R, et al. Investigation of ACE2 N-terminal fragments binding to SARS-CoV-2 Spike RBD. *bioRxiv*, 2020.03.19.999318
- 82 Zhang G, Pomplun S, Loftis A R, et al. The first-in-class peptide binder to the SARS-CoV-2 spike protein. *bioRxiv*, 2020, 2020.03.19.999318
- 83 Yan R, Zhang Y, Li Y, et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, 367: 1444–1448
- 84 Basit A, Ali T, Rehman S U. Truncated human angiotensin converting enzyme 2; a potential inhibitor of SARS-CoV-2 spike glycoprotein and potent COVID-19 therapeutic agent. *J Biomol Struct Dyn*, 2020, doi: 10.1080/07391102.2020.1768150
- 85 Xia S, Yan L, Xu W, et al. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*, 2019, 5: eaav4580
- 86 Clausen T M, Sandoval D R, Spliid C B, et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. *Cell*, 2020, 183: 1043–1057.e15
- 87 Mycroft-West C J, Su D, Pagani I, et al. Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: Structural dependence of the interaction of the Spike S1 receptor-binding domain with heparin. *Thromb Haemost*, 2020, 120: 1700–1715
- 88 Slon Campos J L, Mongkolsapaya J, Screaton G R. The immune response against flaviviruses. *Nat Immunol*, 2018, 19: 1189–1198
- 89 Kuno G, Chang G J J, Tsuchiya K R, et al. Phylogeny of the genus Flavivirus. *J Virol*, 1998, 72: 73–83
- 90 Lim S P, Wang Q Y, Noble C G, et al. Ten years of dengue drug discovery: progress and prospects. *Antiviral Res*, 2013, 100: 500–519
- 91 Cui L, Zou P, Chen E, et al. Visual and motor deficits in grown-up mice with congenital Zika virus infection. *Ebiomedicine*, 2017, 20: 193–201
- 92 Culshaw A, Mongkolsapaya J, Screaton G. The immunology of Zika virus. *F1000Research*, 2018, 7: 203
- 93 Han Y, Mesplède T. Investigational drugs for the treatment of Zika virus infection: a preclinical and clinical update. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27: 951–962
- 94 Wang X, Zou P, Wu F, et al. Development of small-molecule viral inhibitors targeting various stages of the life cycle of emerging and re-emerging viruses. *Front Med*, 2017, 11: 449–461
- 95 Zhang X, Ge P, Yu X, et al. Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-Å resolution. *Nat Struct Mol Biol*, 2013, 20: 105–110
- 96 Li L, Lok S M, Yu I M, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, 2008, 319: 1830–1834
- 97 Klein D E, Choi J L, Harrison S C. Structure of a dengue virus envelope protein late-stage fusion intermediate. *J Virol*, 2013, 87: 2287–2293
- 98 Harrison S C. Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 690–698
- 99 Chew M F, Poh K S, Poh C L. Peptides as therapeutic agents for dengue virus. *Int J Med Sci*, 2017, 14: 1342–1359
- 100 Modis Y, Ogata S, Clements D, et al. A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6986–6991
- 101 Panya A, Bangphoomi K, Choowongkamon K, et al. Peptide inhibitors against dengue virus infection. *Chem Biol Drug Des*, 2014, 84: 148–157
- 102 Hung J J, Hsieh M T, Young M J, et al. An external loop region of domain III of dengue virus type 2 envelope protein is involved in serotype-specific binding to mosquito but not mammalian cells. *J Virol*, 2004, 78: 378–388
- 103 Mazumder R, Hu Z Z, Vinayaka C R, et al. Computational analysis and identification of amino acid sites in dengue E proteins relevant to development of diagnostics and vaccines. *Virus Genes*, 2007, 35: 175–186
- 104 Alhoot M A, Rathinam A K, Wang S M, et al. Inhibition of dengue virus entry into target cells using synthetic antiviral peptides. *Int J Med Sci*, 2013, 10: 719–729
- 105 Hrobowski Y M, Garry R F, Michael S F. Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity. *Virol J*, 2005, 2: 49
- 106 Lok S M, Costin J M, Hrobowski Y M, et al. Release of dengue virus genome induced by a peptide inhibitor. *PLoS ONE*, 2012, 7: e50995
- 107 Schmidt A G, Yang P L, Harrison S C. Peptide inhibitors of flavivirus entry derived from the E protein stem. *J Virol*, 2010, 84: 12549–12554

- 108 Schmidt A G, Yang P L, Harrison S C. Peptide inhibitors of dengue-virus entry target a late-stage fusion intermediate. [PLoS Pathog](#), 2010, 6: e1000851
- 109 Si L, Meng Y, Tian F, et al. A peptide-based virus inactivator protects male mice against Zika virus-induced damage of testicular tissue. [Front Microbiol](#), 2019, 10: 2250
- 110 Yu Y, Deng Y Q, Zou P, et al. A peptide-based viral inactivator inhibits Zika virus infection in pregnant mice and fetuses. [Nat Commun](#), 2017, 8: 15672
- 111 Costin J M, Jenwitheesuk E, Lok S M, et al. Structural optimization and de novo design of dengue virus entry inhibitory peptides. [PLoS Negl Trop Dis](#), 2010, 4: e721
- 112 Panya A, Sawasdee N, Junking M, et al. A peptide inhibitor derived from the conserved ectodomain region of DENV membrane (M) protein with activity against dengue virus infection. [Chem Biol Drug Des](#), 2015, 86: 1093–1104
- 113 Huerta V, Chinae G, Fleitas N, et al. Characterization of the interaction of domain III of the envelope protein of dengue virus with putative receptors from CHO cells. [Virus Res](#), 2008, 137: 225–234
- 114 Perez E E, Riley J L, Carroll R G, et al. Suppression of HIV-1 infection in primary CD4 T cells transduced with a self-inactivating lentiviral vector encoding a membrane expressed gp41-derived fusion inhibitor. [Clin Immunol](#), 2005, 115: 26–32
- 115 Egerer L, Volk A, Kahle J, et al. Secreted antiviral entry inhibitory (SAVE) peptides for gene therapy of HIV infection. [Mol Ther](#), 2011, 19: 1236–1244
- 116 Falkenhagen A, Ameli M, Asad S, et al. A novel gene therapy strategy using secreted multifunctional anti-HIV proteins to confer protection to gene-modified and unmodified target cells. [Gene Ther](#), 2014, 21: 175–187
- 117 Falkenhagen A, Singh J, Asad S, et al. Control of HIV Infection *in vivo* using gene therapy with a secreted entry inhibitor. [Mol Ther Nucleic Acids](#), 2017, 9: 132–144
- 118 Baseler L, Chertow D S, Johnson K M, et al. The pathogenesis of Ebola virus disease. [Annu Rev Pathol Mech Dis](#), 2017, 12: 387–418
- 119 Mubarak A, Alturaiki W, Hemida M G. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): infection, immunological response, and vaccine development. [J Immunol Res](#), 2019, 2019: 1–11

Protein-based virus inactivators: immediate inactivators of circulating virions

SU XiaoJie, JIANG ShiBo & LU Lu

Key Laboratory of Medical Molecular Virology (MOE/NHC/CAMS), School of Basic Medical Sciences, Fudan University, Shanghai 200032, China

Infectious diseases caused by enveloped viruses, such as human immunodeficiency virus (HIV) and severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), pose significant threats to global public health. Most currently available antiviral drugs inhibit viral infection by inhibiting the viral entry process or intracellular viral replications. However, these agents have little antiviral effect while in circulation and instead exert their inhibitory activity during or after virions infect cells. In contrast, protein-based virus inactivators are antiviral proteins or peptides able to directly inactivate free virions. Virus inactivators primarily function by interacting with one or more sites on virion envelope glycoproteins (Envs), causing Env impairment or viral genome release. Protein-based virus inactivators have attracted increasing attention as they are expected to have a higher utilization rate than current antiviral drugs and be safer for *in vivo* human applications than chemical-based virus inactivators. Herein, we summarize recent progress in developing protein-based virus inactivators against several important enveloped viruses, including HIV, SARS-CoV and SARS-CoV-2, dengue virus (DENV), and Zika virus (ZIKV). Further, we discuss their potential uses during outbreaks or pandemics caused by emerging or re-emerging viruses.

enveloped viruses, envelope glycoprotein, virus inactivators, emerging and re-emerging viruses, emerging coronaviruses

doi: [10.1360/SSV-2021-0046](https://doi.org/10.1360/SSV-2021-0046)



陆路, 复旦大学基础医学院研究员, 博士生导师, 医学分子病毒学教育部/卫健委/中国医科院重点实验室暨病原生物学系副主任. 2009年于清华大学生物科学与技术系获得博士学位. 2018年获得国家自然科学基金“优秀青年科学基金”项目资助. 2020年入选教育部“长江学者奖励计划”特岗教授、国家百千万人才工程, 被授予“有突出贡献中青年专家”荣誉称号. 长期从事重要病毒感染防治及重大传染病防治策略的相关研究, 在抗病毒药物及疫苗等领域获得一系列突破性进展. 以第一/通讯作者(含共同作者)身份在*Science*, *Cell*, *Cell Research*等学术期刊上发表论文30余篇. 获得授权专利16项, 完成8项专利转让/转化.