

## • 聚焦抗新冠病毒药物研究 •

## 基于靶点的抗新型冠状病毒病 COVID-19 药物发现

刘艾林\*, 杜冠华\*

(中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050)

**摘要:** 新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引发的新冠病毒病 (COVID-19), 采取对症治疗不失为可行有效的治疗方案, 但治疗药物大多缺乏针对性。基于病毒复制过程中的关键蛋白和病毒引发的病理机制, 研制有针对性的治疗药物, 将为临床提供更加有效的治疗方案。此外, 由于新型冠状病毒是 RNA 病毒, 而 RNA 病毒基因易于变异, 因此针对新冠病毒病的新药研发将是一项长期而艰巨的任务。本文基于新型冠状病毒从吸附、进入宿主细胞到病毒复制过程中的关键蛋白及病毒感染引发的致病因素等多个环节的潜在靶点, 利用分子模拟和机器学习等算法, 探讨防治 COVID-19 新药发现的研究思路, 并简述本课题组所开展的相关工作, 为促进不同作用机制的新药发现提供可行性研究方法和策略。

**关键词:** 新型冠状病毒; 新型冠状病毒病; 药物靶点; 药物发现; 分子模拟; 机器学习

中图分类号: R373.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)06-1073-08

## Drug discovery for COVID-19 treatment based on drug targets

LIU Ai-lin\*, DU Guan-hua\*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the novel coronavirus (SARS-CoV-2) is treated in accordance with symptoms, which is feasible and effective. However, current therapeutic drugs are ineffective against this virus. The development of targeted therapeutic drugs that are based on key proteins in SARS-CoV-2 replication and pathogenesis will provide a more effective means for clinical treatment. In addition, because SARS-CoV-2 is an RNA virus, which typically mutate readily, new drug development against COVID-19 will be a long-term and arduous task. New approaches to drug discovery for COVID-19 treatment using molecular simulation and machine learning algorithms, and based on the key proteins in the process of SARS-CoV-2 adsorption, entry into the host cell and viral replication are discussed herein, and we briefly introduce related work in our laboratory that can provide strategies to promote the discovery of drugs with different mechanisms of action.

**Key words:** novel coronavirus; novel coronavirus disease; drug target; drug discovery; molecular simulation; machine learning

目前, 全球大流行的呼吸系统疾病, 其病原经分离鉴定为新型冠状病毒, 被世界卫生组织 (WHO) 命名为 SARS-CoV-2, 由该病毒引发的疾病被命名为

COVID-19<sup>[1,2]</sup>。基因测序结果表明, SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 一样, 同属于冠状病毒  $\beta$  属, 与 SARS-CoV 的基因序列同源性为 75%~80%<sup>[3]</sup>, 与蝙蝠 SARS 样冠状病毒 (bat-sl-coVZC45) 的同源性超过 85%<sup>[4]</sup>。由于 SARS-CoV-2 首次在人际之间传播, 每个人对此病毒都没有免疫力, 均属易感人群。一些国家由于没有采取有效措施, 使得疫情迅速蔓延, 近乎失控。

收稿日期: 2020-03-13; 修回日期: 2020-04-17.

基金项目: “十三五”重大新药创制专项 (2018ZX09711001-003-002, 2018ZX09711001-012); 国家自然科学基金资助项目 (81673480); 协和创新工程项目 (2016-I2M-3-007).

\*通讯作者 Tel: 86-10-83150885,

E-mail: liuailin@imm.ac.cn; dugh@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-0319

世界各国为抗击疫情制定了各种防控措施,其中抗新型冠状病毒病的新药发现,是防控措施的重要组成部分,新药发现将为临床防治新型冠状病毒病提供重要治疗方案。针对性地开展抗新型冠状病毒病的新药研发,首先需要了解病毒的结构组成、病毒吸附、进入宿主细胞及复制过程中的关键因素,以及病毒感染机体后的病理特征等信息的基础上,有针对性地开展新药发现研究,为深入研发有发展前景的药物奠定理论基础,提供信息依据。

### 1 抗新型冠状病毒的潜在药物靶点及其生物学特点

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 为单正链 RNA 病毒,大约 3 万个碱基。病毒表面有包膜,颗粒呈圆形、椭圆形或轻度多形性,直径 100~120 nm。冠状病毒膜表面包含刺突糖蛋白(S 蛋白)、小包膜糖蛋白(E 蛋白)、膜蛋白(M 蛋白)<sup>[5-7]</sup>,病毒颗粒内部还有核衣壳蛋白(N 蛋白),它们均为病毒的结构蛋白。其中,S 蛋白具有受体识别和膜融合的功能,决定病毒是否能入侵靶细胞,是开发疫苗的重要靶点<sup>[8]</sup>。

新型冠状病毒 SARS-CoV-2 同 SARS-CoV 和 MERS-CoV 一样,均可引发人呼吸道感染,SARS-CoV 主要感染纤毛支气管上皮细胞和 II 型肺泡细胞,MERS-CoV 主要感染未分化的支气管上皮细胞和 II 型肺泡细胞。两者感染细胞类型存在差异,与病毒受体不同有关。SARS-CoV 以血管紧张素转化酶 2(angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 作为受体,而 MERS-CoV 以二肽基肽酶(DPPIV)为受体。研究表明,SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 相同,均以 ACE2 为受体感染上皮细胞<sup>[9]</sup>。II 型肺泡细胞同时表达 ACE2 和跨膜丝氨酸蛋白酶(transmembrane protease serines, TMPRSS2),其中病毒 S 蛋白与 ACE2 受体识别与吸附有关,TMPRSS2 在膜融合中扮演重要角色<sup>[10]</sup>。因此,ACE2 和 TMPRSS2 均为潜在的抗病毒药物靶点。

病毒进入宿主细胞后,病毒的核酸在酸化的内体中释放,从而产生有效感染。病毒的正链 RNA 作为模板,直接附着于宿主细胞的核糖体上翻译早期蛋白,首先翻译出大分子多聚蛋白前体,在细胞或病毒编码的蛋白酶作用下,多聚蛋白被切割成功能蛋白(如 RNA 聚合酶)及早期结构蛋白。然后在 RNA 聚合酶的作用下,以病毒正链 RNA 为模板,合成互补的负链 RNA,然后以负链 RNA 为模板复制子代病毒 RNA;以亚基因组 mRNA 翻译病毒蛋白,如衣壳蛋白、膜蛋白、非结构蛋白等,最后进行装配。再经转运,分泌到细胞表面,通过胞吐作用释放子代病毒。

ORF1ab 是第一个被制造出来的病毒蛋白,它由 16 个蛋白(NSP1~NSP16)接合在一起。通过研究,大

部分蛋白的功能已得到初步认识,但少数蛋白如 NSP2 和 NSP15 的功能有待于认识。其中,NSP1 专门破坏宿主细胞,NSP3 具有去标签和切割蛋白功能,NSP4 是囊泡制造者,用于保存病毒的 RNA 新拷贝,NSP5 是蛋白质剪刀,剪断大部分的 NSP 蛋白,NSP6 是囊泡制造工厂,与 NSP3 和 NSP4 合作制造囊泡,NSP7 和 NSP8 辅助 NSP12 复制病毒,NSP10 和 NSP16 联手将病毒基因伪装起来以逃避宿主蛋白的捕获,NSP12 (RNA polymerase) 是病毒复制机,将遗传物质组装成病毒基因组,NSP13 (RNA helicase) 为解旋 RNA,NSP14 为病毒基因校对蛋白,NSP15 具有粉碎病毒残余 RNA 功能<sup>[11,12]</sup>。这些非结构蛋白均具有生物学功能,阻断其功能作用可以达到抑制病毒复制的目的,均为潜在的药物靶点,其中 RNA 聚合酶(RNA polymerase)为公认的抗病毒靶点,RNA 解螺旋酶(RNA helicase)为广谱抗病毒药物的理想靶点。

此外,病毒复制过程中,还有很多蛋白酶参与了病毒的复制,如 3C-like 蛋白酶(3-chymotrypsin-like protease, 3CLpro)负责切割病毒基因组翻译的蛋白前体,得到多个非结构蛋白,用于组装形成新病毒;而木瓜样蛋白酶(papain-like protease, PLpro)是一种多功能病毒蛋白酶,是 SARS 冠状病毒复制酶复合体形成的重要调节蛋白分子,是一种病毒编码的去泛素化酶,对细胞蛋白具有明显的去泛素化作用,且对抗原抗病毒天然免疫反应具有负调节作用,是冠状病毒的一种重要干扰素抑制剂;弗林蛋白酶(Furin protease)是真核生物细胞中一种重要的内切蛋白酶,有研究表明,SARS-CoV-2 可能存在 Furin 蛋白酶切割位点,SARS-CoV-2 在组装时,S 蛋白被 Furin 蛋白酶切割为 S1 (受体结合结构域)和 S2 (膜融合结构域),不同亚基被分泌出去,从而侵染其他细胞<sup>[13,14]</sup>。因此,3CLpro、PLpro 和 Furin 均为潜在药物靶点,可用于新药发现。

呼吸道是 SARS-CoV-2 感染的主要部位。当 COVID-19 感染呼吸道时,可引起轻度或高度急性呼吸综合征,随后释放促炎细胞因子,如 IL-1 $\beta$  和 IL-6 等。抑制促炎性 IL-1 家族成员和 IL-6 已被证明在许多炎症疾病,包括病毒感染中具有治疗作用<sup>[15]</sup>。遗体解剖报告提示,重症患者的气道被黏液严重堵塞,肺泡功能受损以及多器官衰竭等病理状态。实验室检查结果提示,在发病早期,外周血白细胞总数正常或减少,淋巴细胞计数减少,严重者 D-二聚体升高且外周血淋巴细胞进行性减少,提示免疫力逐渐下降。针对患者炎症损伤和免疫力下降以及黏液堵塞气道等病理特点的新药,将为临床对症治疗提供有益的方案。病毒感染过程及其涉及的潜在靶点如表 1 所示。

**Table 1** The process of virus infection and its related targets. ACE: Angiotensin converting enzyme 2; TMPRSS2: Transmembrane protease serines; COVID: Coronavirus disease; NSP: Non-structural protein; PLpro: Papain-like protease; 3CLpro: 3-Chymotrypsin-like protease

Process of virus infection	Potential target	Potential effect of drug
Virus adsorption	ACE2, S-ACE2	Interference the recognition for ACE2 receptor and suppress virus invasion, therefore they can be used for COVID prevention
Membrane fusion	TMPRSS2	Inhibit the fusion between membrane protein of virus and cell membrane, protect cells against SARS-CoV-2 induced COVID-19
Non-structural protein	NSP1, NSP3, NSP4, NSP5, NSP6, NSP7, NSP8, NSP10, NSP12 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp), NSP13 (RNA helicase), NSP15, NSP16	Inhibit the activity of non-structural functional proteins and interference the procedure of virus replication. Used for COVID-19 to inhibit virus replication
Virus replication	PLpro, 3CLpro, Furin	Inhibit the activity of different enzymes in virus replication process
Pathogenic factors	IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$	Anti-inflammation, immunity regulation

虽然目前临床上已有一些药物用于新冠肺炎的治疗,但它们对于新型冠状病毒病的治疗仍缺乏针对性,且是否有效尚无定论。因此,有针对性地研发抗新型冠状病毒以及抗新型冠状病毒病的药物仍然迫在眉睫。本文将基于新型冠状病毒从吸附、进入宿主细胞到病毒复制过程的关键蛋白以及病毒感染引发的致病因素,利用分子模拟、机器学习等算法,探讨新药发现的研究策略,并简述本实验室所开展的相关工作,为研究发现具有不同作用机制的新药提供可行性方案。

## 2 靶向ACE2的药物发现

研究发现,与 SARS-CoV 相似, SARS-CoV-2 也是通过 ACE2 进入宿主细胞的,尤其是 II 型肺泡上皮细胞。病毒的刺突蛋白 S 与 ACE2 接触后,ACE2 的完整分子结构或跨膜区域与病毒一起,通过胞吞作用进入细胞(内化)。在丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 的作用下,病毒上的刺突蛋白进一步被激活,发生膜融合,病毒 RNA 释放入细胞质,完成病毒对细胞的感染<sup>[1,16-19]</sup>,因此,ACE2 是预防冠状病毒感染的重要靶点,也是预防新型冠状病毒病进一步恶化的重要靶点。

在应急用药的情况下,通过基因序列比对,发现同源性较高的冠状病毒,从而借鉴已有病毒病的临床用药和用药方案。通过与 SARS-CoV 和 MERS-CoV 基因序列比对,发现 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的同源性比 MERS-CoV 的更高。通过 S 蛋白的结构建模,发现人类细胞上 ACE2 受体与 SARS-CoV-2 的 S 蛋白有更强的相互作用<sup>[20]</sup>,这一预测结果得到两个冷冻电镜技术应用成果的验证<sup>[21,22]</sup>。

据报道,黄芩苷、橙皮苷和甘草酸苷等天然化合物是 ACE2 潜在抑制剂,可用于预防 SARS-CoV 感染<sup>[23]</sup>。由于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 的基因序列同源性高,且 ACE2 是它们共同的受体,因此推测黄芩苷、橙皮苷和甘草酸苷等天然化合物对 SARS-CoV-2 的感染也有潜在的预防作用。根据相似性的结构具有相似性

活性的原则,本课题组利用分子相似性分析方法,从天然产物数据库中预测发现了 230 个与黄芩苷、橙皮苷和甘草酸苷结构相似度大于 0.75 的天然化合物。表 2 列出相似度较高的前 25 个天然化合物及其植物来源等信息,由于参考文献太多,这里不作赘述。这些天然化合物抑制 ACE2 的活性,还有待于后续实验评价。表中天然化合物的中药或植物来源信息,将为中药的临床用药提供有益的信息依据。

## 3 靶向病毒刺突糖蛋白 S 与 ACE2 受体蛋白相互作用的药物发现

S 蛋白,全称 spike glycoprotein (刺突糖蛋白),位于新冠病毒最外层,是一种三聚体 I 类融合蛋白。作为新型冠状病毒附着并感染人类的核心蛋白,S 蛋白是开发疫苗、治疗性抗体和药物的关键靶点。

目前,S 蛋白结构以及 S 蛋白与 ACE2 受体蛋白相互作用复合物结构已有报道<sup>[20-23]</sup>。Wrapp 等<sup>[20]</sup>利用冷冻电镜(Cryo-EM),成功解析了新型冠状病毒 S 蛋白结构。Yan 等<sup>[21]</sup>利用冷冻电镜测定了全长人 ACE2 与中性氨基酸转运体 BOAT1 的复合物结构,报道了在 BOAT1 存在下,SARS-CoV-2 的 RBD 结合全长人 ACE2 的冷冻电镜结构,分析了 RBD 与受体之间的相互作用。Lan 等<sup>[23]</sup>利用 X 射线衍射技术,解析了新型冠状病毒表面刺突糖蛋白受体结合区与人受体 ACE2 蛋白复合物的晶体结构,并准确定位出新型冠状病毒 RBD 和受体 ACE2 的相互作用位点,阐明了新型冠状病毒刺突糖蛋白介导细胞侵染的结构基础及分子机制,为疫苗设计、治疗性抗体药物开发以及小分子药物发现奠定了坚实的基础。研究发现,新型冠状病毒的 RBD 与 ACE2 胞外域结合的亲和力要比 SARS 冠状病毒高出 10~20 倍。新型冠状病毒与 ACE2 之间的高亲和力,推动其在人际之间快速传播,这也为新冠病毒的超强传染性提供了合理的解释。

基于 X 射线衍射技术得到的病毒 S 蛋白-人受体

**Table 2** Potential natural ACE2 inhibitors for preventing SARS-CoV-2 infection

English name	CAS	Source
Hesperidin	520-26-3	<i>Galium aparine</i> , <i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> , <i>Citrus chachiensis</i> , <i>Poncirus trifoliata</i> , <i>Capsella bursa-pastoris</i> , <i>Citrus tankan</i> , <i>Schizonepeta tenuifolia</i> [Syn. <i>Nepeta tenuifolia</i> ], <i>Citrus reticulata</i> , <i>Citrus medica</i> , <i>Citrus limonia</i> , <i>Microtoena prainiana</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Mentha longifolia</i> , <i>Galium mollugo</i> , <i>Citrus unshiu</i> , <i>Citrus aurantium</i>
Isosakuranetin-7-rutinoside		<i>Citrus sinensis</i>
Narirutin	14259-46-2	<i>Citrus sinensis</i> , <i>Citrus</i> sp.
Diosmin	520-27-4	<i>Galium aparine</i> , <i>Sophora viciifolia</i> , <i>Toddalia asiatica</i> [Syn. <i>Toddalia aculeata</i> ; <i>Paullinia asiatica</i> ], <i>Citrus medica</i> var. <i>sarcodactylis</i> , <i>Scabiosa caucasica</i> , <i>Capsella bursa-pastoris</i> , <i>Scrophularia nodosa</i> , <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Urtica cannabina</i> , <i>Zanthoxylum nitidum</i> , <i>Zanthoxylum avicennae</i>
Neohesperidin	13241-33-3	<i>Poncirus trifoliata</i> , <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus unshiu</i> , <i>Citrus aurantium</i>
Chrysoeriol 7-O-rutinoside		<i>Saussurea medusa</i>
Acaciin	480-36-4	<i>Chrysanthemum boreale</i> , <i>Robinia pseudoacacia</i> , <i>Trapa bispinosa</i> , <i>Agastache rugosus</i> , <i>Buddleja officinalis</i> , <i>Chrysanthemum indicum</i>
Ombuoside	20188-85-6	<i>Phytolacca dioica</i> , <i>Gynostemma pentaphyllum</i> , <i>Flyriella parryi</i>
Uralsaponin A	103000-77-7	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Glycyrrhiza kansuensis</i>
Licoricesaponin H2	135815-61-1	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i>
Glycyrrhizic acid	1405-86-3	<i>Glycyrrhiza aspera</i> , <i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza kansuensis</i> , <i>Abrus precatorius</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i>
Licoricesaponin G2	118441-84-2	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i>
Glyeysaponin	137476-70-1	<i>Glycyrrhiza kansuensis</i>
Araboglycyrrhizin	121687-83-0	<i>Glycyrrhiza inflata</i>
Uralsaponin B	105038-43-5	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> , <i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza kansuensis</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i>
Licoricesaponin J2	134250-13-8	<i>Glycyrrhiza uralensis</i>
Baicalin	21967-41-9	<i>Scutellaria scordifolia</i> , <i>Scutellaria hypericifolia</i> , <i>Plantago major</i> , <i>Salvia miltiorrhiza</i> , <i>Scutellaria amoena</i> , <i>Scutellaria rehderiana</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Oroxylum indicum</i> , <i>Scutellaria viscidula</i>
Baicalein-7-O-beta-D-glucopyranoside	57396-78-8	<i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Oroxylum indicum</i>
Chrysin 7-O-beta-galactopyranuronoside		<i>Centaurea pseudoscabiosa</i> ssp. <i>pseudoscabiosa</i>
Baicalein-6-glucuronide	35990-03-5	<i>Oroxylum indicum</i>
5,6,4'-Trihydroxyflavone-7-O-beta-D-galactonic acid		<i>Erigeron breviscapus</i>
Breviscapine	116122-36-2	<i>Erigeron breviscapus</i>
Scutellarin	27740-01-8	<i>Scutellaria barbata</i> [Syn. <i>Scutellaria rivularis</i> ], <i>Clerodendron fragrans</i> , <i>Plantago major</i> , <i>Erigeron breviscapus</i> , <i>Sorbaria arborea</i> , <i>Scutellaria altissima</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Perilla frutescens</i> var. <i>acuta</i> [Syn. <i>Perilla frutescens</i> var. <i>purpurascens</i> ], <i>Oroxylum indicum</i> , <i>Sorbaria sorbifolia</i>
Oroxylum A 7-O-glucuronide	36948-76-2	<i>Scutellaria baicalensis</i>
Baicalein	491-67-8	<i>Scutellaria scordifolia</i> , <i>Scutellaria hypericifolia</i> , <i>Plantago major</i> , <i>Scutellaria amoena</i> , <i>Scutellaria rehderiana</i> , <i>Scutellaria baicalensis</i> , <i>Scutellaria likiangensis</i> , <i>Oroxylum indicum</i> , <i>Scutellaria viscidula</i>

ACE2 蛋白复合物晶体结构, 利用分子模拟软件分析蛋白表面的相互作用, 可以观察到 S 蛋白受体结合区与 ACE2 之间的非键相互作用的氨基酸残基, 详细信息见表 3。从表中可以看出, S 蛋白与 ACE2 蛋白之间的识别来自于氨基酸残基侧链原子之间的非键相互作用, 以及两个蛋白主链原子之间的非键相互作用。如果化合物能够与 ACE2(E) 上这些关键氨基酸相互作用, 就可以有效阻止 S 蛋白与 ACE2 的相互作用, 从而阻止病毒的有效识别和感染。

为了寻找发现抑制 S-ACE2 结合的有效药物, 可将 S-ACE2 的结合部位设为活性腔, 通过分子对接计算和对接后分析, 发现与 ACE2 亲和力较强的化合物, 在此基础上分析化合物是否与 ACE2(E) 上的这些关

键氨基酸相互作用, 相互作用的氨基酸越多, 视为抑制 S-ACE2 结合的潜力越大, 越有利于阻止病毒的侵入。

#### 4 靶向 TMPRSS2 蛋白酶的药物治疗发现

最新研究发现, SARS-CoV-2 病毒侵入细胞不仅依赖于 ACE2 受体, 还需要细胞丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2, 并发现临床使用的 TMPRSS2 蛋白酶抑制剂可以阻断 SARS-CoV-2 病毒侵入细胞, 为新型冠状病毒病的治疗带来新思路<sup>[24]</sup>。

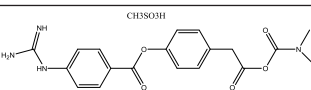
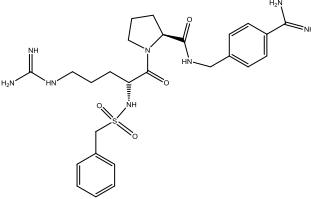
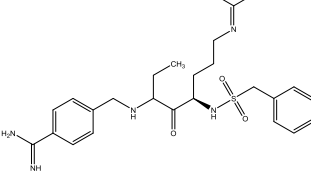
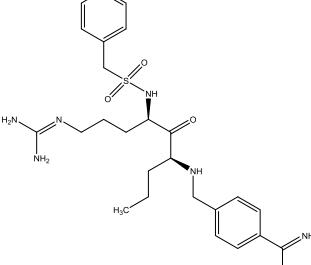
实验结果表明, 丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 抑制剂甲磺酸卡莫司他 (camostat mesylate), 能够部分阻断 SARS-CoV-2 的 S 蛋白驱动的对 Caco-2 和 Vero-TMPRSS2 细胞的感染。Camostat mesylate 可以显著降低 SARS-CoV-2 对人肺细胞的感染。

**Table 3** Interface non-bond interactions between amino acid residues from S protein and ACE2 protein. <sup>S</sup> means side-chain atom

Interaction between ACE2 (E) and S (A)	Interaction between atoms
E:LYS417:NZ--A:ASP30:OD2	E:NH2 <sup>S</sup> ---A:O <sup>S</sup>
A:LYS31:NZ--E:GLU484:OE1	A:NH2 <sup>S</sup> ---E:O <sup>S</sup>
E:ARG403:NH1--A:GLU37:OE2	E:NH---A:O <sup>S</sup>
A:TYR41:OH--E:THR500:OG1	A:OH---E:O <sup>S</sup>
A:GLN42:NE2--E:GLY446:O	A::NH2 <sup>S</sup> --E:O
A:GLN42:NE2--E:TYR449:OH	A::N <sup>S</sup> ---E:OH
A:TYR83:OH--E:ASN487:OD1	A:OH---E:O <sup>S</sup>
E:TYR449:OH--A:ASP38:OD2	E:OH---A:O <sup>S</sup>
E:ASN487:ND2--A:GLN24:OE1	E:NH2 <sup>S</sup> ---A:O <sup>S</sup>
E:GLY502:N--A:LYS353:O	E:NH---A:O
E:TYR505:OH--A:GLU37:OE1	E:OH---A:O
A:HIS34:CD2--E:TYR453:OH	A:C <sup>S</sup> --E:OH
A:TYR83:OH--E:PHE486	A:OH--E:N
E:LEU455:CD1--A:HIS34	E:C--A:NH
A:LYS353:C,O; GLY354:N--E:TYR505	A:C, O, N---E:NH
E:PHE486--A:MET82	E:O--A:NH
E:TYR489--A:LYS31	E:O--A:NH
E:TYR505-A:LYS353	E:O--A:NH

研究表明,冠状病毒刺突蛋白S促进了病毒对宿主细胞的吸附,且在病毒膜蛋白与细胞膜融合过程中,TMPRSS2促进S蛋白打开入侵细胞的大门,对于病毒的有效感染发挥了重要作用,丝氨酸蛋白酶的活性对于病毒的传播和宿主的感染是必要条件。

**Table 4** TMPRSS2 inhibitors and their information

Name	Structure	Activity	Reference
Camostat mesylate		Oral active protease inhibitor. It can inhibit trypsin, various inflammatory proteases, TMPRSS2, and partially block SARS-CoV-2 (COVID-19) from entering lung cells	[24]
BDBM50324475		TMPRSS2 inhibitor	[25]
BDBM50349344		TMPRSS2 inhibitor	[25]
BDBM50349345		TMPRSS2 inhibitor	[25]

总之, SARS-CoV-2 需要利用 TMPRSS2 蛋白酶的活性,使病毒包膜与细胞膜融合,而 TMPRSS2 抑制剂 camostat mesylate 可以阻断 SARS-CoV-2 对肺细胞的感染,提示 TMPRSS2 是抗新型冠状病毒病的重要靶点,可用于抗新型冠状病毒病药物的发现,为防治新型冠状病毒病提供新的治疗方案。

有关 TMPRSS2 抑制剂的研究报道较少,表 4<sup>[24,25]</sup> 中列举了 4 个抑制剂的信息,可为 TMPRSS2 抑制剂设计、药效团的构建与新药发现提供信息参考。

## 5 靶向病毒复制酶及复制相关蛋白酶的药物治疗

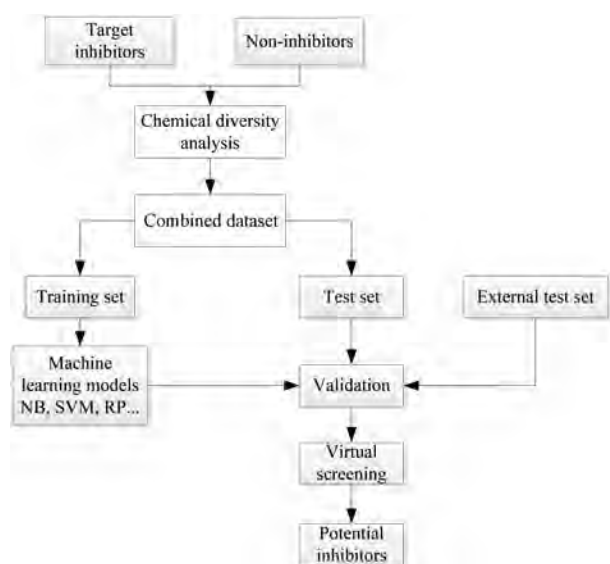
RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent polymerase, RdRp) 主要负责病毒 RNA 的复制,是研究广谱抗病毒药物靶点。病毒复制相关的蛋白酶如 PLpro、3CLpro、弗林蛋白酶 (Furin protease) 等蛋白酶在病毒蛋白的加工和多聚蛋白的裂解中发挥重要作用,因此均可作为潜在药物靶点,用于抗病毒的药物治疗<sup>[26-28]</sup>。

病毒复制及复制相关蛋白酶抑制剂属于广谱抗病毒药物。目前临床上用于治疗新型冠状病毒病的药物中,瑞德西韦和利巴韦林均为 RNA 聚合酶抑制剂,而匹洛那韦和利托那韦均为 3CLpro 抑制剂<sup>[29]</sup>。体外细胞水平的抗新型冠状病毒实验结果提示,在 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

检测浓度为下,瑞德西韦和利巴韦林使病毒载量分别降低3个数量级和1个数量级,说明它们均可有效抑制病毒的复制,瑞德西韦的活性比利巴韦林强2个数量级。洛匹那韦/利托那韦(克力芝)临床具有一定疗效,也证明3CLpro抑制剂对新冠病毒病有一定的治疗作用。然而,由于RNA病毒易于变异的特性,新药发现的任务仍然紧迫而艰巨。

经 RCSB PDB、BindingDB 等数据库检索和文献调研,已收集了冠状病毒相关的不同蛋白酶的晶体结构,可用于分子对接计算。RdRp、PLpro、3CLpro 和 Furin 蛋白酶的抑制剂数量分别为48、71、174和461个。

对于靶点结构已知、配体分子较多的这些靶点,可基于配体结构,利用机器学习算法,构建化合物-靶点相互作用预测模型,模型验证之后,可用于化合物数据库的大规模虚拟筛选,以发现新的潜在活性化合物,工作流程见图1<sup>[30,31]</sup>。目前本课题组已针对病毒RdRp、PLpro、3CLpro和Furin等靶点抑制剂,建立了一系列的化合物-靶点相互作用预测模型,已用于化合物数据库的虚拟筛选,预测得到的潜在活性化合物,正在进行细胞水平的抗新型冠状病毒实验验证。



**Figure 1** Workflow for classification models building, validation, and virtual screening for potential inhibitors. NB: Naive Bayes; SVM: Support vector machine; RP: Recurve

## 6 靶向宿主的药物发现

病毒侵入宿主细胞后,在细胞内大量繁殖,从而产生大量炎症因子和氧自由基,损伤靶器官,如引起肺部呼吸衰竭,出现过免疫并产生过多炎症因子。而对于重症患者的某些检测指标,如淋巴细胞进行性减少,说明免疫力渐进性下降。在没有特效药的情况下,依据患者的临床症状进行对症治疗是临床治疗的重要

策略。

中药在对症治疗的临床应用表现尤为突出,本文不作详细阐述。中药有效成分的组合“甘草酸二铵+维生素C+芦丁”的鸡尾酒疗法也具有其合理性,其中甘草酸二铵具有抗炎症瀑布的作用,但没有皮质激素的不良反应,维生素C作为抗氧化剂,结合甘草酸的抗炎作用,对于组织器官将发挥双重保护作用。而芦丁具有抗炎、维持血管抵抗力、降低通透性等作用,可有效减少炎症物质向组织器官的渗透<sup>[32]</sup>。

病毒感染引发的炎症因子有很多,主要包括IL-6、IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 等<sup>[33]</sup>。本课题组针对病毒感染引发的炎症因子,利用机器学习算法,已系统地建立了化合物-靶点相互作用预测模型,并已用于活性化合物的预测<sup>[34]</sup>。预测模型的应用,一方面可以发现新的抗炎药物,另一方面也适用于一些抗炎药物的作用机制的研究。

干扰素在机体的抗病毒免疫中具有重要作用,在抗新型冠状病毒的临床治疗方案中已经纳入 $\alpha$ -干扰素,其疗效是肯定的。本课题组与中国疾控中心病毒病预防控制所通力合作,对致力于防治病毒性药物开发的北京某知名企业提供的不同类型干扰素,进行了抗新型冠状病毒SARS-CoV-2的体外活性评价,发现其中一些干扰素具有明显的体外抗病毒活性,在 $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞实验浓度下,病毒载量可降低数百倍,提示其具有很好的应用前景。

## 7 结语与展望

基于病毒复制过程各个环节的关键蛋白及宿主来源的关键蛋白,研发单靶点药物,将为联合用药提供新的治疗方案,而同时靶向多个病毒靶点和宿主靶点的药物则是理想的多靶点抗病毒药物,也是抗病毒新药研发的热点。中药方剂多成分、多靶点、多通路的物质基础和网络机制具有天然的治疗优势,将为中医药的发展注入新的活力<sup>[35]</sup>。基于不同药物靶点和基于不同药物来源的新药研发将为未来防治COVID-19提供更多可行的有针对性的有效治疗方案。

自新型冠状病毒病暴发以来,世界各国科学家、医学工作者、政府机构、企事业单位等各部门各行业人员,通力合作,对于新型冠状病毒的基因测序、临床检测、靶点研究、药物开发、疫苗研制、疾病治疗等各方面均取得阶段性成果<sup>[36-38]</sup>。目前对于SARS-CoV-2及COVID-19虽然已有一定的认识,但仍然有很多未知。随着各项工作的不断推进,特别是对SARS-CoV-2病毒蛋白结构及功能的不断阐明,以及对COVID-19疾病认识的不断深入,必将有力地促进抗COVID-19的新药发现,为COVID-19提供更多有效的治疗方案。

## References

- [1] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2012-7.
- [2] Huang C, Wang Y, Li X, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China [J]. *Lancet*, 2020, 395: 497-506.
- [3] Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727-733.
- [4] Ma Z, Cao GJ, Guan M. Research status and development of human coronavirus [J]. *Int J Lab Med (国际检验医学杂志)*, 2020, 41: 518-522.
- [5] Qian YH, Dong JY. Laboratory detection and protection on 2019 novel coronavirus [J]. *Lab Med Clin (检验医学与临床)*, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1167.R.20200218.1654.002.html>.
- [6] Chen M, Tong RS, Bian Y, et al. Rapid evaluation of interferon alpha with subcutaneous injection for 2019 novel coronavirus treatment [J]. *Herald Med (医药导报)*, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1293.R.20200210.1759.002.html>.
- [7] Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR [J]. *Euro Surveill*, 2020. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
- [8] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 237-261.
- [9] Xu X, Chen P, Wang J, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63: 457-460.
- [10] 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 [J]. *Cell*, 2020, 181: 1-10.
- [11] Wu F, Zhao S, Yu B, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China [J]. *Nature*, 2020, 579: 265-269.
- [12] Gordon DE, Jang M, Bouhaddou M, et al. A SARS-CoV-2-human protein-protein interaction map reveals drug targets and potential drug-repurposing [J]. *BioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.03.22.002386.
- [13] Khaerunnisa S, Kurniawan H, Awaluddin R, et al. Potential Inhibitor of COVID-19 main protease (Mpro) from several medicinal plant compounds by molecular docking study [J]. *Preprints*, 2020. DOI: 10.20944/preprints202003.0226.v1.
- [14] Yin C. Genotyping coronavirus SARS-CoV-2: methods and implications [J]. *arXiv*, 2020, arXiv: 2003.10965.
- [15] Conti P, Ronconi G, Caraffa A, et al. Induction of pro-inflammatory cytokines (IL-1 and IL-6) and lung inflammation by coronavirus-19 (COVI-19 or SARS-CoV-2): anti-inflammatory strategies [J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2020, 34: 1.
- [16] Yan R, Zhang Y, Guo Y, et al. Structural basis for the recognition of the 2019-nCoV by human ACE2 [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.1102.1119.956946.
- [17] Imai Y, Kuba K, Rao S, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure [J]. *Nature*, 2005, 436: 112-116.
- [18] Kuba K, Imai Y, Ohto-Nakanishi T, et al. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters [J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 128: 119-128.
- [19] Fehr AR, Channappanavar R, Perlman S. Middle East respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus [J]. *Annu Rev Med*, 2017, 68: 387-399.
- [20] Wrapp D, Wang N, Corbett KS, et al. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation [J]. *Science*, 2020. DOI: 10.1126/science.abb2507.
- [21] Yan R, Zhang Y, Guo Y, et al. Structural basis for the recognition of the 2019-nCoV by human ACE2 [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.1102.1119.956946.
- [22] Chen H, Du Q. Potential natural compounds for preventing SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Infection [J]. *Med Pharmacol*, 2020. <https://www.preprints.org/manuscript/202001.0358/v2>.
- [23] Lan J, Ge J, Yu J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor [J]. *Nature*, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- [24] 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 [J]. *Cell*, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
- [25] Cheng KW, Cheng SC, Chen WY, et al. Thiopurine analogs and mycophenolic acid synergistically inhibit the papain-like protease of Middle East respiratory syndrome coronavirus [J]. *Antiviral Res*, 2015, 115: 9-16.
- [26] 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 [J]. *Front Med*, 2017, 11: 449-461.
- [27] Báez-Santos YM, St John SE, Mesecar AD. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds [J]. *Antiviral Res*, 2015, 115: 21-38.
- [28] Steuber H, Hilgenfeld R. Recent advances in targeting viral proteases for the discovery of novel antivirals [J]. *Curr Top Med Chem*, 2010, 10: 323-345.
- [29] Liu QY, Wang XL. Strategies for the development of drugs targeting novel coronavirus 2019-nCoV [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 181-188.
- [30] Zheng YF, Kong LL, Jia H, et al. Network pharmacology study on anti-stroke of Xiaoshuan Tongluo formula based on systematic compound-target interaction prediction models [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 256-264.

- [31] Fang J, Li Y, Liu R, et al. Discovery of multitarget-directed ligands against Alzheimer's disease through systematic prediction of chemical-protein interactions [J]. *J Chem Inf Model*, 2015, 55: 149-164.
- [32] Zhou W, Zhao F, Li P, et al. Clinical value of diammonium glycyrrhizinate in treatment of COVID-19 [J]. *Chin J Virol (病毒学报)*, 2020, 36: 160-164.
- [33] Zhang J, Liu J, Yuan Y, et al. Two waves of pro-inflammatory factors are released during the influenza A virus (IAV)-driven pulmonary immunopathogenesis [J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16: e1008334.
- [34] Xu LJ, Jiang W, Pang XC, et al. Network pharmacology study of the effective constituents in the Compound Yizhihao against influenza disease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 745-752.
- [35] Ma L, Bao Z, Lei Y, et al. Prescription rules and mechanisms of herbal prevention prescriptions for COVID-19 by data mining and network pharmacology [J]. *Mod Tradit Chin Med Mater Med-World Sci Technol (世界科学技术-中医药现代化)*, 2020. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.5699.R.20200331.0856.014.html>.
- [36] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. *Lancet*, 2020, 395: 565-574.
- [37] Ling CQ. Traditional Chinese medicine is a resource for drug discovery against 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) [J]. *J Integr Med*, 2020. DOI: 10.1016/j.joim.2020.02.004.
- [38] Zhang L, Liu Y. Potential interventions for novel coronavirus in China: a systematic review [J]. *J Med Virol*, 2020. DOI: 10.1002/jmv.25707.