

冠状病毒刺突蛋白亚基 2 介导病毒膜融合的作用机制及抑制剂研究进展

李溢璇, 谢莎, 何航*, 孙彦刚*

河南中医药大学 医学院, 河南 郑州

李溢璇, 谢莎, 何航, 孙彦刚. 冠状病毒刺突蛋白亚基 2 介导病毒膜融合的作用机制及抑制剂研究进展[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3162-3179.

LI Yixuan, XIE Sha, HE Hang, SUN Yangang. Research progress in the mechanism of coronavirus spike protein subunit 2 in mediating viral membrane fusion and its inhibitors[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(7): 3162-3179.

摘要: 冠状病毒感染严重威胁人类生命健康, 且对畜牧业造成巨大的经济损失。冠状病毒主要通过细胞表面膜融合途径和内体膜融合途径侵入宿主细胞。在病毒入侵过程中, 刺突蛋白亚基 1 (spike protein subunit 1, S1) 负责识别并结合宿主细胞受体, 刺突蛋白亚基 2 (spike protein subunit 2, S2) 介导病毒膜与宿主细胞膜的融合。由于 S2 在不同冠状病毒中高度保守, 阻断其介导的膜融合过程可有效抑制病毒感染, 因此成为广谱抗冠状病毒药物研发的重要靶点。本文综述了近年来冠状病毒入侵宿主细胞的分子机制、S 蛋白的结构与功能特征以及膜融合抑制剂的研究进展, 并分析了靶向 S2 药物研发面临的挑战与未来发展方向, 以期对冠状病毒的防控策略及新型抗病毒药物研发提供理论参考。

关键词: 冠状病毒; 刺突蛋白; 刺突蛋白亚基 2; 膜融合; 抑制剂

Research progress in the mechanism of coronavirus spike protein subunit 2 in mediating viral membrane fusion and its inhibitors

LI Yixuan, XIE Sha, HE Hang*, SUN Yangang*

School of Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, Henan, China

Abstract: Coronavirus infections pose a serious threat to human health and have resulted in

资助项目: 中国博士后科学基金(2023M741084); 国家自然科学基金(32102687)

This work was supported by the China Postdoctoral Science Foundation (2023M741084) and the National Natural Science Foundation of China (32102687).

*Corresponding authors. E-mail: SUN Yangang, wedeyouxiang1989@126.com; HE Hang, hehang0193@hactcm.edu.cn

Received: 2025-11-03; Accepted: 2026-03-01; Published online: 2026-03-04

substantial economic losses to the livestock industry. Coronaviruses invade host cells primarily through two pathways: cell surface membrane fusion and endosomal membrane fusion. During viral entry, the spike protein subunit 1 (S1) recognizes and binds to cellular receptors, while the spike protein subunit 2 (S2) facilitates membrane fusion between the viral envelope and host cell membrane. Due to its high sequence conservation across different coronaviruses, S2 represents an attractive target for the development of broad-spectrum antiviral agents. Blocking S2-mediated membrane fusion can effectively inhibit viral infection. This review summarizes recent advances in understanding the mechanisms of coronavirus entry into host cells, the structure and function of the spike protein, and the development of membrane fusion inhibitors. In addition, this paper discusses the challenges and future prospects in targeting S2 for antiviral drug development, aiming to provide insights for coronavirus prevention and the discovery of novel antiviral therapeutics.

Keywords: coronavirus; spike protein; spike protein subunit 2; membrane fusion; inhibitor

冠状病毒(coronavirus, CoV)是一类具有广泛宿主范围和传播能力的 RNA 病毒,其感染可致使禽类和哺乳动物出现严重的呼吸系统、消化系统及神经系统疾病。感染人类的冠状病毒主要有 7 种,人冠状病毒(human coronavirus, HCoV)-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1 可引发人体轻微上呼吸道疾病;严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)、中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2)则会导致人体出现严重呼吸道症状和炎症因子风暴,甚至造成患者死亡,给人类生命安全带来巨大威胁^[1-2]。此外,2017-2018 年在马来西亚砂拉越邦住院肺炎患者样本中发现了一种新型犬-猫重组 α 冠状病毒(基因 II 型)CCoV-HuPn-2018,这是首个被证实可感染人类的犬冠状病毒^[3]。Lednicky 等^[4]也报道在海地检测到猪德尔塔冠状病毒(porcine delta coronavirus, PDCoV)感染儿童的病例。除感染人类外,冠状病毒对畜牧业危害也极为严重。例如, PDCoV^[5-6]、猪流行性腹泻病毒(porcine epidemic diarrhea virus, PEDV)^[7]和猪肠道 α 冠状病毒(porcine enteric

alphacoronavirus, PEAV) [又称猪急性腹泻综合征冠状病毒 (swine acute diarrhea syndrome coronavirus, SADS-CoV)]^[8-9]等可引发仔猪胃肠道疾病,导致动物死亡,给养殖业造成巨大经济损失。当前新出现的 SARS-CoV-2 BA.3.2 变异株具有很强的免疫逃逸能力^[10]。虽然已研发或筛选出瑞德西韦(Remdesivir)^[11]、Paxlovid^[12]等药物和多款疫苗,但冠状病毒的高变异性仍给疫情防控带来巨大挑战。

冠状病毒是一类具有包膜的正链 RNA 病毒,隶属于套式病毒目(Nidovirales)、冠状病毒科(Coronaviridae)、正冠状病毒亚科(Orthocoronavirinae)、冠状病毒属(Coronavirus)。依据国际病毒分类委员会的分类标准,冠状病毒科被划分为 4 个属: α 冠状病毒属(alpha-coronavirus, α -CoV)、 β 冠状病毒属(beta-coronavirus, β -CoV)、 γ 冠状病毒属(gamma-coronavirus, γ -CoV)和 δ 冠状病毒属(delta-coronavirus, δ -CoV)^[13]。冠状病毒基因组编码多种蛋白,包括结构蛋白和非结构蛋白,结构蛋白有刺突蛋白(spike protein, S)、包膜蛋白(envelope protein, E)、膜蛋白(membrane protein, M)、核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, N)等, HCoV-OC43、HCoV-HKU1 和牛冠状病毒(bovine coronavirus, BCoV)等 β 冠状病毒 lineage

A (Embecovirus 亚属)病毒还表达血凝素酯酶蛋白(hemagglutinin-esterase protein, HE)^[14]。非结构蛋白有 RNA 依赖的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)、主蛋白酶(Mpro/3CLPro)、木瓜样蛋白酶(papain-like protease, PLpro)等,结构蛋白和非结构蛋白共同参与病毒复制、转录以及组装。

S 蛋白是冠状病毒编码的关键结构蛋白之一,可介导病毒感染宿主细胞。S 蛋白可分为亚基 1 (spike protein subunit 1, S1)和 S2, S1 亚基与宿主受体结合, S2 亚基介导病毒膜与宿主细胞膜(或内体膜)融合,其中 S2 亚基的七肽重复区 1 (heptad repeat1, HR1)与 HR2 相互作用形成六螺旋束(six-helix bundle, 6HB),将病毒囊膜与细胞膜或内体膜拉近发生膜融合,进而将病毒基因组释放到细胞质中,完成病毒入侵过程^[15-17] (图 1)。S2 蛋白在不同冠状病毒中具有

高度保守性,表明其结构不会因病毒的变异而发生显著改变。抑制或阻断其介导的病毒膜融合过程能够有效阻断病毒感染,是研发抗病毒药物的理想靶标^[18-19]。本文对近年来关于 S2 蛋白介导病毒入侵宿主细胞的作用机制以及抗病毒药物相关研究进行综述,以期为抗冠状病毒药物研发和相关疾病的预防和治疗提供参考。

1 冠状病毒入侵宿主细胞的作用机制

1.1 冠状病毒识别的受体或黏附因子

冠状病毒入侵宿主细胞的关键在于 S 蛋白与宿主细胞表面受体的特异性结合。S1 区域可分为 N 端结构域(S1 N-terminal domain, S1-NTD)和 C 端结构域(S1 C-terminal domain, S1-CTD)。S1-NTD 和 S1-CTD 均可与宿主细胞受体结合,

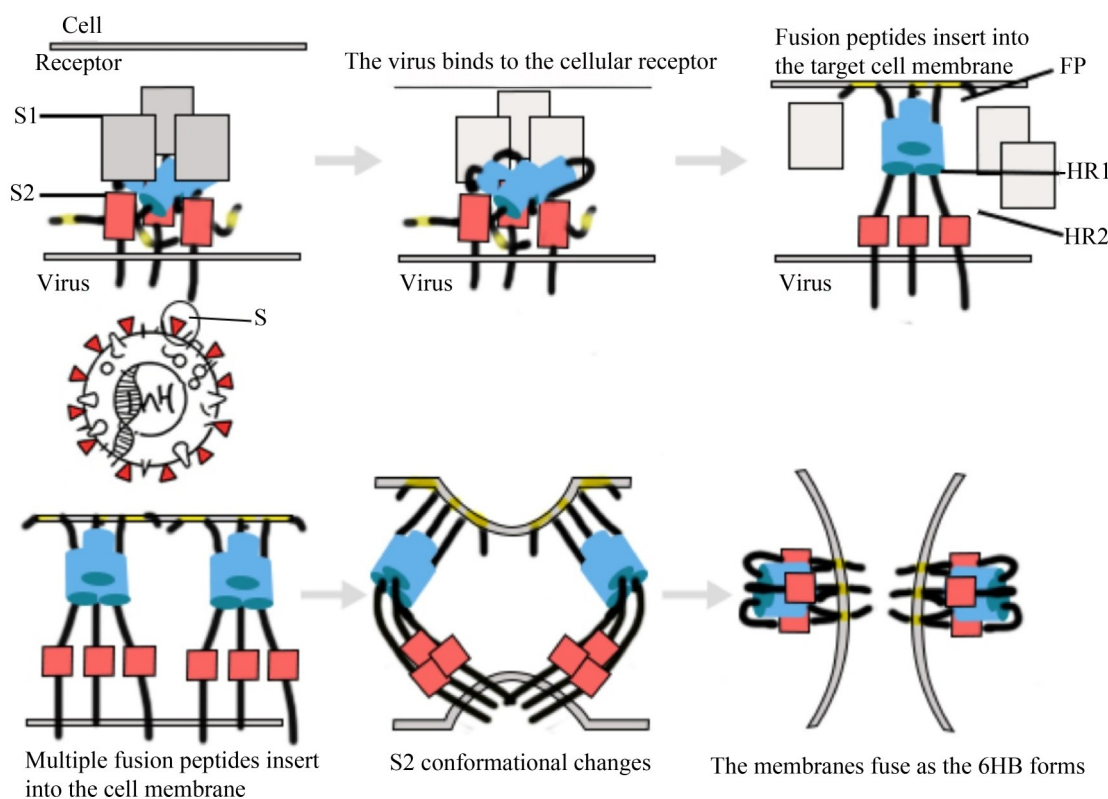


图1 冠状病毒膜融合机制

Figure 1 Mechanism of coronavirus membrane fusion.

且在不同属冠状病毒中能识别特定受体, 如 β 属鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus, MHV)的 S1-NTD 与鼠癌胚抗原相关细胞黏附分子 1a (carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1a, CEACAM1a)结合^[20]; SARS-CoV-1 和 SARS-CoV-2 通过 S1-CTD 结合血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2); MERS-CoV 则通过 S1-CTD 结合二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase 4, DPP4)。 α 属的 HCoV-229E 识别氨基肽酶 N (aminopeptidase N, APN), HCoV-NL63 也以 ACE2 作为受体。同时, S1 亚基可通过识别蛋白质或糖类黏附因子辅助病毒在细胞表面富集, 如 SARS-CoV-2 的 S1-NTD 可结合 AXL 受体酪氨酸激酶 (AXL receptor tyrosine kinase, AXL)^[21]、低密度脂蛋白受体结构域蛋白 3 (low-density lipoprotein receptor class A domain-containing protein 3, LDLRAD3)、跨膜蛋白 30A (transmembrane protein 30A, TMEM30A)和 C 型凝集素结构域家族 4 成员 G (C-type lectin domain family 4 member G, CLEC4G)^[22]等蛋白质, 而 PEDV、BCoV 等的 S1-NTD 则识别唾液酸及其衍生物(如 Neu5Ac、Neu5,9Ac₂等)^[23-24], 这些相互作用共同增强病毒与宿主细胞的初始结合效率。此外, S 蛋白经弗林蛋白酶(furin)切割后暴露 C 端 C-end Rule (CendR)基序, 该序列可以被神经纤毛蛋白 1 (neuropilin 1, NRP1)结合, 进一步促进 SARS-CoV-2 等病毒在细胞表面的附着与入侵^[25]。

1.2 冠状病毒入侵宿主细胞的方式

冠状病毒与宿主细胞受体结合后, 主要通过细胞表面膜融合和内体膜融合 2 种途径进入宿主细胞, 其 S 蛋白在介导病毒入侵宿主细胞过程中发挥着决定性作用。

1.2.1 细胞表面膜融合途径

与受体结合后, 宿主细胞表面的蛋白酶对 S 蛋白的切割是触发膜融合的关键步骤, 多种蛋白酶通过切割特定位置诱导 S 蛋白构象变化, 使 S 蛋白从预融合(pre-fusion)构象向融合活性构

象转变, 随后发生结构重排。跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane protease, serine 2, TMPRSS2)可直接切割 SARS-CoV-2 的 S 蛋白以激活其融合能力; 胰蛋白酶(trypsin)和嗜热菌蛋白酶(thermolysin)能增强多种冠状病毒的膜融合效率; 弗林蛋白酶则通过切割部分冠状病毒 S 蛋白的 S1/S2 位点, 为后续构象重排奠定基础。对于 HCoV-HKU1 等 β 属冠状病毒, 其 S 蛋白的 S1/S2 位点虽存在多碱性弗林蛋白酶切割序列, 但在细胞表面途径中 TMPRSS2 的丝氨酸蛋白酶结构域无需催化活性即可通过与 S 蛋白结合辅助入侵, 而其蛋白酶活性则在促进细胞-细胞融合中发挥作用^[26]。细胞表面蛋白酶切割触发 S 蛋白构象变化, 同时激活 S2 区域, 形成 6HB 结构, 介导病毒包膜与细胞膜融合, 完成病毒进入过程^[27]。

1.2.2 内体膜融合途径

在内体膜融合途径中, 细胞网格蛋白(clathrin, CME)、小窝蛋白(caveolin, CavME)介导的内吞途径以及巨胞饮(micropinocytosis, Macropino)等方式将病毒内吞进入细胞形成内体^[28-31]。CME 介导的内吞途径是冠状病毒最常见途径之一, 病毒与受体结合后诱导 CME 在细胞膜下聚集、内陷, 形成 CME 有被小窝, 动力蛋白(dynein)通过 GTP 酶活性驱动有被小窝从细胞膜脱落, 完成病毒内化, 在此过程中, 衔接蛋白 2 (adaptor protein 2, AP2)与 CME β 亚基结合, 对包被小窝的组装至关重要^[32]。研究发现, PEDV^[30]、SARS-CoV-2^[33]、HCoV-229E^[34]、BCoV^[35]、传染性支气管炎病毒(infectious bronchitis virus, IBV)^[36]等均主要通过该途径入侵宿主细胞。分选连接蛋白 10 (sorting nexin 10, SNX10)促进衔接蛋白复合物 2 mu 1 亚基(adaptor-related protein complex 2 mu 1 subunit, AP2M1)的磷酸化, 从而增强 CME 介导的病毒胞吞作用^[37]。此外, CME 重链(clathrin heavy chain, CHC)、动力蛋白、内吞作用辅助蛋白(epsin1)等也参与该途径的调控。

与 CME 介导的内吞途径不同, CavME 介导的内吞途径形成的囊泡进入细胞后会先形成小窝体(caveosome), 再与内体融合, 其酸化过程相对缓慢, 为病毒提供了独特的胞内转运微环境。HCoV-229E 在成纤维细胞中可通过该途径入侵, 依赖细胞膜上的 CavME 和脂质筏的参与, 形成不依赖 CME 的内吞囊泡^[38]。PEDV、BCoV 和 PDCoV 等病毒也可以通过该途径进入靶细胞^[31,35,39]。脂质筏介导的内吞途径不依赖 CME 和 CavME, 以脂质筏为平台形成内吞结构。研究表明, IBV 与宿主细胞表面受体结合后会聚集于脂质筏区域, 通过脂质筏的内陷形成囊泡进入细胞^[36]。SARS-CoV-2^[40]和 PEDV^[31]等冠状病毒也可以通过该途径进入细胞。此外, 部分冠状病毒在特定细胞中可通过 Macropino 途径入侵, 其特征是通过细胞膜的皱褶包裹病毒颗粒, 形成大型囊泡, 该途径受肌动蛋白重排和信号通路调控。研究发现, PDCoV^[41]和 PEDV^[42]等病毒均可通过该途径入侵靶细胞。

内吞囊泡的胞内转运与酸化是病毒释放基因组的关键环节, 冠状病毒一般要经历早期内体-晚期内体-晚期内体/溶酶体阶段。病毒内化后, 内吞囊泡经 Rab5 介导与早期内体融合, 再在 Rab7 作用下成熟为晚期内体, V-ATP 酶通过泵入 H⁺使内体 pH 从 6.0–6.5 降至 4.5–5.5^[43]。BCoV 的转运需 Rab7 和 Rab11 参与^[35], PEDV 需要 Rab7 的参与^[31], 而 HCoV-OC43 的内体酸化依赖 SNX10 对 V-ATP 酶活性的调节^[37]。晚期内体与溶酶体融合形成晚期内体/溶酶体, 内体 pH 值的逐步降低会触发病毒 S 蛋白的构象变化, 同时激活组织蛋白酶切割 S 蛋白形成 6HB, 促进病毒包膜与内体膜融合, 释放病毒基因组进入细胞质^[44]。这一酸化过程对感染至关重要, 氯喹、氯化铵等酸化抑制剂可通过中和内体 pH 值, 有效阻断多种冠状病毒的感染^[31,34,45]。总之, 冠状病毒能够通过多种内体途径进入宿主细胞, 单一靶向药物可能无法完全阻断病毒感染, 这也给抗冠状病毒药物的开发带来挑战。

1.3 冠状病毒入侵途径的偏好性

不同属冠状病毒的入侵偏好性存在显著差异, 这种差异主要由其 S 蛋白的切割活化方式和对宿主细胞蛋白酶环境的适应性决定。 β 属冠状病毒主要以细胞表面膜融合的途径入侵宿主细胞, 同时也可以通过内体膜融合途径侵入^[46]。位于细胞质膜的丝氨酸蛋白酶(如 TMPRSS2)或者外源蛋白酶(如 trypsin 等)会触发细胞表面膜融合途径, 与内体膜融合途径相比, 细胞表面膜融合途径更直接高效^[46]。例如, SARS-CoV-2 在表达 TMPRSS2 的鼻和支气管中倾向于通过细胞表面膜融合的内胞途径^[47]。Zhu 等^[47]研究发现, S 蛋白 S1/S2 切割位点碱性氨基酸的缺失促使病毒由细胞表面膜融合向内体膜融合途径转变, 并显著降低病毒的传染性。SARS-CoV-2 奥密克戎株 S 蛋白的 N679K/P681H 突变增强了组织蛋白酶切割效率, 显著提升内吞入侵偏好^[48]。细胞表面膜融合途径使 SARS-CoV-2 能够快速感染上呼吸道纤毛细胞等靶细胞, 也是其实现高效空气传播和高致病性的核心分子基础。

α 属冠状病毒如 PEDV 和 PEAV 等, 偏好内体膜融合途径^[28,30,49]。这些病毒的 S 蛋白不易被细胞表面蛋白酶有效切割, 因此依赖于内体膜融合途径侵入, 在内体酸性环境和组织蛋白酶 B/L 等蛋白酶的共同作用下, S 蛋白被活化并触发膜融合。然而, 研究中发现在外源添加 trypsin 或过表达 TMPRSS2 和镶嵌型丝氨酸蛋白酶大片段(mosaic serine protease large-form, MSPL)时也能够促进 PEDV 的增殖^[50-51], trypsin 切割依赖于 S2 亚基^[50], 这也从另一个角度解释了 PEDV 为何在富含蛋白酶的肠道中易感。 γ 属冠状病毒(如 IBV)专一通过内体膜融合途径侵入宿主细胞。IBV S 蛋白缺乏 TMPRSS2 切割位点, 需通过 CME 介导的内吞进入内体, 经低 pH 环境诱导构象变化后, 由组织蛋白酶切割激活膜融合^[36]。 δ 属冠状病毒(如 PDCoV)主要通过内体膜融合途径侵入宿主细胞^[29,41,52]。Liang 等^[53]研究表明, δ 属冠状病毒 HKU11、HKU13、

PDCoV (HKU15)和 HKU17 的 S 蛋白假病毒能够通过 CME 介导的内吞途径进入 DF-1 细胞。外源性 trypsin 对 PDCoV 感染人类来源细胞无显著影响, 跨膜丝氨酸蛋白酶 11E (transmembrane serine protease 11E, TMPRSS11E) 能够促进 PDCoV 通过细胞表面膜融合途径侵入细胞, 同时 Huh7 细胞中高表达弗林蛋白酶在 PDCoV 复制周期的后期阶段也起着关键作用, 促进病毒粒子的成熟和释放^[54]。总之, 冠状病毒入侵途径的偏好性由冠状病毒 S 蛋白的切割方式和组织细胞的蛋白酶环境决定, 这种差异也决定了其传播力、致病性以及感染的组织器官。

2 冠状病毒 S 蛋白的结构与功能

2.1 冠状病毒的 S1 亚基结构和功能

冠状病毒 S1 亚基的 S1-NTD 和 S1-CTD 均以 β 折叠为核心。不同冠状病毒的 S1-CTD 呈现保守的 β -折叠片层结构, SARS-CoV 的 S1-CTD 含五链反平行 β -折叠, MERS-CoV 则为四链反平行 β -折叠, 它们通过受体结合基序(receptor binding motif, RBM)分别结合 ACE2 和 DPP4。S1-NTD 在 BCoV 中呈半乳糖凝集素折叠结构, 形状为含糖结合口袋, 可特异性识别唾液酸衍生物 Neu5,9Ac₂, 从而黏附于宿主细胞, 而 MHV 的 S1-NTD 通过类似折叠方式识别黏附因子 CEACAM1^[55]。

S 蛋白未与宿主细胞受体结合时, S 蛋白主要以受体结合区域(receptor binding domain, RBD)“向下”的“关闭”预融合构象存在(图 2A), 由 S1 和 S2 亚基通过非共价键连接^[56-58], 这种天然构象有助于免疫逃逸。S1 形成三聚体头部, S2 构成茎结构, 这种亚稳态结构依赖亚基间相互作用维持, 可防止 S 蛋白过早发生构象重排^[55]。当病毒靠近宿主细胞时, 1 个 RBD 与受体结合, 其余 RBD 会迅速转变为“向上”的开放状态构象, 暴露出 RBD 基序, 准备与受体结

合^[59]。RBD 与受体结合后, 会触发 S 蛋白的构象改变。Xing 等^[60]使用 SARS-CoV-2 的 S 蛋白和 ACE2 共培养的方法, 捕捉到了一种称为早期融合中间构象(early fusion intermediate conformation, E-FIC)的激活中间构象, 在这种状态下 S1 通过 RBD-SD1 与相邻的 N 端结构域之间的相互作用形成一个环(图 2B); 与预融合 S 相比, S2 亚基经历了显著的转变, 其中 HR1-中心螺旋(central helix, CH)被排出形成三股卷曲螺旋, 而 S2 仍与 S1 结合, 此结构的出现为后续的膜融合步骤做好准备。S 蛋白三聚体中每个 S1 亚基的 C 端与 S2 亚基 N 端存在界面作用, 而 S2 亚基的核心结构在膜融合过程中发生显著重排^[61]。

2.2 冠状病毒的 S2 亚基结构和功能

冠状病毒 S2 蛋白是其 S 蛋白的 C 端部分, 负责病毒包膜与宿主细胞膜的融合过程^[42]。S2 亚基包含融合肽(fusion peptide, FP)、HR1、CH、连接结构域(conserved domain, CD)、HR2、跨膜区域(transmembrane domain, TM)和胞内尾(intracellular tail, IC)等区域(图 3)^[60,62]。在预融合构象中, HR1 形成三聚体卷曲螺旋, HR2 呈柔性状态, FP 被包裹于内部。E-FIC 出现以后, 位于 S1 与 S2 亚基连接区域的 S1/S2 和 S2' 2 个切割位点, 经弗林蛋白酶或组织蛋白酶 L 等切割后触发向融合活性构象转变^[63-64]。S2 亚基与 S1 亚基脱落形成融合后(post-fusion)构象(图 2C): S2 片段中的 HR1 与 CH 形成超长中心三链卷曲螺旋(长度约 218 Å), 带动原本埋藏的功能型 FP(残基 867-909)发生约 185 Å 的空间位移, 插入宿主细胞膜并形成发夹状楔形三聚体贯穿脂质双层; 同时 HR2 反向折叠回绕 HR1 卷曲螺旋形成稳定的 6HB 结构(图 2D), 新增的 $\alpha^{1148-1155}$ 螺旋进一步加固该结构, 而 TM(残基 1212-1234)倾斜包裹 FP 楔形三聚体, IC 形成三角形结构封端膜内侧, FP 邻近区域(FP proximal region, FPPR)(残基 835-856)通过盐桥与 FP 锚定, 最终 S2 片段形成高度刚性的三聚

体终态，将病毒膜与宿主膜紧密拉近并完成融合^[62]。FP 上游的 857–866 位片段位于脂质双层的头部基团区域，其多个疏水残基朝向膜的疏水核心，该构象可帮助相邻的二硫键锁定 FPPR，使其 C 端半段也嵌入膜中，而 FPPR 的 N 端半段因连接无序的 s^{816–834} 片段而远离膜；此外，FPPR 与 FP 楔形结构通过盐桥紧密结合，FPPR 既在融合前协助固定 RBD，也可能在融合后帮助锚定 S2 的膜相互作用区域^[62]。冠状病毒 S2 亚基的 TM 与 IC 形成的结构模块，在维持预

融合构象稳定性和介导病毒颗粒组装中发挥辅助作用。TM 的疏水螺旋通过与包膜脂质的相互作用锚定 S 蛋白，而 IC 的短肽序列可能参与 N 蛋白的相互作用，这一结构特征确保了 S 蛋白在病毒表面的正确定位。整体而言，S2 亚基的结构既保证了预融合状态的稳定性，又能通过构象重排完成膜融合，其保守结构域为广谱抗病毒药物的设计提供了靶点^[65]。

2.2.1 6HB

6HB 是 S 蛋白从预融合到融合后构象转变

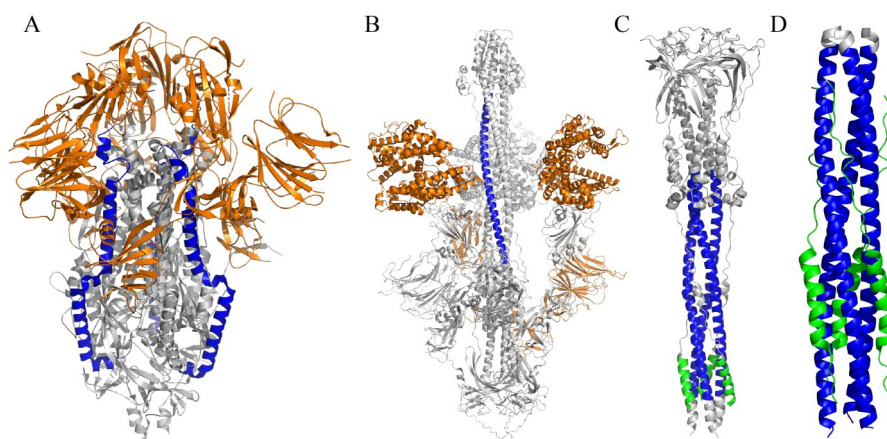


图2 SARS-CoV-2 S蛋白不同构象结构示意图

Figure 2 Schematic diagram of different conformational structures of SARS-CoV-2 S protein. A: Pre-fusion (PDB: 6VXX); B: Early fusion intermediate conformation (E-FIC) (PDB: 8Z7P); C: Post-fusion (PDB: 8FDW); D: 6HB (PDB: 6LXT). The hierarchical structures of S protein were visualized in cartoon mode using PyMOL, with key structural domains highlighted: the S1 subunit was marked in orange, HR1 in blue, HR2 in green, and the remaining protein regions displayed in gray.

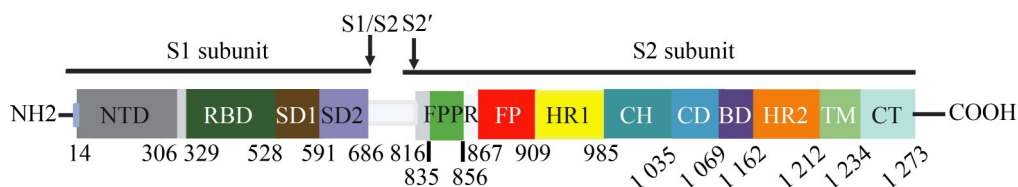


图3 SARS-CoV-2 S1和S2亚基结构

Figure 3 SARS-CoV-2 S1 and S2 subunit structures. NTD, RBD, subdomain 1 (SD1), subdomain 2 (SD2), fusion peptide proximal region (FPPR), fusion peptide (FP), heptad repeat 1 (HR1), central helix (CH), connector domain (CD), basal domain (BD), heptad repeat 2 (HR2), transmembrane anchor (TM), and cytoplasmic tail (CT). This figure was generated using the online software BioRender (<https://www.biorender.com/>).

的终末构象。6HB 的 3 个 HR1 螺旋通过 HR 重复序列的疏水相互作用形成中央卷曲螺旋, HR2 随后结合到 HR1 链形成的侧沟中, 且 HR1 与 HR2 之间存在广泛的相互作用, 包括疏水相互作用和氢键相互作用^[66]。对于 α 属冠状病毒, CCoV-HuPn-2018 的 6HB 整体呈左旋超螺旋, 长度约为 116 Å, 直径 30 Å, 而 SADS-CoV 的 6HB 长度约 107 Å, 直径 30 Å, 两者均呈现典型的杆状结构^[66]。

HR1 与 HR2 的结合具有高度互补性, 在 SARS-CoV-2 中 HR2 的疏水残基(如 V1 164、L1 166 等)嵌入 HR1 的疏水凹槽, 同时极性残基间形成特异性相互作用(如 HR1 的 K933 与 HR2 的 N1 192、D936、R1 185 分别形成 2.7 Å 的盐桥), 这些是维持 6HB 稳定性的关键^[67]。6HB 结构在不同属冠状病毒中存在差异, α 属的 CCoV-HuPn-2018 因 HR1 含 14 个氨基酸残基插入, HR2 也相应延长, 形成 23-turn 的 HR1 螺旋与 9-turn 的 HR2 螺旋; 而 SADS-CoV 因缺乏氨基酸残基插入, HR1 为 19-turn、HR2 仅 5-turn, 结构更接近 β 属; HR1 三聚体中央核心由疏水氨基酸(如 Leu、Ile)侧链紧密堆积形成疏水核心, HR1 与 HR2 的对应疏水残基进一步增强 6HB 的结构稳定性^[66]。 γ 和 δ 冠状病毒的 6HB 结构核心区域高度保守, 均由 HR2 双螺旋包裹 HR1 三聚体核心组成, 该构象与 α 和 β 冠状病毒相同, 疏水相互作用位点、氢键与盐桥等关键作用位点保守。总体而言, 冠状病毒 6HB 的形成本质一致、核心功能相同并且基本形态相似, 这也是可以通过阻断 6HB 的形成设计广谱抗冠状病毒药物的核心理论。

2.2.2 S2 亚基的保守性

S2 亚基作为冠状病毒 S 蛋白中高度保守的功能核心, 其结构和功能区域具有高度保守性, 这种保守性为广谱抗病毒策略提供了关键基础。研究表明, 与变异率较高的 S1 亚基相比, S2 的保守性在不同冠状病毒间更为显著。例如 SARS-CoV 与 SARS-CoV-2 的融合结构域具有

90% 的序列一致性^[68]。S2 亚基的整体折叠模式在 β 属冠状病毒中高度一致, 其核心结构域的空间排布几乎无显著差异^[69]。Wang 等^[70]在 S2 亚基的膜近端茎螺旋(stem helix, SH)区域鉴定了一个中和抗体表位, 该表位在 β 冠状病毒中存在功能保守性, 也是自然感染(人、单峰驼感染 MERS-CoV)和免疫后机体产生抗体的主要靶标之一。

S2 的保守性体现在多个介导膜融合的结构域中。FP 作为膜插入的关键结构, 其疏水核心序列在 α 属和 β 属冠状病毒中高度保守, 所有冠状病毒的 S 蛋白均具有高度保守的膜近端外部区域(membrane-proximal external region, MPER)和内部融合肽(internal fusion peptide, IFP), 其中 IFP 区域的保守性使其成为肽类模拟物药物开发的理想靶点^[71]。Ou 等^[71]对 β 冠状病毒 S2 亚基的潜在 FP 进行研究, 发现 HR-N 上游 17-22 个氨基酸的区域具备 I 类病毒融合蛋白 FP 特征, 该区域富含 Ala 或 Gly, 相对疏水且不含带电残基, 对 MERS-CoV (C 系)、SARS-CoV (B 系)、MHV (A 系)的 FP 进行定点突变后, 绝大多数疏水残基的精氨酸突变均会完全/显著抑制 S 蛋白介导的细胞-细胞融合和病毒入侵, GXXXG 基序在所有冠状病毒的 FP 区域中均有分布, 具有高度的保守性。S2 亚基的核心结构域(HR1-CH、6HB 和不变 β -折叠)确保了构象重折叠的稳定性, 关键功能位点(FP、TM 和 FPPR)确保膜融合的有效性, 且保守性优先体现在结构模式和功能互作, 而非全序列一致^[62]。MPER 作为 S2 亚基靠近跨膜域的关键片段, 其保守性同样显著, 且该区域的胆固醇识别序列在 β 属冠状病毒中高度同源, 参与膜融合的最终阶段^[72]。S2 亚基的 TM 和 IC 虽序列较短, 但空间构象在不同冠状病毒中高度一致, TM 的疏水螺旋通过与包膜脂质的相互作用锚定 S 蛋白的机制具有保守性。Dacon 等^[65]从进化角度指出, S2 亚基的 HR1-HR2 相互作用界面在 β 属冠状病毒中高度保守, 其氨基酸序列的一致性超

过 80%。

冠状病毒 S2 亚基的保守性也体现在其高级构象上,尤其在融合前和融合后的核心状态。冠状病毒 S 蛋白构象转变的基本路径为受体结合/S1 脱落、S2'位点切割、FP 弹出、HR1-HR2 形成 6HB 结构, S2 亚基完成预融合构象、融合中间态、稳定的融合后构象这一系列精确的构象重排过程^[16,60]。此外, S2 亚基在构象转变过程中的中间态(如 E-FIC)及其关键结构(如 IL770 环)也呈现保守特征, IL770 环中 S2'位点的切割机制在冠状病毒中普遍存在,是触发融合肽插入和构象重排的核心事件^[60]。6HB 构象也是所有冠状病毒都具有的最终构象,这种构象的存在也使得靶向 HR1 或 HR2 区域设计广谱抗冠状病毒药物成为可能^[18-19]。

3 冠状病毒膜融合抑制剂研究

3.1 基于 HR1 或 HR2 多肽的融合抑制剂

3.1.1 靶向 HR1 多肽

基于 HR2 序列设计的外源性多肽可竞争性结合 HR1,形成稳定的 6HB 结构,阻断病毒自身 HR1 和 HR2 的相互作用,抑制病毒膜融合过程^[18-19]。该方案以冠状病毒 HR2 的氨基酸序列为模板,直接截取参与 6HB 形成的核心功能片段,无需引入脂化、环化、定点突变等额外结构修饰。针对 SARS-CoV (如 CP-1)^[73-74]、MERS-CoV (如 MERS-HR2P)^[75-76]、PEDV (如 PEDV HR2P)^[77]、HCoV-229E (如 229E-HR2P)^[78] 等多个冠状病毒的研究均取得成功。SARS-CoV-2 出现以后,多个团队快速设计或筛选了 HR2 衍生肽,均显示出良好的抗病毒活性^[67,79-80]。然而,大多直接截取的 HR2 片段由于片段较短,空间构象较差,导致多肽的活性较低,一般为微摩尔级别。同时,此类多肽能够有效抑制蛋白酶介导细胞表面膜融合病毒感染,但对内体膜融合途径的影响很小^[81],因

此需要探索新的设计策略开发抑制多种感染途径的药物,进一步提高药物的抗病毒活性。

为了增加 HR2 多肽与 HR1 区域的结合能力,提高多肽的结构稳定性和抗病毒活性,各研究团队对多肽进行了不同改造。(1)多肽序列改变,如在 HR2 多肽序列中引入负电荷和正电荷的氨基酸 Glu(E)和 Lys(K)的多肽(EK1)^[18]、HR2 多肽向 N 端延长(long HR2_42)以及点突变^[82-85],均能够提高多肽的活性。(2)环化肽,如碳氢化合物“订书钉”短 α 螺旋肽(P21S10、SCH2-1-20)^[86-88]。(3)脂肽修饰,以天然 HR2 多肽的核心功能序列为骨架,在 N 端或 C 端引入脂溶性基团(胆固醇、棕榈酰基、硬脂酰基等),部分通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)链或天然氨基酸连接子(如甘氨酸-丝氨酸-甘氨酸(glycine-serine-glycine, GSG))连接脂链与多肽主体,兼顾靶向结合活性与膜穿透能力。代表性的多肽如 EK1C4^[67]、IPB02 衍生物^[80,89-90]、HRC 脂肽^[56]、EK1-C16A^[91]、P315V3 (HY3000)^[19]和 [SARSHRC-PEG 4]2-cho^[92]。以上多肽改造策略均大幅提高多肽的抗病毒活性,具有良好的应用前景。

关于脂肽的研发已形成多个药物产品,正在进行临床试验。例如, EK1 雾化剂于 2021 年 9 月获得国家药品监督管理局下发的临床试验批准通知书,目前处于 III 期临床试验阶段^[93]。HY3000 鼻喷雾剂目前在中国完成 II 期临床试验(<https://www.hybio.com.cn>),并于 2023 年 1 月 28 日获得美国食品药品监督管理局批准可进入临床研究阶段^[19]。最新研究结果显示, HY3000 能够高效抑制新出现的 SARS-CoV-2 EG.5、EG.5.1 和 BA.2.86 变异株^[94],目前也处于 III 期临床试验阶段。源于 IPB02 衍生物肽的脂肽药物 YKYY017 雾化吸入剂, II 期随机对照试验结果显示, YKYY017 干预轻度至中度新冠患者,吸入 20 mg YKYY017 的患者在第 4 天的病毒载量减少量高于安慰剂,显示出潜在的抗病毒活性,吸入 10 mg 和 20 mg YKYY017 耐受性良

好, 安全性可接受^[95]。雾化吸入 IPB29 也已经进入Ⅲ期临床试验阶段^[96]。以上进入临床试验阶段的冠状病毒 HR2 多肽类药物, 为后续开发靶向 HR2 的药物提供了强大的理论和研发路径支撑。

3.1.2 其他类型的 HR1 多肽衍生物

为了进一步突破天然多肽在稳定性、半衰期、靶向性及生物利用度等方面的固有限制, 不同团队进行了多肽衍生物的制备, 包括引入非天然结构单元、功能结构域融合、纳米材料修饰或多聚化组装等方案。(1) 非天然骨架修饰: 如以磺酰- γ -AA 等非天然氨基酸替代天然 L-氨基酸, 改变肽链空间构象, 降低蛋白酶识别位点暴露, 同时维持与 HR1 的疏水结合活性, 提升口服生物利用度^[97]。(2) 功能结构域融合多为双靶点融合设计, 如将红藻凝集素 G (griffithsin, GRFT)^[98]、纤维连接蛋白Ⅲ型结构域 (fibronectin type III domain (FN3)), 可与白蛋白结合^[99]、ACE2 或 ACE2 衍生的 A1 肽段^[60,100-101]以及 RBD 区域^[102]等与 HR2 衍生肽连接, 形成新的蛋白分子, 与单独使用各组分相比, 均能大大提升其抗病毒活性, 其中 RBD-IPB01 蛋白展现出广谱性、低细胞毒性、高胰蛋白酶抵抗性和良好代谢稳定性^[102]。(3) 纳米化修饰, 如将金纳米棒等载体通过疏水作用与多肽结合, 保护肽链不被降解, 同时提升细胞穿透效率, 改善生物相容性^[103]。总之, 上述 HR1 或 HR2 多肽衍生物从多个层面对药物进行改造或修饰, 以期提高其功能活性或成药性, 为抗冠状病毒多肽类药物开发提供参考, 同时探寻提高多肽药物的吸收和代谢的新方法也是未来研究的重点。

3.1.3 靶向 HR2 的多肽

在冠状病毒 S 蛋白三聚体融合前结构中 HR1 区域被包裹埋藏, 因此理论上基于 HR2 设计的 HR1 靶向肽, 仅在 S 蛋白融合中间体形成时发挥功能, 而 HR2 位于外围, 也是设计阻断病毒膜融合的靶标。Sun 等^[104]靶向 MERS-CoV

HR2 区域设计了一个包含 3 个 HR1 和 2 个 HR2 的蛋白 MERS-5HB, 该蛋白与 HR2 区域稳定结合, 有效抑制 MERS-CoV 假病毒进入细胞, 以及显著抑制 S 蛋白介导的膜融合。Xing 等^[105]靶向 SARS-CoV-2 HR2 区域设计了 5HB 蛋白, 该蛋白能与 HR2 区域形成稳定的 6HB 结构, 有效抑制 SARS-CoV-2 野生型毒株(nCoV-SH01)及其 Delta 变异株的感染。此外, Lin 等^[106]也设计了 5HB, 结果显示该蛋白能够在血清和低 pH 环境中与 SARS-CoV-2 S 蛋白融合前结构结合, 暗示其在 SARS-CoV-2 通过细胞膜表面或内体膜融合途径进入时的抑制能力, 同时该蛋白也能够中和 S 介导的主要 SARS-CoV-2 变异株及多种沙粒病毒科(Arenaviridae)的感染。总之, 5HB 设计方案也可以作为一种制备冠状病毒新型抑制剂的策略。

3.2 靶向 FP 区域的多肽

除了靶向 HR1 和 HR2 区域以外, 还有团队靶向 FP 区域设计了多肽分子。Safiriyu 等^[107]基于冠状病毒的 FP 区域设计了多肽 MFP633, 该多肽含有中央脯氨酸-脯氨酸二联体, 能够抑制 MHV 感染和复制, 利用脂质体介导递送系统将多肽给予小鼠, 其表现出良好的抗病毒活性。此类研究报道相对较少, 还处于前期研究阶段。

3.3 抗体类抑制剂

S 蛋白是冠状病毒的主要免疫原性蛋白, 在诱导机体产生免疫保护中发挥关键作用。针对 S2 区域筛选抗冠状病毒的抗体也是开发抗病毒药物的热点。本课题组对 PEDV 的 S1-COE (CO-26K equivalent)区域进行了表达和纯化, 该区域是 PEDV 的一个重要中和表位区域, 并被用作设计 PEDV 亚单位疫苗^[108]。本课题组通过免疫小鼠制备单克隆抗体, 并对其抗原表位进行测定, 最终筛选得到一个新的线性 B 细胞表位-⁵⁹²TSLLASACTIDLF⁶⁰⁷GYP⁶⁰⁷, 该表位的最短识别序列为⁶⁰⁴FGYP⁶⁰⁷, 其中 604F、605G 和 606Y 为其关键识别位点; 保守性分析结果显

示, 该表位在 PEDV 各毒株中高度保守^[109]。该表位的鉴定进一步丰富了 PEDV 的抗原表位谱, 为 PEDV 亚单位疫苗的设计提供参考。此外, 靶向 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 的全人源 IgG1 单克隆抗体贝特洛韦(bebtelovimab), 能够有效中和 Omicron 多种变异株, 其作用机制为直接干扰病毒进入宿主细胞, 降低病毒载量^[110]。安巴韦单抗/罗米司韦单抗 (Amubarvimab/Romlusevimab)是我国首次获批的具有自主知识产权的中和抗体联合治疗 SARS-CoV-2 药物, 在我国 COVID-19 患者的 II 期临床研究中表现出良好的安全性、耐受性及临床获益趋势^[111]。

目前报道的抗体类药物主要靶向 S 蛋白的 RBD, 此外针对 S2 亚基的抗体也逐渐受到关注^[112]。Pinto 等^[113]研究发现, S2 亚基茎螺旋区域的单克隆抗体 S2P6 与多种 β 冠状病毒 S 蛋白的 SH 交叉反应, 通过与该区域的疏水侧结合阻碍 6HB 形成, 抑制病毒膜融合; S2P6 通过病毒中和及 Fc 介导效应功能, 减轻感染 SARS-CoV-2 的仓鼠的病毒负荷。Sun 等^[114]从一名 SARS-CoV-2 康复患者中分离得到 76E1 抗体, 该抗体靶向 S2' 位点和 FP, 阻断病毒膜融合的发生。Dacon 等^[65]也筛选到靶向 S2' 位点和融合肽的广谱抗冠状病毒的中和抗体。Ko 等^[115]通过 mRNA-LNP 免疫策略筛选获得 b-S2-Mab-2 抗体, 其可以靶向 S2 亚基 HR2 的 D1 146-F1 152 保守序列, 对多个 SARS-CoV-2 变异株具有良好的中和活性。靶向 S2 亚基的纳米抗体 S102^[116]和抗体 54043-5^[117]等也显示出良好的抗病毒活性。此外, Pang 等^[118]靶向 S2 亚基 HR1 结构域设计了 HR121 蛋白疫苗, 该蛋白能够诱导兔子和恒河猴产生 SARS-CoV-2 及其变异株, 尤其是 Omicron 亚谱系的高效交叉中和抗体, 同时能够保护 hACE2 转基因小鼠、叙利亚金仓鼠和恒河猴抵抗 SARS-CoV-2 原始毒株的感染, 可以作为抗 SARS-CoV-2 变异毒株的疫苗候选。可见, 靶向 S2 亚基区域的抗体也显示出良好的抗病毒活性, 也是抗体筛选和疫苗制备的优秀

靶标。

3.4 其他类型的抑制剂

其他类型的抑制剂中, 小分子化合物、微小 RNA(microRNA, miRNA)分子及老药新用策略均展现出显著的冠状病毒膜融合抑制活性。Yang 等^[119]基于 SARS-CoV-2 S2 亚基筛选小分子膜融合抑制剂, 发现丹酚酸 C 特异性结合 HR1 区域, 有效抑制 S 蛋白介导的膜融合、假病毒感染, 同时能够抑制 SARS-CoV-2 活病毒感染。万欣等^[120]研究发现, 马铃薯三糖甘草次酸衍生物与 S1 与 S2 亚基交界处的空腔结合, 对 SARS-CoV-2 奥密克戎假病毒有显著抑制作用, 同时对其他 SARS-CoV-2 变异株假病毒有广谱抗病毒活性。miRNA 分子方面, Vaddadi 等^[121]发现多种靶向 SARS-CoV-2 S 蛋白的 miRNA, 能够将 S 蛋白水平降低超过 50%, 显著降低病毒复制。老药新用策略中, 阿比多尔(Arbidol)是一种俄罗斯制造的抗病毒药物, 用于治疗某些包膜病毒和非包膜病毒。一项临床随机对照试验显示, 阿比多尔显著促进 SARS-CoV-2 患者的临床和实验室检测指标的改善^[122]。研究表明, 阿比多尔可以通过阻碍病毒的附着和从细胞内囊泡释放发挥抗 SARS-CoV-2 的作用^[123]。Shuster 等^[124]研究表明, 阿比多尔与 SARS-CoV-2 S2 亚基膜融合结构域(1 046-1 066 位氨基酸残基)结合, 抑制病毒入侵细胞并诱导 S 蛋白的溶酶体降解。以上抑制剂可以为抗病毒治疗提供潜在替代方案, 以及与多肽或抗体类药物联用, 提高抗病毒效果。

4 总结与展望

冠状病毒 S2 蛋白介导的膜融合是病毒入侵的关键环节, 也是抗病毒药物研发的重要靶点。近年来, 随着对冠状病毒 S2 蛋白介导膜融合机制的深入研究, 越来越多的关键位点和结构域被揭示, 尤其是多款靶向 SARS-CoV-2 S2 亚基的喷鼻或吸入式药物进入临床研究阶段, 这些

研究成果为抗冠状病毒药物研发提供了重要依据和思路。冠状病毒具有高度变异性和抗药性,这使得针对其 S2 蛋白的药物研发面临巨大挑战: S2 蛋白构象变化的动态性和复杂性给结构解析和机制研究带来困难;药物靶点的筛选与验证需要建立更高效的评估体系;病毒变异可能产生的耐药性需要前瞻性考虑;抑制剂的体内递送和稳定性问题亟待解决。

靶向冠状病毒 S2 亚基的抗病毒药物的未来研究方向可能包括:开发靶向 S2 蛋白不同功能域(FP、HR1、HR2、TM 等)的多靶点抑制剂,寻找高结合能力、高广谱性的多肽、抗体药物或化合物等,以“鸡尾酒”的形式制备抗病毒药物,增强其抗病毒活性,延长其耐药性;利用人工智能辅助药物设计和优化,能够高效地设计抗病毒药物^[125],借助机器学习算法高效解析冠状病毒 S2 蛋白动态构象变化、精准预测药物与 FP、HR1、HR2 等功能域的结合位点,同时可前瞻性模拟病毒变异对靶点结构的影响,辅助设计出更易适配变异株的药物分子,大幅提升药物研发效率与针对性;探索新型递送系统(如纳米颗粒、外泌体等),尤其适合肠道冠状病毒的给药方式,有效保护抑制剂免受体内酶解,增强靶向性以精准抵达感染部位,同时延长药物循环时间,显著改善抑制剂的体内稳定性与生物利用度,破解当前抑制剂递送效率低、易被清除的难题;研究 S2 蛋白与宿主因子的相互作用,发现新的宿主靶点分子,明确其与 S2 蛋白的作用特征,阐明其分子作用机制,为开发靶向宿主分子抗病毒药物提供参考。

总之,设计出能够应对病毒变异和抗药性的抗冠状病毒药物是保障公共卫生安全的重要课题。随着多学科交叉融合和技术创新,针对冠状病毒膜融合过程的干预策略将不断丰富和完善,为应对当前和未来冠状病毒威胁提供有力武器。特别是基于 S2 蛋白高度保守性开发的广谱抑制剂和疫苗,有望成为预防和控制冠状病毒大流行的关键手段。

作者贡献声明

李溢璇:数据收集,撰写文章;谢莎:格式核对,文章审阅;何航:文章审阅;孙彦刚:提出概念,获取基金,文章审阅。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Cui J, Li F, Shi ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2019, 17(3): 181-192.
- [2] Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(3): 141-154.
- [3] Vlasova AN, Diaz A, Dantie D, Xiu LS, Toh TH, Lee JS, Saif LJ, Gray GC. Novel canine coronavirus isolated from a hospitalized patient with pneumonia in east Malaysia[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2022, 74(3): 446-454.
- [4] Lednicky JA, Tagliamonte MS, White SK, Elbadry MA, Alam MM, Stephenson CJ, Bonny TS, Loeb JC, Telisma T, Chavannes S, Ostrov DA, Mavian C, Beau De Rochars VM, Salemi M, Morris JG Jr. Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children[J]. *Nature*, 2021, 600(7887): 133-137.
- [5] Yao X, Lu WH, Qiao WT, Zhang YQ, Zhang BY, Li HX, Li JL. The highly pathogenic strain of porcine deltacoronavirus disrupts the intestinal barrier and causes diarrhea in newborn piglets[J]. *Virulence*, 2025, 16: 2446742.
- [6] Wang YN, Ma XY, Zhang H, Xue XH, Li JX, Jiang YP, Cui W, Liu DD, Zhou B, Wang L. Molecular characterization and pathogenicity of a novel Chinese porcine deltacoronavirus strain CH/HLJ/20 isolated from diarrhetic piglets[J]. *Virulence*, 2026, 17: 2605366.
- [7] Wang ZB, Yang K, Bi MF, Li KJ, Wang W, Song Y, Pan XM, Li TZ, Mo XB. Molecular characteristics and potential antigenic epitope analysis of porcine epidemic diarrhea virus in China from 2022 to 2025[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2025, 12: 1667063.
- [8] Zhou L, Sun Y, Lan T, Wu RT, Chen JW, Wu ZX, Xie QM, Zhang XB, Ma JY. Retrospective detection and phylogenetic analysis of swine acute diarrhoea syndrome coronavirus in pigs in Southern China[J]. *Transboundary and Emerging Diseases*, 2019, 66(2): 687-695.
- [9] Le NP, Le BT, Le VP, Park JE. Molecular characterization of swine acute diarrhea syndrome coronavirus detected in Vietnamese pigs[J]. *Veterinary Research*, 2025, 56: 4.
- [10] Zhang L, Chen NZ, Eichmann A, Nehlmeier I,

- Moldenhauer AS, Stankov MV, Happel C, Dopfer-Jablonka A, Behrens GMN, Hoffmann M, Pöhlmann S. Epidemiological and virological update on the emerging SARS-CoV-2 variant BA. 3.2[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2026, 26(1): e1-e2.
- [11] Grein J, Ohmagari N, Shin D, Diaz G, Asperges E, Castagna A, Feldt T, Green G, Green ML, Lescure FX, Nicastri E, Oda R, Yo K, Quiros-Roldan E, Studemeister A, Redinski J, Ahmed S, Bennett J, Chelliah D, Chen D, et al. Compassionate use of remdesivir for patients with severe COVID-19[J]. *New England Journal of Medicine*, 2020, 382(24): 2327-2336.
- [12] Xiang LJ, Wang Q, Xu YW, Tong Y, Wu YH, Zhang XS, Zeng XX, Ye S, Zhang CM, Tan LH, Zhu LC, Miao J, Chen S, Zhang X, Yu XB, Huang LS. Paxlovid for the treatment of severe or critical COVID-19 in children[J]. *BMC Pediatrics*, 2025, 25: 493.
- [13] Belouzard S, Millet JK, Licitra BN, Whittaker GR. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein[J]. *Viruses*, 2012, 4(6): 1011-1033.
- [14] Rottier PJM. The coronavirus membrane glycoprotein[M]// Siddell SG. *The Coronaviridae*. Boston, MA: Springer US, 1995: 115-139.
- [15] Tai LH, Zhu GL, Yang MN, Cao L, Xing XR, Yin GL, Chan C, Qin CF, Rao ZH, Wang XX, Sun F, Zhu Y. Nanometer-resolution *in situ* structure of the SARS-CoV-2 postfusion spike protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(48): e2112703118.
- [16] Fan XY, Cao DF, Kong LF, Zhang XZ. Cryo-EM analysis of the post-fusion structure of the SARS-CoV spike glycoprotein[J]. *Nature Communications*, 2020, 11: 3618.
- [17] Cai YF, Zhang J, Xiao TS, Peng HQ, Sterling SM, Walsh RM Jr, Rawson S, Rits-Volloch S, Chen B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein[J]. *Science*, 2020, 369(6511): 1586-1592.
- [18] Xia S, Yan L, Xu W, Agrawal AS, Algaissi A, Tseng CK, Wang Q, Du LY, Tan WJ, Wilson IA, Jiang SB, Yang B, Lu L. A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike[J]. *Science Advances*, 2019, 5(4): eaav4580.
- [19] Wu LL, Zheng AQ, Tang YM, Chai Y, Chen JT, Cheng L, Hu Y, Qu J, Lei WW, Liu WJ, Wu GZ, Zeng SG, Yang H, Wang QH, Gao GF. A pan-coronavirus peptide inhibitor prevents SARS-CoV-2 infection in mice by intranasal delivery[J]. *Science China Life Sciences*, 2023, 66(10): 2201-2213.
- [20] Kubo H, Yamada YK, Taguchi F. Localization of neutralizing epitopes and the receptor-binding site within the amino-terminal 330 amino acids of the murine coronavirus spike protein[J]. *Journal of Virology*, 1994, 68(9): 5403-5410.
- [21] Wang S, Qiu ZY, Hou YN, Deng XY, Xu W, Zheng TT, Wu PH, Xie SF, Bian WX, Zhang C, Sun ZW, Liu KP, Shan C, Lin AF, Jiang SB, Xie YH, Zhou Q, Lu L, Huang J, Li X. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells[J]. *Cell Research*, 2021, 31(2): 126-140.
- [22] Zhu SY, Liu Y, Zhou Z, Zhang ZY, Xiao X, Liu ZH, Chen A, Dong XJ, Tian F, Chen SH, Xu YY, Wang CH, Li QH, Niu XR, Pan Q, Du S, Xiao JY, Wang JW, Wei WS. Genome-wide CRISPR activation screen identifies candidate receptors for SARS-CoV-2 entry[J]. *Science China Life Sciences*, 2022, 65(4): 701-717.
- [23] Liu C, Tang J, Ma YM, Liang XY, Yang Y, Peng GQ, Qi QQ, Jiang SB, Li JR, Du LY, Li F. Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2015, 89(11): 6121-6125.
- [24] Peng GQ, Xu LQ, Lin YL, Chen L, Pasquarella JR, Holmes KV, Li F. Crystal structure of bovine coronavirus spike protein lectin domain[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(50): 41931-41938.
- [25] Balistreri G, Yamauchi Y, Teesalu T. A widespread viral entry mechanism: the C-end Rule motif - neuropilin receptor interaction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118(49): e2112457118.
- [26] Neerukonda SN, Vassell R, Lusvardi S, Liu SF, Akue A, Kukuruga M, Wang TT, Weiss CD, Wang W. Characterization of spike S1/S2 processing and entry pathways of lentiviral pseudoviruses bearing seasonal human coronaviruses NL63, 229E, and HKU1 spikes[J]. *Microbiology Spectrum*, 2025, 13(3): e02808-24.
- [27] Strobelt R, Adler J, Shaul Y. The transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) non-protease domains regulating severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike-mediated virus entry[J]. *Viruses*, 2023, 15(10): 2124.
- [28] Chen XN, Liang YF, Weng ZJ, Quan WP, Hu C, Peng YZ, Sun YS, Gao Q, Huang Z, Zhang GH, Gong L. Porcine enteric alphacoronavirus entry through multiple pathways (caveolae, clathrin, and macropinocytosis) requires rab GTPases for endosomal transport[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(4): e00210-23.
- [29] Li SQ, Xiao D, Zhang LW, Chen R, Song DL, Wen YP, Wu R, Zhao Q, Du SY, Yan QG, Cao SJ, Huang XB. Porcine deltacoronavirus enters ST cells by clathrin-mediated endocytosis and does not require Rab5, Rab7, or Rab11[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e02553-23.
- [30] Li YY, Wang J, Hou W, Shan YK, Wang SY, Liu F. Dynamic dissection of the endocytosis of porcine epidemic diarrhea coronavirus cooperatively mediated by clathrin and caveolae as visualized by single-virus tracking[J]. *mBio*, 2021, 12(2): e00256-21.
- [31] Wei XN, She GL, Wu TT, Xue CY, Cao YC. PEDV enters cells through clathrin-, caveolae-, and lipid raft-mediated endocytosis and traffics *via* the endo-/lysosome pathway[J]. *Veterinary Research*, 2020, 51: 10.
- [32] Kirchhausen T. Adaptors for clathrin-mediated traffic[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1999, 15: 705-732.

- [33] Bayati A, Kumar R, Francis V, McPherson PS. SARS-CoV-2 infects cells after viral entry *via* clathrin-mediated endocytosis[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100306.
- [34] Andreu S, Ripa I, López-Guerrero JA, Bello-Morales R. Human coronavirus 229E uses clathrin-mediated endocytosis as a route of entry in Huh-7 cells[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(10): 1232.
- [35] Chen C, Zhao L, Su NN, Peng XY, Song BL, Zhang L, Guo KK. Bovine coronavirus enters HRT-18 cells *via* membrane fusion and clathrin-mediated endocytosis in a low pH-, dynamin-, cholesterol-, microtubule-, Rab7-, and Rab11-dependent manner[J]. *Journal of Virology*, 2025, 99(12): e01274-e01225.
- [36] Wang H, Yuan X, Sun YJ, Mao X, Meng CC, Tan L, Song CP, Qiu XS, Ding C, Liao Y. Infectious bronchitis virus entry mainly depends on clathrin mediated endocytosis and requires classical endosomal/lysosomal system[J]. *Virology*, 2019, 528: 118-136.
- [37] Li HB, Guo HY, Rong BH, Li HW, Wu WJ, Yang C, Liu SW. SNX10 enhances HCoV-OC43 infection by facilitating viral entry and inhibiting virus-triggered autophagy[J]. *Virologica Sinica*, 2025, 40(5): 755-768.
- [38] Nomura R, Kiyota A, Suzuki E, Kataoka K, Ohe Y, Miyamoto K, Senda TK, Fujimoto T. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae[J]. *Journal of Virology*, 2004, 78(16): 8701-8708.
- [39] Song CL, Li H, Han Y, Wang KL, Yan WJ, Yang X, Zhang AY, Wang HN. Host restriction factor Rab11a limits porcine deltacoronavirus invasion of cells *via* fusion peptide-mediated membrane fusion[J]. *Veterinary Microbiology*, 2024, 298: 110246.
- [40] Bakillah A, Al Hejji F, Almasaud A, Al Jami H, Hawwari A, Al Qarni A, Iqbal J, Alharbi NK. Lipid raft integrity and cellular cholesterol homeostasis are critical for SARS-CoV-2 entry into cells[J]. *Nutrients*, 2022, 14(16): 3417.
- [41] Fang PX, Zhang JS, Zhang HC, Xia SJ, Ren J, Tian LY, Bai DC, Fang LR, Xiao SB. Porcine deltacoronavirus enters porcine IPI-2I intestinal epithelial cells *via* macropinocytosis and clathrin-mediated endocytosis dependent on pH and dynamin[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(24): e01345-21.
- [42] Chen H, Zhao P, Zhang CS, Ming X, Zhang CF, Jung YS, Qian YJ. Veratramine inhibits porcine epidemic diarrhea virus entry through macropinocytosis by suppressing PI3K/Akt pathway[J]. *Virus Research*, 2024, 339: 199260.
- [43] Gruenberg J. The endocytic pathway: a mosaic of domains[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001, 2(10): 721-730.
- [44] Burkard C, Verheije MH, Wicht O, van Kasteren SI, van Kuppeveld FJ, Haagmans BL, Pelkmans L, Rottier PJM, Bosch BJ, de Haan CAM. Coronavirus cell entry occurs through the endo-/lysosomal pathway in a proteolysis-dependent manner[J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(11): e1004502.
- [45] Li XW, Zhu WH, Fan MY, Zhang J, Peng YZ, Huang FM, Wang N, He LC, Zhang L, Holmdahl R, Meng LS, Lu SM. Dependence of SARS-CoV-2 infection on cholesterol-rich lipid raft and endosomal acidification[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2021, 19: 1933-1943.
- [46] Tang T, Bidon M, Jaimes JA, Whittaker GR, Daniel S. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development[J]. *Antiviral Research*, 2020, 178: 104792.
- [47] Zhu YK, Feng F, Hu GW, Wang YY, Yu Y, Zhu YF, Xu W, Cai X, Sun ZP, Han WD, Ye R, Qu D, Ding Q, Huang XX, Chen HJ, Xu W, Xie YH, Cai QL, Yuan ZH, Zhang R. A genome-wide CRISPR screen identifies host factors that regulate SARS-CoV-2 entry[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 961.
- [48] Mustafa Z, Kalbacher H, Burster T. Occurrence of a novel cleavage site for cathepsin G adjacent to the polybasic sequence within the proteolytically sensitive activation loop of the SARS-CoV-2 Omicron variant: the amino acid substitution N679K and P681H of the spike protein[J]. *PLoS One*, 2022, 17(4): e0264723.
- [49] Park JE, Cruz DJM, Shin HJ. Clathrin- and serine proteases-dependent uptake of porcine epidemic diarrhea virus into Vero cells[J]. *Virus Research*, 2014, 191: 21-29.
- [50] Tan YB, Sun LM, Wang G, Shi YJ, Dong WY, Fu YN, Fu Z, Chen HC, Peng GQ. Trypsin-enhanced infection with porcine epidemic diarrhea virus is determined by the S2 subunit of the spike glycoprotein[J]. *Journal of Virology*, 2021, 95(11): e02453-20.
- [51] Wang XN, Qiao XY, Sui L, Zhao HY, Li FS, Tang YD, Shi W, Guo YY, Jiang YP, Wang L, Zhou H, Tang LJ, Xu YG, Li YJ. Establishment of stable Vero cell lines expressing TMPRSS2 and MSPL: a useful tool for propagating porcine epidemic diarrhea virus in the absence of exogenous trypsin[J]. *Virulence*, 2020, 11(1): 669-685.
- [52] Li SQ, Xiao D, Zhao YJ, Zhang LW, Chen R, Liu WZ, Wen YM, Liao YJ, Wen YP, Wu R, Han XF, Zhao Q, Du SY, Yan QG, Wen XT, Cao SJ, Huang XB. Porcine deltacoronavirus (PDCoV) entry into PK-15 cells *via* caveolae-mediated endocytosis[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 496.
- [53] Liang QZ, Ji CM, Wang B, Chen W, Cong F, Huang Y, Huang YW. Deltacoronavirus HKU11, HKU13, PDCoV (HKU15) and HKU17 spike pseudoviruses enter avian DF-1 cells *via* clathrin-mediated endocytosis in a Rab5-, Rab7- and pH-dependent manner[J]. *Veterinary Research*, 2025, 56: 15.
- [54] Xiao WW, Xiong YX, Wang YC, Li T, Chen CQ, Shi YT, Su GN, Zhou YR, Xiao SB, Fang LR. Cathepsin L and transmembrane serine protease 11E mediate trypsin-independent entry of porcine deltacoronavirus into Huh7 cells[J]. *Journal of Virology*, 2025, 99(9): e01055-25.
- [55] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins[J]. *Annual Review of Virology*, 2016, 3:

- 237-261.
- [56] Outlaw VK, Bovier FT, Mears MC, Cajimat MN, Zhu Y, Lin MJ, Addetia A, Lieberman NAP, Peddu V, Xie XP, Shi PY, Greninger AL, Gellman SH, Bente DA, Moscona A, Porotto M. Inhibition of coronavirus entry *in vitro* and *ex vivo* by a lipid-conjugated peptide derived from the SARS-CoV-2 spike glycoprotein HRC domain[J]. *mBio*, 2020, 11(5): e01935-20.
- [57] Grunst MW, Qin Z, Dodero-Rojas E, Ding SL, Prévost J, Chen YZ, Hu YP, Pazgier M, Wu SP, Xie XP, Finzi A, Onuchic JN, Whitford PC, Mothes W, Li WW. Structure and inhibition of SARS-CoV-2 spike refolding in membranes[J]. *Science*, 2024, 385(6710): 757-765.
- [58] Akil C, Xu JL, Shen J, Zhang PJ. Unveiling the structural spectrum of SARS-CoV-2 fusion by *in situ* cryo-ET[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 5150.
- [59] Yang ZW, Han Y, Ding SL, Shi W, Zhou TQ, Finzi A, Kwong PD, Mothes W, Lu ML. SARS-CoV-2 variants increase kinetic stability of open spike conformations as an evolutionary strategy[J]. *mBio*, 2022, 13: e03227-21.
- [60] Xing LX, Liu ZM, Wang XL, Liu QY, Xu W, Mao QY, Zhang X, Hao AH, Xia S, Liu ZZ, Sun LJ, Zhang GX, Wang Q, Chen ZG, Jiang SB, Sun L, Lu L. Early fusion intermediate of ACE2-using coronavirus spike acting as an antiviral target[J]. *Cell*, 2025, 188(5): 1297-1314.e24.
- [61] V'kovski P, Kratzel A, Steiner S, Stalder H, Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(3): 155-170.
- [62] Shi W, Cai YF, Zhu HS, Peng HQ, Voyer J, Rits-Volloch S, Cao H, Mayer ML, Song KK, Xu C, Lu JM, Zhang J, Chen B. Cryo-EM structure of SARS-CoV-2 postfusion spike in membrane[J]. *Nature*, 2023, 619(7969): 403-409.
- [63] Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, Schiergens TS, Herrler G, Wu NH, Nitsche A, Müller MA, Drosten C, Pöhlmann S. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor[J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.e8.
- [64] Zhao MM, Yang WL, Yang FY, Zhang L, Huang WJ, Hou W, Fan CF, Jin RH, Feng YM, Wang YC, Yang JK. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 134.
- [65] Dacon C, Tucker C, Peng LH, Lee CD, Lin TH, Yuan M, Cong Y, Wang LS, Purser L, Williams JK, Pyo CW, Kosik I, Hu Z, Zhao M, Mohan D, Cooper AJR, Peterson M, Skinner J, Dixit S, Kollins E, et al. Broadly neutralizing antibodies target the coronavirus fusion peptide[J]. *Science*, 2022, 377(6607): 728-735.
- [66] Wang FL, Yang G, Yan L. Crystal structures of fusion cores from CCoV-HuPn-2018 and SADS-CoV[J]. *Viruses*, 2024, 16(2): 272.
- [67] Xia S, Liu MQ, Wang C, Xu W, Lan QS, Feng SL, Qi FF, Bao LL, Du LY, Liu SW, Qin C, Sun F, Shi ZL, Zhu Y, Jiang SB, Lu L. 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[J]. *Cell Research*, 2020, 30(4): 343-355.
- [68] Jaimes JA, André NM, Chappie JS, Millet JK, Whittaker GR. Phylogenetic analysis and structural modeling of SARS-CoV-2 spike protein reveals an evolutionary distinct and proteolytically sensitive activation loop[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(10): 3309-3325.
- [69] Trigueiro-Louro J, Correia V, Figueiredo-Nunes I, Gíria M, Rebelo-de-Andrade H. Unlocking COVID therapeutic targets: a structure-based rationale against SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV spike[J]. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 2020, 18: 2117-2131.
- [70] Wang CY, van Haperen R, Gutiérrez-Álvarez J, Li WT, Okba NMA, Albulescu I, Widjaja I, van Dieren B, Fernandez-Delgado R, Sola I, Hurdiss DL, Daramola O, Grosveld F, van Kuppeveld FJM, Haagmans BL, Enjuanes L, Drabek D, Bosch BJ. A conserved immunogenic and vulnerable site on the coronavirus spike protein delineated by cross-reactive monoclonal antibodies[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 1715.
- [71] Ou XY, Zheng WL, Shan YW, Mu ZX, Dominguez SR, Holmes KV, Qian ZH. Identification of the fusion peptide-containing region in betacoronavirus spike glycoproteins[J]. *Journal of Virology*, 2016, 90(12): 5586-5600.
- [72] Stincarelli MA, Quagliata M, Di Santo A, Pacini L, Fernandez FR, Arvia R, Rinaldi S, Papini AM, Rovero P, Giannecchini S. SARS-CoV-2 inhibitory activity of a short peptide derived from internal fusion peptide of S2 subunit of spike glycoprotein[J]. *Virus Research*, 2023, 334: 199170.
- [73] Liu SW, Xiao GF, Chen YB, He YX, Niu JK, Escalante CR, Xiong HB, Farmer J, Debnath AK, Po TE, Jiang SB. Interaction between heptad repeat 1 and 2 regions in spike protein of SARS-associated coronavirus: implications for virus fusogenic mechanism and identification of fusion inhibitors[J]. *The Lancet*, 2004, 363(9413): 938-947.
- [74] Bosch BJ, Martina BEE, van der Zee R, Lepault J, Haijema BJ, Versluis C, Heck AJR, de Groot R, Osterhaus ADME, Rottier PJM. Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(22): 8455-8460.
- [75] Lu L, Liu Q, Zhu Y, Chan KH, Qin LL, Li Y, Wang Q, Chan JF, Du LY, Yu F, Ma CQ, Ye S, Yuen KY, Zhang RG, Jiang SB. Structure-based discovery of Middle East respiratory syndrome coronavirus fusion inhibitor[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3067.
- [76] Gao J, Lu GW, Qi JX, Li Y, Wu Y, Deng Y, Geng HY, Li HB, Wang QH, Xiao HX, Tan WJ, Yan JH, Gao GF. Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a

- heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. *Journal of Virology*, 2013, 87(24): 13134-13140.
- [77] Zhao PW, Wang B, Ji CM, Cong XY, Wang M, Huang YW. Identification of a peptide derived from the heptad repeat 2 region of the porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) spike glycoprotein that is capable of suppressing PEDV entry and inducing neutralizing antibodies[J]. *Antiviral Research*, 2018, 150: 1-8.
- [78] Xia S, Xu W, Wang Q, Wang C, Hua C, Li WH, Lu L, Jiang SB. Peptide-based membrane fusion inhibitors targeting HCoV-229E spike protein HR1 and HR2 domains[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 487.
- [79] Sun H, Li Y, Liu PP, Qiao CP, Wang XM, Wu LN, Liu KF, Hu Y, Su C, Tan SG, Zou SM, Wu GZ, Yan JH, Gao GF, Qi JX, Wang QH. Structural basis of HCoV-19 fusion core and an effective inhibition peptide against virus entry[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2020, 9(1): 1238-1241.
- [80] Zhu YM, Yu DW, Yan HX, Chong HH, He YX. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2, an emerging coronavirus with high fusogenic activity[J]. *Journal of Virology*, 2020, 94(14): e00635-20.
- [81] Ujike M, Nishikawa H, Otake A, Yamamoto N, Yamamoto N, Matsuoka M, Kodama E, Fujii N, Taguchi F. Heptad repeat-derived peptides block protease-mediated direct entry from the cell surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus but not entry *via* the endosomal pathway[J]. *Journal of Virology*, 2008, 82(1): 588-592.
- [82] Yang KL, Wang CC, Kreutzberger AJB, Ojha R, Kuivanen S, Couoh-Cardel S, Muratcioglu S, Eisen TJ, White KI, Held RG, Subramanian S, Marcus K, Pfuetzner RA, Esquivies L, Doyle CA, Kuriyan J, Vapalahti O, Balistreri G, Kirchhausen T, Brunger AT. Nanomolar inhibition of SARS-CoV-2 infection by an unmodified peptide targeting the prehairpin intermediate of the spike protein[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2022, 119(40): e2210990119.
- [83] Kandeel M, Yamamoto M, Park BK, Al-Taher A, Watanabe A, Gohda J, Kawaguchi Y, Oh-hashii K, Kwon HJ, Inoue JI. Discovery of new potent anti-MERS CoV fusion inhibitors[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 12: 685161.
- [84] Zhan YC, Li MX, Gong R. Protein mimics of fusion core from SARS-CoV-1 can inhibit SARS-CoV-2 entry[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2024, 736: 150857.
- [85] 曲玉辰, 陆路, 姜世勃. 利用 I-Mutant2.0 辅助设计与优化中东呼吸综合征冠状病毒融合抑制多肽[J]. *微生物与感染*, 2019, 14(2): 72-81.
- Qu YC, Lu L, Jiang SB. Using I-Mutant2.0 to assist the design and optimization of MERS-CoV fusion inhibitory peptides[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2019, 14(2): 72-81 (in Chinese).
- [86] Wang C, Xia S, Zhang PY, Zhang TH, Wang WC, Tian YL, Meng GP, Jiang SB, Liu KL. Discovery of hydrocarbon-stapled short α -helical peptides as promising Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) fusion inhibitors[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2018, 61(5): 2018-2026.
- [87] Zheng MJ, Cong W, Peng HR, Qing J, Shen HX, Tang YX, Geng CC, Chen S, Zou Y, Zhang WD, Hu HG, Li X. Stapled peptides targeting SARS-CoV-2 spike protein HR1 inhibit the fusion of virus to its cell receptor[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2021, 64(23): 17486-17495.
- [88] Wang C, Tu JH, Xu BB, Xue GP, Du XM, Yuan M, Du S, Wang H, Zhuang XM, Shi WG, Lu L, Xiao JH, Wang Q, Jiang SB. Potent inhibition of human betacoronaviruses by a short double-stapled peptide mimicking the HR2 core region in viral spike protein[J]. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2025, 68(17): 18625-18640.
- [89] Zhu YM, Yu DW, Hu Y, Wu T, Chong HH, He YX. SARS-CoV-2-derived fusion inhibitor lipopeptides exhibit highly potent and broad-spectrum activity against divergent human coronaviruses[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2021, 6: 294.
- [90] Zhu YM, Dong XJ, Liu N, Wu T, Chong HH, Lei XB, Ren LL, Wang JW, He YX. SARS-CoV-2 fusion-inhibitory lipopeptides maintain high potency against divergent variants of concern including Omicron[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1819-1827.
- [91] Lan QS, Chan JF, Xu W, Wang LJ, Jiao FK, Zhang GX, Pu J, Zhou J, Xia S, Lu L, Yuen KY, Jiang SB, Wang Q. A palmitic acid-conjugated, peptide-based pan-CoV fusion inhibitor potently inhibits infection of SARS-CoV-2 Omicron and other variants of concern[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 549.
- [92] De Vries RD, Schmitz KS, Bovier FT, Predella C, Khao J, Noack D, Haagmans BL, Herfst S, Stearns KN, Drew-Bear J, Biswas S, Rockx B, McGill G, Dorrello NV, Gellman SH, Alabi CA, de Swart RL, Moscona A, Porotto M. Intranasal fusion inhibitory lipopeptide prevents direct-contact SARS-CoV-2 transmission in ferrets[J]. *Science*, 2021, 371(6536): 1379-1382.
- [93] Wang LJ, Jiao FK, Jiang HX, Yang YT, Huang ZQ, Wang Q, Xu W, Zhu Y, Xia S, Jiang SB, Lu L. Fusogenicity of SARS-CoV-2 BA.2.86 subvariant and its sensitivity to the prokaryotic recombinant EK1 peptide[J]. *Cell Discovery*, 2024, 10: 6.
- [94] Wu LL, Zheng AQ, Tang YM, Wang XY, Gao Y, Lei WW, Wu GZ, Wang QH, Gao GF. Efficient inhibition of SARS-CoV-2 emerging EG.5, EG.5.1 and BA.2.86 variants by fusion inhibitor HY3000 peptide[J]. *hLife*, 2024, 2(1): 43-46.
- [95] Wang YM, Shang LH, Wu L, Wang X, Ding BH, Hu K, He YL, Li GM, Zhai J, Hu JY, Tian YP, Wang J, Yan L, Liu B, Song GS, He YX, Wang C, Cao B. The efficacy and safety of inhaled peptide YKYY017 for COVID-19

- patients with mild illness: a phase 2 randomized controlled trial[J]. *Nature Communications*, 2025, 16: 7272.
- [96] Zhu YM, Gao ZC, Feng XL, Hu Y, Liu N, Liu C, Yang QJ, Zou QC, Li MH, Song GS, He YX. Comprehensive preclinical characterization of IPB29, a pan-coronavirus fusion inhibitor under clinical trials[J]. *Antiviral Research*, 2025, 237: 106154.
- [97] Xue SY, Xu W, Wang L, Wang XL, Duan QY, Calcul L, Wang SH, Liu WQ, Sun XM, Lu L, Jiang SB, Cai JF. An HR2-mimicking sulfonyl- γ -AApeptide is a potent pan-coronavirus fusion inhibitor with strong blood-brain barrier permeability, long half-life, and promising oral bioavailability[J]. *ACS Central Science*, 2023, 9(5): 1046-1058.
- [98] Cai YX, Xu W, Tang JY, Cao NJ, Lan QS, Lu L, Jiang SB. A bivalent protein targeting glycans and HR1 domain in spike protein potently inhibited infection of SARS-CoV-2 and other human coronaviruses[J]. *Cell & Bioscience*, 2021, 11: 128.
- [99] Duan QY, Xia S, Jiao FK, Wang Q, Wang R, Lu L, Jiang SB, Xu W. A modified fibronectin type III domain-conjugated, long-acting pan-coronavirus fusion inhibitor with extended half-life[J]. *Viruses*, 2022, 14(4): 655.
- [100] Bi WW, Zhu T, Xu YW, Chen YH, Li JM. An engineered chimeric ACE2-HR2 peptide exhibits potent and broad-spectrum activity against SARS-CoV-2 variants[J]. *Antiviral Research*, 2025, 242: 106265.
- [101] Bi WW, Tang KM, Chen GL, Xie YB, Polizzi NF, DeGrado WF, Yuan SF, Dang BB. An enhanced broad-spectrum peptide inhibits Omicron variants *in vivo*[J]. *Cell Reports Medicine*, 2024, 5(2): 101418.
- [102] Jin HL, Cheng L, Gong YN, Zhu YM, Chong HH, Zhang Z, He YX. Design of a bifunctional pan-sarbecovirus entry inhibitor targeting the cell receptor and viral fusion protein[J]. *Journal of Virology*, 2023, 97(8): e00192-23.
- [103] Huang XY, Li M, Xu YR, Zhang JK, Meng X, An XY, Sun L, Guo LL, Shan X, Ge JL, Chen J, Luo YD, Wu HM, Zhang Y, Jiang Q, Ning XH. Novel gold nanorod-based HR1 peptide inhibitor for Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2019, 11(22): 19799-19807.
- [104] Sun YP, Zhang HD, Shi J, Zhang Z, Gong R. Identification of a novel inhibitor against Middle East respiratory syndrome coronavirus[J]. *Viruses*, 2017, 9(9): 255.
- [105] Xing LX, Xu XF, Xu W, Liu ZZ, Shen X, Zhou J, Xu L, Pu J, Yang C, Huang Y, Lu L, Jiang SB, Liu SW. A five-helix-based SARS-CoV-2 fusion inhibitor targeting heptad repeat 2 domain against SARS-CoV-2 and its variants of concern[J]. *Viruses*, 2022, 14(3): 597.
- [106] Lin X, Guo LY, Lin S, Chen ZM, Yang FL, Yang J, Wang LL, Wen A, Duan YP, Zhang XD, Dai YS, Yin KQ, Yuan X, Yu CZ, He B, Cao Y, Dong HH, Li J, Zhao Q, Lu GW. An engineered 5-helix bundle derived from SARS-CoV-2 S2 pre-binds sarbecoviral spike at both serological- and endosomal-pH to inhibit virus entry[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 1920-1935.
- [107] Safiriyu AA, Hussain A, Dewangan N, Kasle G, Shindler K, Pal D, Das Sarma J. The fusion peptide of the spike protein S2 domain may be a mimetic analog of β -coronaviruses and serve as a novel virus-host membrane fusion inhibitor[J]. *Antiviral Research*, 2025, 237: 106144.
- [108] Sun YG, Li R, Jiang LG, Qiao SL, Zhi YB, Chen XX, Xie S, Wu JW, Li XW, Deng RG, Zhang GP. Characterization of the interaction between recombinant porcine aminopeptidase N and spike glycoprotein of porcine epidemic diarrhea virus[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 117: 704-712.
- [109] Sun YG, Li R, Xie S, Qiao SL, Li QM, Chen XX, Deng RG, Zhang GP. Identification of a novel linear B-cell epitope within the collagenase equivalent domain of porcine epidemic diarrhea virus spike glycoprotein[J]. *Virus Research*, 2019, 266: 34-42.
- [110] Westendorf K, Žentelis S, Wang LS, Foster D, Vaillancourt P, Wiggin M, Lovett E, van der Lee R, Hendle J, Pustilnik A, Sauder JM, Kraft L, Hwang Y, Siegel RW, Chen J, Heinz BA, Higgs RE, Kallewaard NL, Jepson K, Goya R, et al. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants[J]. *Cell Reports*, 2022, 39 (7): 110812.
- [111] 邓西龙, 徐兴祥, 袁静, 张政, 杨欣平, 黎毅敏, 张峤, 李春明, 刘洋, 曹轲, 张福杰, 钟南山. 全人源单克隆抗体安巴韦单抗-罗米司韦单抗对 COVID-19 患者的安全性与疗效: 一项 II 期临床试验[J]. *国际呼吸杂志*, 2023, 43(7): 766-774.
- Deng XL, Xu XX, Yuan J, Zhang Z, Yang XP, Li YM, Zhang Y, Li CM, Liu Y, Cao K, Zhang FJ, Zhong NS. Safety and efficacy of the fully humanized monoclonal antibodies amubarvimab-romlusevimab in COVID-19 patients: a phase II clinical trial[J]. *International Journal of Respiration*, 2023, 43(7): 766-774 (in Chinese).
- [112] Xu L, Wang C, Xu W, Xing LX, Zhou J, Pu J, Fu MM, Lu L, Jiang SB, Wang Q. A dePEGylated lipopeptide-based pan-coronavirus fusion inhibitor exhibits potent and broad-spectrum anti-HIV-1 activity without eliciting anti-PEG antibodies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(11): 9779.
- [113] Pinto D, Sauer MM, Czudnochowski N, Low JS, Tortorici MA, Housley MP, Noack J, Walls AC, Bowen JE, Guarino B, Rosen LE, di Iulio J, Jerak J, Kaiser H, Islam S, Jaconi S, Sprugasci N, Culap K, Abdelnabi R, Foo C, et al. Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody[J]. *Science*, 2021, 373(6559): 1109-1116.
- [114] Sun XY, Yi CY, Zhu YF, Ding LF, Xia S, Chen XC, Liu M, Gu CJ, Lu X, Fu YD, Chen SF, Zhang TL, Zhang YG, Yang Z, Ma LY, Gu WP, Hu GW, Du SJ, Yan RH, Fu WH, et al. Neutralization mechanism of a human antibody with pan-coronavirus reactivity including SARS-CoV-2[J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7(7):

- 1063-1074.
- [115]Ko SH, Chen WY, Su SC, Lin HT, Ke FY, Liang KH, Hsu FF, Kumari M, Fu CY, Wu HC. Monoclonal antibodies against S2 subunit of spike protein exhibit broad reactivity toward SARS-CoV-2 variants[J]. *Journal of Biomedical Science*, 2022, 29: 108.
- [116]Wang XY, Xie YF, Liu HH, Lei WW, Xu K, Wu LL, Fan RW, Wu GZ, Gao GF, Wang QH. A broadly neutralizing nanobody targeting the highly conserved S2 subunit of sarbecoviruses[J]. *Science Bulletin*, 2023, 68(7): 684-687.
- [117]Johnson NV, Wall SC, Kramer KJ, Holt CM, Periasamy S, Richardson SI, Manamela NP, Suryadevara N, Andreano E, Paciello I, Pierleoni G, Piccini G, Huang Y, Ge P, Allen JD, Uno N, Shiakolas AR, Pilewski KA, Nargi RS, Sutton RE, et al. Discovery and characterization of a pan-betacoronavirus S2-binding antibody[J]. *Structure*, 2024, 32(11): 1893-1909.e11.
- [118]Pang W, Lu Y, Zhao YB, Shen F, Fan CF, Wang Q, He WQ, He XY, Li ZK, Chen TT, Yang CX, Li YZ, Xiao SX, Zhao ZJ, Huang XS, Luo RH, Yang LM, Zhang M, Dong XQ, Li MH, et al. A variant-proof SARS-CoV-2 vaccine targeting HR1 domain in S2 subunit of spike protein[J]. *Cell Research*, 2022, 32(12): 1068-1085.
- [119]Yang C, Pan XY, Xu XF, Cheng C, Huang Y, Li L, Jiang SB, Xu W, Xiao GF, Liu SW. Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 220.
- [120]万欣, 洪崇竣, 王进绅, 宋高鹏, 刘叔文. 马铃薯三糖甘草次酸衍生物通过抑制 SARS-CoV-2 进入靶细胞作为潜在的小分子新型冠状病毒融合抑制剂[J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(3): 474-483.
- Wan X, Hong CJ, Wang JS, Song GP, Liu SW. 3-*O*- β -chacotriosyl glycyrrhetic acid derivatives as potential small-molecule SARS-CoV-2 fusion inhibitors against SARS-CoV-2 entry into host cells[J]. *Journal of Southern Medical University*, 2024, 44(3): 474-483 (in Chinese).
- [121]Vaddadi K, Gandikota C, Huang CQ, Liang YR, Liu L. Cellular microRNAs target SARS-CoV-2 spike protein and restrict viral replication[J]. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2023, 325(2): C420-C428.
- [122]Nojomi M, Yassin Z, Keyvani H, Makiani MJ, Roham M, Laali A, Dehghan N, Navaei M, Ranjbar M. Effect of arbidol (Umifenovir) on COVID-19: a randomized controlled trial[J]. *BMC Infectious Diseases*, 2020, 20: 954.
- [123]Wang X, Cao RY, Zhang HY, Liu J, Xu MY, Hu HR, Li YF, Zhao L, Li W, Sun XL, Yang XL, Shi ZL, Deng F, Hu ZH, Zhong W, Wang ML. The anti-influenza virus drug, arbidol is an efficient inhibitor of SARS-CoV-2 *in vitro*[J]. *Cell Discovery*, 2020, 6: 28.
- [124]Shuster A, Pechalrieu D, Jackson CB, Abegg D, Choe H, Adibekian A. Clinical antiviral drug arbidol inhibits infection by SARS-CoV-2 and variants through direct binding to the spike protein[J]. *ACS Chemical Biology*, 2021, 16(12): 2845-2851.
- [125]Liang ZY, Wang JM, Zhang H, Gao LX, Xu J, Li PR, Yang J, Fu XT, Duan H, Liu JY, Liu TC, Ma WF, Wu K. Peptide S4 is an entry inhibitor of SARS-CoV-2 infection[J]. *Virology*, 2024, 597: 110149.