

SARS-CoV-2 主蛋白酶抑制剂的研究进展

杨婉玲[#], 程玉森[#], 宋乐天, 叶冰, 高升华*, 刘新泳*, 展鹏*

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 主蛋白酶 (main protease, M^{pro}) 作为冠状病毒种间相似性极高的共有蛋白酶, 且高度保守, 是病毒复制过程中不可或缺的蛋白水解酶, 因此是抗 SARS-CoV-2 药物设计的重要靶标。本文针对新型冠状病毒主蛋白酶抑制剂进行全面综述, 涵盖化学结构、抗病毒活性与成药性、结合模式与构效关系等。

关键词: 新冠感染; 新型冠状病毒; 主蛋白酶; 主蛋白酶抑制剂; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)09-2581-20

Research progress of SARS-CoV-2 main protease inhibitors

YANG Mian-ling[#], CHENG Yu-sen[#], SONG Le-tian, YE Bing, GAO Sheng-hua*,
LIU Xin-yong*, ZHAN Peng*

(Key Laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Medicinal Chemistry,
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: As a common protease with high similarity among coronavirus species, the main protease (M^{pro}) of SARS-CoV-2 is responsible for the catalytic hydrolysis of viral precursor proteins into functional proteins, which is essential for coronavirus replication and is one of the ideal targets for the development of broad-spectrum antiviral drugs. This paper reviews the main protease inhibitors of SARS-CoV-2, including their molecular structures, potencies and drug-like profiles, binding modes and structure-activity relationships, etc.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; main protease; main protease inhibitor; drug design

冠状病毒 (coronavirus, CoVs) 是一类广泛存在、可感染人畜并引起严重急性慢性呼吸道系统疾病的病原体^[1]。冠状病毒科分为 α 、 β 、 γ 、 δ 四个属, 目前已知有 7 种冠状病毒可引起人类疾病, 分别为 HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2。其中 SARS-CoV、MERS-CoV 及 SARS-CoV-2 具有高致病性, 对人类生命健康有较大的威胁^[2]。新型冠状病毒感染 (coronavirus disease

2019, COVID-19) 是由新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 引起的急性呼吸道传染病^[3,4], 截至 2023 年 3 月中旬, 全球范围内报告确诊病例总数近 7.6 亿例, 死亡总人数超过 687 万^[5], 新型冠状病毒感染对全球的公共卫生体系和经济生产造成了重大影响。SARS-CoV-2 主要通过受感染者呼吸或咳嗽时排出的飞沫传播, 感染者可能无症状或出现常见的新冠感染症状, 包括发热、咳嗽、疲劳、呼吸短促和嗅觉丧失^[6]。重症病例可能的并发症包括肺炎、急性呼吸窘迫综合征、多器官衰竭和死亡^[7]。随着中国《新型冠状病毒肺炎防控方案 (第九版)》的发布, 疫情防控措施逐渐调整。直接靶向新冠病毒的有效药物是老年人、重症患者及受基础病困扰的人群的迫切需求。

SARS-CoV-2 是一种单股正链 RNA 病毒, 其复制周期分为侵入、转录、复制、组装和分泌等几个阶段^[8]

收稿日期: 2022-12-11; 修回日期: 2023-02-06.

基金项目: 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31); 山东省重大科技创新工程项目 (2019JZZY021011); 中国博士后科学基金面上基金项目 (2021M702003); 广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金青年基金项目 (2021A1515110740).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: shh_gao@163.com; xinyongl@sdu.edu.cn;
zhanpeng1982@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1364

(图1)。首先,病毒颗粒与细胞附着因子结合,并与细胞受体(血管紧张素转化酶2,ACE2)和宿主因子(细胞表面丝氨酸蛋白酶,TMPRSS2)发生特异性相互作用,促进病毒在细胞膜或内体膜上的摄取和融合;进入宿主细胞后释放出病毒遗传物质RNA,并附着在宿主核糖体上;宿主核糖体将开放阅读框ORF1a/b翻译成两个多聚蛋白pp1a和pp1ab,随后经木瓜样蛋白酶(papain-like protease, PL^{pro})和主蛋白酶(main protease, M^{pro})切割后产生多种非结构蛋白并形成病毒复制-转录酶复合物。病毒基因组的正链RNA转录形成反义负链RNA,并以负链RNA为模板经转录复制形成新的正链RNA。在该过程中病毒的亚基因组mRNA翻译成其他病毒结构蛋白。经过与病毒基因组的RNA组装形成成熟病毒颗粒,最后以胞吐的方式释放到细胞外。

理论上,阻断病毒生命周期重的任一环节,均可抑制病毒复制^[9]。相较于其他靶标,M^{pro}具有无可比拟的优点:在冠状病毒种间相似性极高,高度保守不易变异,现有的突变株在M^{pro}上基本没有突变位点,主要突变在S蛋白上(故中和抗体类药物的劣势在此);M^{pro}对病毒至关重要,如果M^{pro}缺失,病毒的复制将无法完成;与人类蛋白酶的同源性较低,因此安全性更好。这些优点使M^{pro}成为业界普遍认可的最理想抗新冠病毒口服特效药靶标。

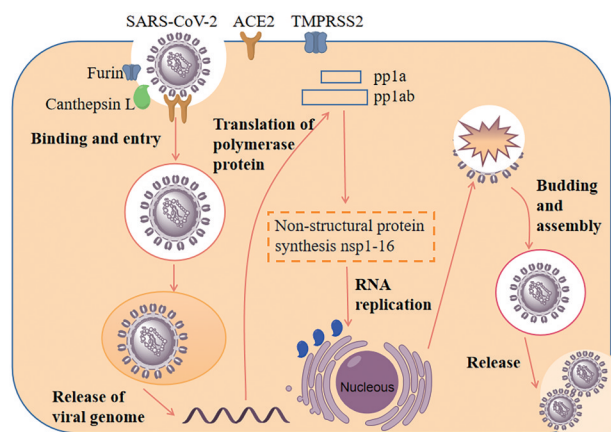


Figure 1 SARS-CoV-2 life cycle

主蛋白酶也被称为3C样蛋白酶(3C-like proteinase, 3CL^{pro}),是一种半胱氨酸蛋白酶,由两个相互垂直的单体组成的同源二聚体。其中每个单体包括3个结构域,结构域I和II由反平行 β -桶结构组成,其之间缝隙中心的Cys145和His41构成了催化二联体,能特异性识别和切割非结构蛋白nsp4~nsp16的11个裂解位点,nsp4~nsp16主要负责病毒基因组复制和转录,在病毒生命周期其他过程中也发挥重要作用,如蛋白质翻译、

切割、修饰和核酸合成^[10]。M^{pro}的活性口袋位于结构域I和II之间的裂隙中,由4个口袋(S1、S1'、S2、S4)组成。早在2003年,Yang等^[11]就成功解析了SARS-CoV-1 M^{pro}的晶体结构。新冠疫情暴发后,该团队于2020年1月成功解析了SARS-CoV-2 M^{pro}的高分辨率三维结构^[12](图2)。基因序列比对显示,SARS-CoV-1与SARS-CoV-2的M^{pro}有96%的同源性^[13],且高度保守。因此,M^{pro}是广谱抗新冠药物研发的理想靶标。

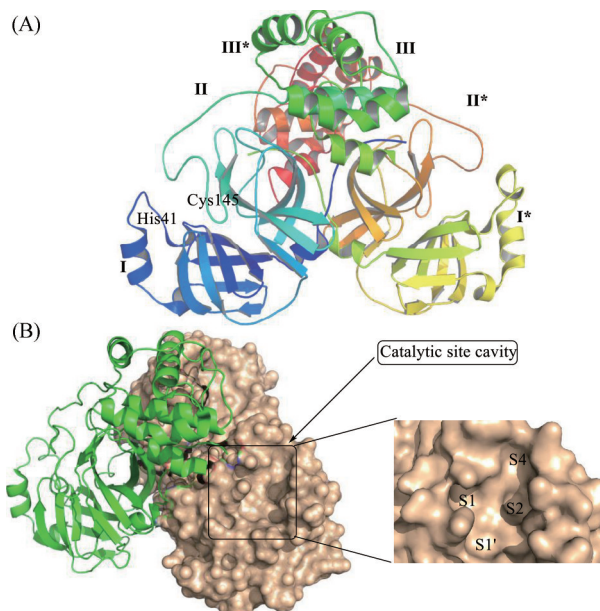


Figure 2 (A) The three-dimensional structure of M^{pro} from SARS-CoV-2. (B) A closeup view of the catalytic site cavity (PDB code: 6Y2G). This figure was shown in Pymol 2.5

根据新冠主蛋白酶抑制剂的结构类型,可以分为拟肽类、非拟肽类和天然产物类M^{pro}抑制剂。本文对抑制剂的结构、活性、设计思路及优缺点进行了综述,概述了自2020年以来最具潜力的M^{pro}抑制剂的研究现状,为抗新冠感染药物的研发提供参考。

1 拟肽类抑制剂

根据抑制剂与M^{pro}的作用模式,拟肽类抑制剂可分为非共价和共价拟肽类抑制剂。拟肽类非共价抑制剂是通过氢键、范德华相互作用、疏水相互作用等与配体结合,非共价抑制剂通常选择性更强,毒性较低。拟肽类共价抑制剂的作用机制通常包括两个步骤,首先是模拟天然肽底物的拟肽体与M^{pro}结合并形成非共价复合物,共价弹头在空间上非常接近M^{pro}活性位点的催化残基,Cys145的巯基通过亲核进攻弹头以形成共价键。即先通过非键相互作用结合到蛋白表面,随后再发生化学反应形成共价键。这些弹头主要有Michael受体、醛酮、氰基和 α -酮酰胺等^[14]。下文根据

弹头的种类对拟肽类 M^{pro} 抑制剂分类描述。

1.1 以醛基为弹头的拟肽类 M^{pro} 抑制剂 化合物 **1** 是一种用于治疗猫传染性腹膜炎的二肽蛋白酶抑制剂。2020 年, Ma 等^[15] 将建立的基于荧光共振能量转移 (FRET) 的酶促分析方法应用于 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂的筛选中, 发现化合物 **1** 展现出优异的抗 SARS-CoV-2 M^{pro} 活性 ($IC_{50} = 0.030 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时在 Vero E6 细胞中也具有显著的抗病毒效果 ($EC_{50} = 3.37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性较低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **1** 的作用机制如图 3A 所示, 其首先转化为肽醛化合物 **2**, 后者与 Cys145 的巯基形成 C-S 共价键来抑制 M^{pro} 。 SARS-CoV-2 M^{pro} 与 **1** 的复合物共晶结构表明 (图 3B、C), 化合物 **1** 占据了主蛋白酶底物结合口袋的 4 个空腔, 以半硫缩醛形式共价结合到 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 Cys145 上, 氨基甲酸酯键与 Glu166 的主链和 Gln189 的侧链形成氢键。 P1 位的谷氨酰胺替代物与 His164 和 Glu166 的侧链形成氢键, 而内酰胺环的 N 原子与 Glu166 侧链及 Phe140 的主链形成氢键。

2020 年, 上海药物研究所柳红团队^[16] 在多年抗 EV71 病毒药物研究经验的基础上, 发现了两个高活性拟肽类共价 SARS-CoV-2 主蛋白酶抑制剂化合物 **3** 和 **4** (图 4A), 它们在体外均展现出对主蛋白酶极佳的抑制活性, IC_{50} 值分别达到 0.053 和 0.040 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时在 Vero E6 细胞中也具有显著的抗 SARS-CoV-2 效果 (EC_{50} 分别为 0.53 和 0.72 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性较低

($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 为了探究其与 M^{pro} 的作用机制, 该团队解析了 SARS-CoV-2 M^{pro} 与化合物 **3** 的复合物晶体结构 (1.5 Å, 图 4B)。 结果显示 **3** 的醛基弹头和 Cys145 的硫原子形成 1.8 Å 的 C-S 共价键。 在 S1 位点, 内酰胺的氧原子与 His163 的咪唑环形成氢键, NH 基团与 Phe140 的主链形成氢键。 P2 处的环己基与 Met49、Tyr54、Met165、Asp187 和 Arg188 存在多个疏水作用, 并与占据 S2 口袋的 His41 的咪唑环具有 π - π 堆积作用。 P3 处的吡啶基团暴露于溶剂中, 与 Glu166 形成关键氢键, 并与 Pro168 和 Gln189 形成疏水作用。 进一步研究表明化合物 **3** 在 小鼠体内具有良好的体内药代动力学性质, $t_{1/2}$ 为 4.27 h (腹腔注射), 生物利用度为 87.8%, 代谢稳定性良好 ($CL = 17.4 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), 优于化合物 **4**。 随后, 在 SD 大鼠和比格犬中对化合物 **3** 进行了急性毒性研究, 未见明显毒性, 表明其是具有临床价值的候选化合物。

由于化合物 **3** 对主要流行的 SARS-CoV-2 变异病毒株阿尔法、贝塔、德尔塔、奥密克戎均具有高效广谱抑制活性, 且无需联合药代动力学增强剂 (如 ritonavir 等), 可以减少因使用药代动力学增强剂出现的潜在药物相互作用风险。 2021 年 3 月, bofutrelvir, 即化合物 **3**, 在美国启动 I 期临床研究, 目前已获批开展国际多中心 II/III 期临床试验。 2022 年 11 月 23 日前沿生物披露, 雾化吸入用 bofutrelvir, 拟用于治疗轻型、普通型新冠肺炎患者的 II/III 期临床试验方案^[17,18]。

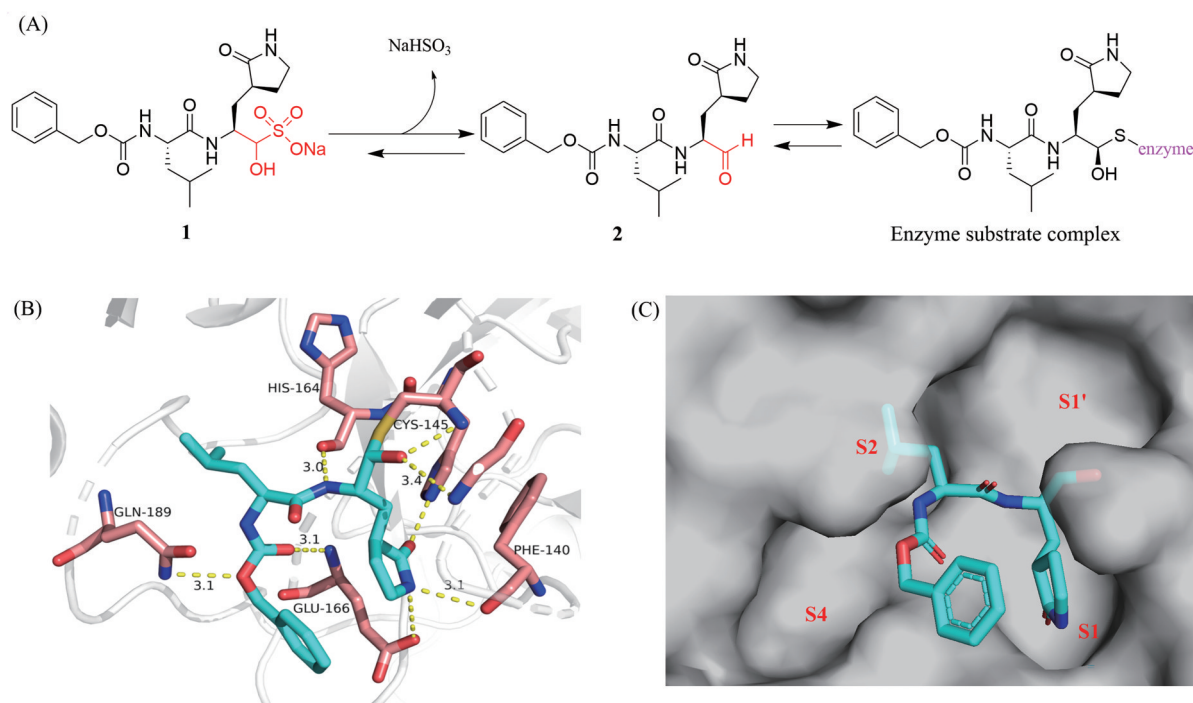


Figure 3 (A) The scheme of compound **1** converts into the aldehyde inhibitor **2** of M^{pro} . (B) X-ray structure of the complex of **1** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code:7JSU). (C) Spatial occupancy of compound **1** at the M^{pro} active site. This figure was shown in Pymol 2.5

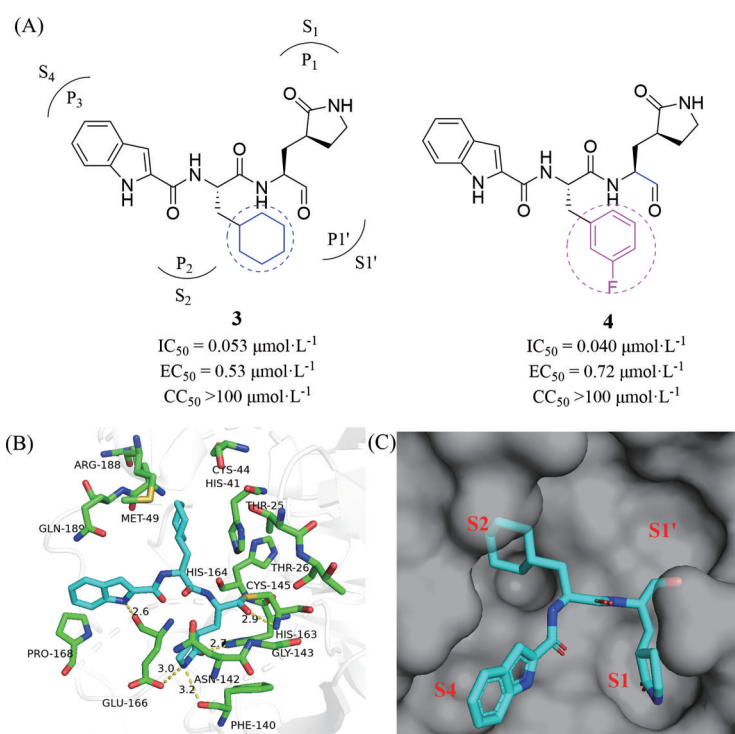


Figure 4 (A) The structures of compounds **3** and **4**. (B) X-ray structure of the complex of **3** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6LZE). (C) Spatial occupancy of compound **3** at the M^{pro} active site. This figure was shown in Pymol 2.5

2020年, Ma等^[15]基于FRET从Selleckchem化合物库中筛选出钙蛋白酶抑制剂II (**5**, 图5A)在体外能有效抑制SARS-CoV-2主蛋白酶活性, 其 IC_{50} 为 $0.97 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时在Vero E6细胞中展现出较好的抗病毒效果 ($EC_{50} = 2.07 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。Sacco等^[19]通过解析 M^{pro} 与化合物**5**的共晶结构发现亲电弹头醛基与Cys145以共价键形式结合。与其他以醛基为弹头的肽类抑制剂类似, **5**的半胱缩醛占据了由Gly143、Ser144和Cys145的主链酰胺基团形成的氧阴离子孔; P1蛋氨酸侧链占据S1位点且硫原子与His163形成氢键; P2亮氨酸侧链在S2位点中形成疏水作用, 而P3亮氨酸朝向溶剂界面附近的S3位点。钙蛋白酶抑制剂II的主链也与 M^{pro} 中的His164、

Met165的主链之间形成多个氢键(图5B)。此外, **5**还能够有效抑制人组织蛋白酶L的活性, 抑制常数 K_i 为 $50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 表明可以针对性设计SARS-CoV-2 M^{pro} 和人类组织蛋白酶L的双靶点抑制剂。

2021年, Qiao等^[20]基于 M^{pro} 晶体结构, 利用合理药物设计策略, 以上市药物特拉匹韦(telaprevir)和波普瑞韦(boceprevir)的双环脯氨酸片段为骨架, 在S4腔引入多种亲脂基团, 设计并合成了两系列32个包含双环脯氨酸片段的全新结构 M^{pro} 小分子抑制剂。活性结果表明大部分化合物在体外均可有效抑制 M^{pro} 活性, IC_{50} 值在 $7.6\sim 748.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间。其中化合物**6**(图6A)抑制效果最佳, IC_{50} 为 $7.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过解析其与 M^{pro} 复合物的晶体结构, 发现其醛基与Cys145形成共

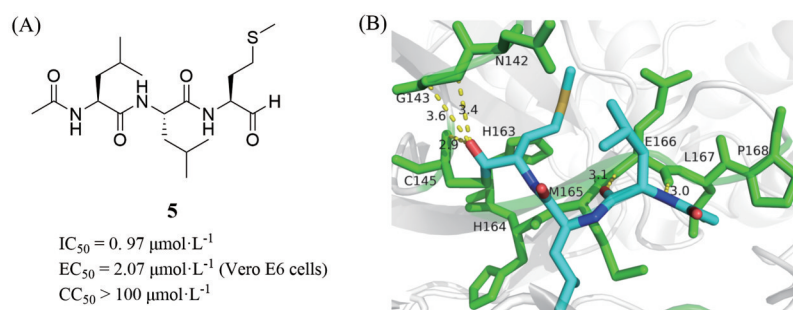


Figure 5 (A) The structure of compound **5**. (B) X-ray structure of the complex of **5** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6XA4). This figure was shown in Pymol 2.5

价键的同时,醛基的氧原子与 Cys145 和 Gly143 的主链酰胺形成两个氢键。P1 处的内酰胺环伸向 S1 腔中,内酰胺的氧原子和氮原子分别与 His163 的侧链和 Phe140 的主链成两个氢键。由于脯氨酸结构中固有的构象限制,刚性双环脯氨酸采用反式外构象,伸向 S2 疏水口袋。在对 SD 大鼠的 PK (药代动力学) 实验中,化合物 **7** 和 **8** 则表现出相对良好的 PK 特性,口服生物利用度分别为 11.2% 和 14.6%,具有开发成口服药物的潜力^[21]。化合物 **7** 腹腔注射时的 $t_{1/2}$ 为 4.53 h,生物利用度为 78.0%,化合物 **8** 的 $t_{1/2}$ 为 3.8 h (腹腔注射),生物利用度为 76.2%,二者均具有良好的代谢稳定性 (CL 分别为 22.67 和 17.10 mL·min⁻¹·kg⁻¹),可作为候选药物进一步开发。

1.2 以氰基为弹头的拟肽类抑制剂 辉瑞公司的口服新冠病毒药物 paxlovid 在临床试验中显示出了巨大的前景,与安慰剂相比,在出现症状的 5 天内给药,可将因 COVID-19 住院或死亡的风险降低 88%。基于该结果,美国 FDA 于 2021 年 12 月底批准了 paxlovid 的紧急使用许可,用于轻中度新冠肺炎患者的临床治疗^[22]。paxlovid 是 M^{pro} 抑制剂 nirmatrelvir 与细胞色素 P450 酶抑制剂 ritonavir 的复方制剂,对 Omicron、Delta 等变异毒株同样有较好的抑制效果。遗憾的是,在 2022 年 4 月 29 日,辉瑞公司对外公布了 paxlovid 用于暴露后预防的 II/III 期临床 (EPIC-PEP) 研究情况,结果显示该药用于成人暴露后预防效果不佳^[23]。

早在 2003 年 SARS 暴发时,辉瑞公司就报道了化合物 **9** (图 7) 具有抑制 SARS-CoV-1 M^{pro} 的活性。由于 SARS-CoV-1 和 SARS-CoV-2 M^{pro} 在底物结合位点上的序列同源性为 100%^[24],因此 **9** 也能有效抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} ($K_i = 0.271$ nmol·L⁻¹),同时在 Vero E6 细胞中也具有显著的抗 SARS-CoV-2 活性 ($EC_{50} = 231$ nmol·L⁻¹)。

针对 **9** 的透膜性和口服生物利用度较差这一问题,研究人员尝试减少 P1' 位的氢键供体,并引入氰基和苯并噻唑-2-基酮两种共价弹头^[25]。引入氰基的化合物 **10** 在大鼠体内口服吸收显著提高,代谢稳定性较好,但对主蛋白酶的抑制作用及体外抗病毒活性均有所降低。在 P1' 位引入苯并噻唑-2-基酮、P2 位引入环状亮氨酸拟肽类似物后得到的 **11** 可显著提高透膜性,但对主蛋白酶抑制作用降低,主要是由于缺少了与 Gln189 之间的氢键。为此,进一步引入甲磺酰胺基团得到的化合物 **12** 伸向 Gln189 下方,增强与 P3 口袋残基的结合,提高与 Glu166 的氢键作用。与 **11** 相比,化合物 **12** 对主蛋白酶的体外抑制活性、抗病毒活性及口服生物利用度均有所提高。通过对 P3 位端头进行优化,得到 S4 口袋为三氟乙酰胺基团的化合物 **13**,其不但保持了对主蛋白酶的高效抑制作用,还提高了抗病毒活性、透膜性、代谢稳定性和口服生物利用度。随后,弹头替换为氰基后得到化合物 **14**,即 nirmatrelvir,其通过抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的活性而阻断病毒复

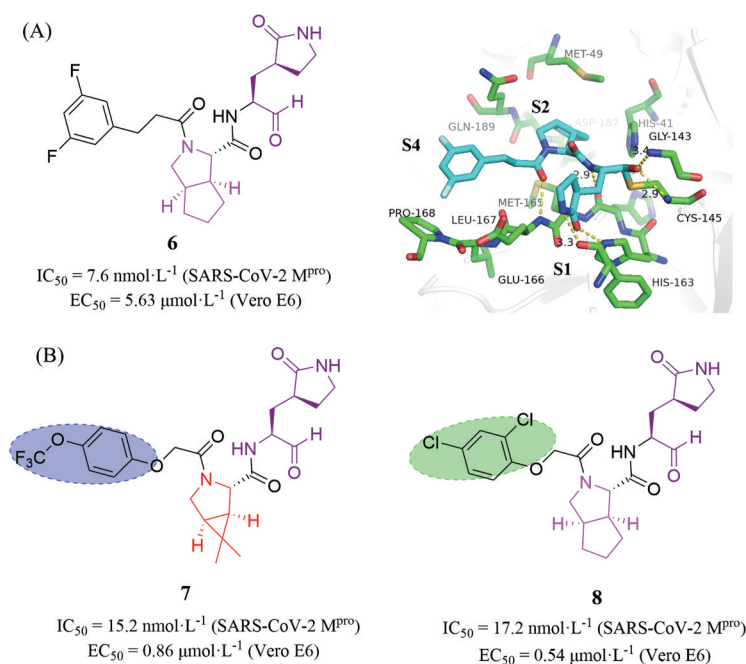


Figure 6 (A) Chemical structure, activity and crystal structure of **6** in complex with SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7D3I). This figure was shown in PyMol 2.5. (B) Chemical structures of compounds **7** and **8**

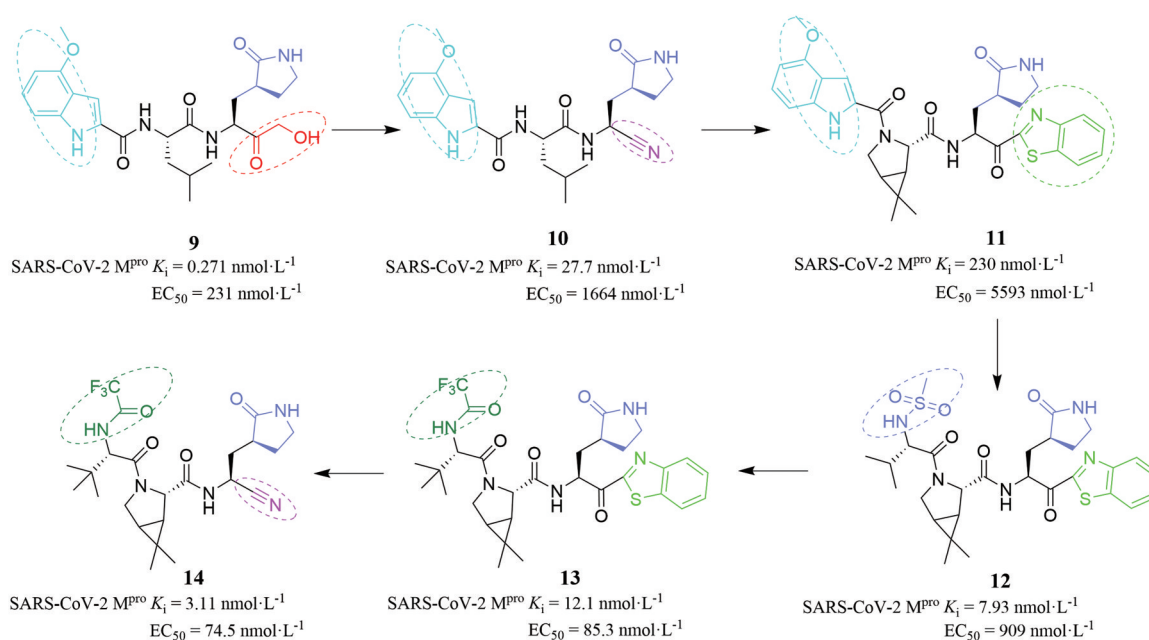


Figure 7 The path to nirmatrelvir

制。化合物 **14** 对 M^{pro} 的体外抑制活性得到进一步提高,同时还增强了抗 SARS-CoV-2 的活性 (EC_{50} 值从 $85.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 提升至 $74.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)、代谢稳定性和口服生物利用度 F (大鼠体内的 PK 实验中, F 从 33% 提升至 50%)。通过将 **14** 与主蛋白酶共孵育实验证明了 **14** 是 SARS-CoV-2 主蛋白酶的可逆性共价抑制剂。研究者将化合物 **14** 确定为临床候选药物,是由于其易于大规模合成,且溶解度有所提高,便于进一步的毒理学研究。此外, P1 立体中心的外嵌化倾向有所降低。**14** 与 SARS-CoV-2 主蛋白酶复合物的晶体结构显示 **14** 充分占据 S1、S2 和 S4 亚位点,并与催化残基 Cys145 共价结合 (图 8)^[26]。

1.3 以酮酰胺为弹头的拟肽类抑制剂 2020年3月,吕贝克大学 Rolf 团队^[27]解析了 SARS-CoV-2 M^{pro} 的晶

体结构 (分辨率 1.75 \AA)。此外,该研究还探讨了一种 α -酮酰胺抑制剂的作用。在前期工作中,研究人员鉴定了拟肽类 α -酮酰胺可作为 α 和 β 冠状病毒 M^{pro} 广谱抑制剂。其中,化合物 **15** (图 9A) 在 Huh7 细胞中抗 MERS-CoV 效果最佳。在此基础上,为了延长化合物半衰期,研究人员对 **15** 进行了修饰,将 P3-P2 酰胺键隐藏在吡啶酮环中。此外,为增加化合物在血浆中的溶解度并减少其与血浆蛋白的结合,再用疏水性较低的 Boc 基团代替了疏水的肉桂酰基,得到化合物 **16**。为了增强抗 SARS-CoV-2 活性,用较小的环丙基替代了 P2 环己基,得到化合物 **17**,但广谱性欠佳。化合物 **17** 和 SARS-CoV-2 M^{pro} 复合物晶体结构表明,由于 Cys145 的巯基对 **17** 酮羰基的亲核进攻,形成了硫代半缩酮。硫代半缩酮通过与残基 His41 形成氢键而

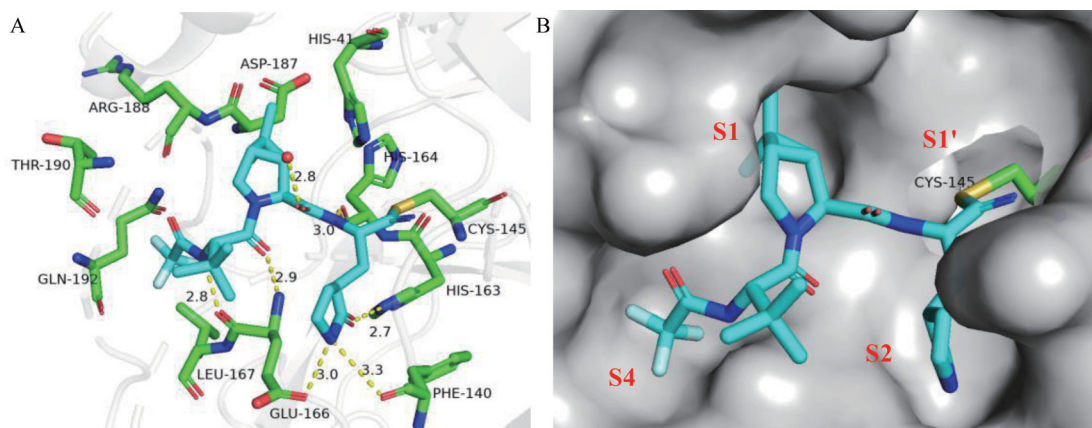


Figure 8 (A) X-ray structure of the complex of **14** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7VH8). (B) The zoom-in view of the substrate-binding pocket, compound **14** forms a covalent bond to Cys145. This figure was shown in Pymol 2.5

稳定在氧阴离子空穴中,酰胺氧作为氢受体基团与 Gly143、Cys145 和 Ser144 形成氢键。S1 位点通过与 Phe140 和 Glu166 羧酸的氢键结合容纳内酰胺环,羰基氧与 His163 的咪唑环形成氢键,而吡啶酮环的羰基氧与 Glu166 主链的酰胺形成氢键(图 9B)。

化合物 **16** 和 **17** 的药代动力学研究表明, **17** 的 ADME 参数与 **16** 类似, 与人血浆蛋白的结合率为 90%。同时,其在血浆中的平均保留时间延长至 2.7 h, 半衰期约为 1.8 h。与 **16** 相比, **17** 在血浆中的清除速度较慢。此外,研究人员监测了 **17** 的肺组织水平, 4 h 后,发现其在小鼠肺组织中浓度仍达到 $13 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。鉴于 COVID-19 对肺部有较大影响,故 **16** 和 **17** 体现出的这种肺向性是有益的。除皮下给药外,研究者还使用吸入装置以 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 对小鼠进行了雾化给药。24 h 后,小鼠肺组织中存在 **17** 的浓度为 $33 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 。实验结果表明吸入耐受良好,小鼠未显示任何不良反应,这表明了化合物 **17** 用于肺部给药的可行性。

Ma 等^[15]通过基于 FRET 的酶分析,对已上市和在研的蛋白酶抑制剂进行筛选,发现抗丙肝药物

boceprevir (**18**) 和 calpain inhibitors XII (**19**, 图 10) 具有较好的主蛋白酶抑制活性。利用酶动力学研究、热位移结合试验和生物质谱进一步表征了两种化合物与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的结合。研究显示, **18** 和 **19** 抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC_{50} 值分别为 4.13 和 $0.45 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 细胞水平抗病毒活性的 EC_{50} 分为 1.31 和 $0.49 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。前期研究表明钙蛋白酶抑制剂 II 和 XII 也对人类组织蛋白酶 L (一种对病毒入侵非常重要的宿主蛋白酶) 有活性^[17]。因此, calpain XII 抑制剂对 M^{pro} 和组织蛋白酶具有双重抑制作用。由于 boceprevir 是已上市药物,在剂量、不良反应和药动学方面均存在大量已知数据,故可加速其用于 SARS-CoV-2 治疗的研发进程。

1.4 以苯并噻唑基酮为弹头的拟肽类抑制剂 2013 年, Thanigaimalai 等^[28]针对 SARS-CoV-1 M^{pro} 设计合成了一系列以苯并噻唑基酮为弹头的拟肽化合物,并且通过对 P3 位置的刚性取代基变换,得到了化合物 **20**~**23**(图 11A、B)。该系列化合物对 SARS-CoV-1 M^{pro} 显示出较好的活性,其中化合物 **23** 的 K_i 值为 $6.3 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。鉴于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV-1 的 M^{pro} 有 96% 的基因

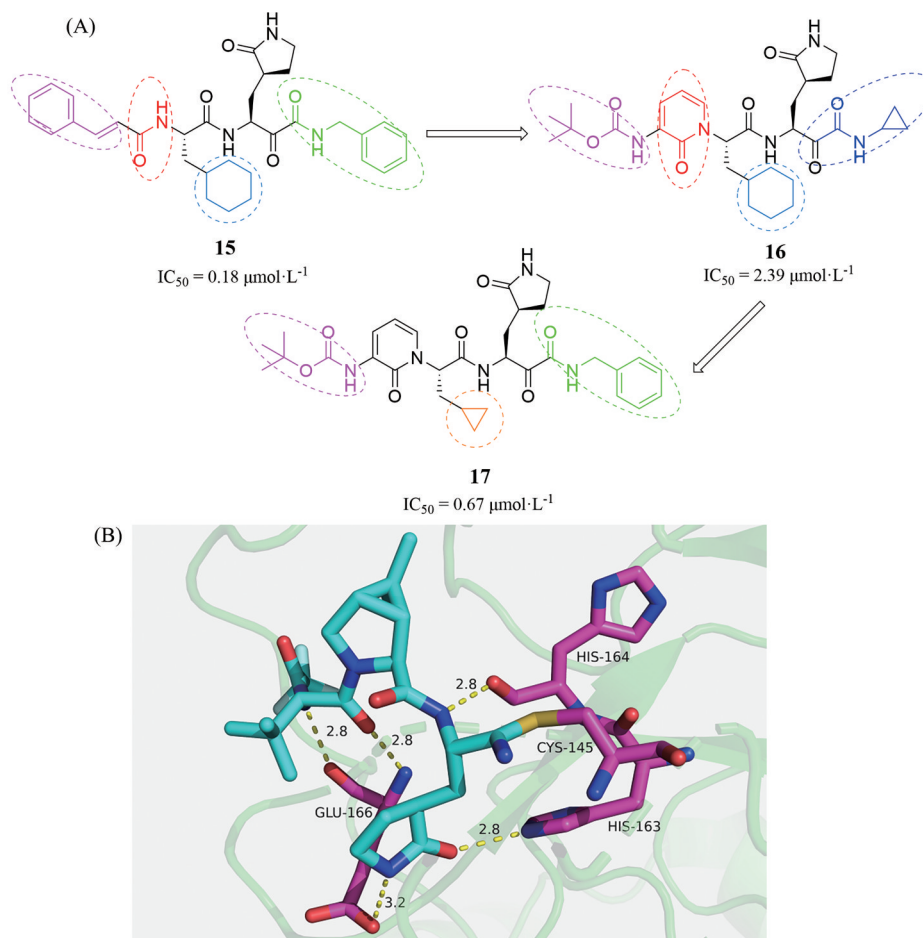


Figure 9 (A) The structures of compounds **15**-**17**. (B) X-ray structure of the complex of **17** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6Y2F). This figure was shown in Pymol 2.5

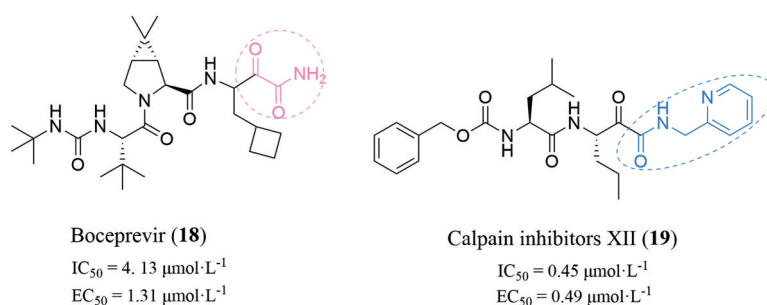


Figure 10 The structures of compounds **18** and **19**

同源性, 故当新冠疫情暴发后, 研究者发现 **23** 可以有效阻断 SARS-CoV-2 的复制^[29], 其 K_i 值为 $34.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了探究 **23** 与 M^{pro} 的结合模式, 研究者解析了其 SARS-CoV-2 M^{pro} 的复合物的共晶结构 (分辨率 1.65 \AA , 图 11B), 晶体结构分析表明, **23** 以非共价结合形式充分占据底物结合口袋, Cys145 在 P1' 位与羰基碳形成四面体半硫酮键, 同时与主链氨基酸形成多个氢键作用, P1 位置的吡咯烷的羰基和 NH 分别与 His163 和 Glu166 的侧链形成氢键, 苯并噻唑的氮原子和硫原子分别与活性位点周围的水分子和 His41 形成氢键网络; Gln189 的侧链羰基在 P2 位置与主链的酰胺基形成氢键。随后研究者采用 CPE 法测定了 **23** 对 SARS-

CoV-2 的抑制作用, 研究显示在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下 **23** 也能完全阻断病毒的增殖, 且细胞毒性较低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外 **23** 的 ADME 特征、体内药代动力学及代谢分析等结果表明 **23** 是非常值得开发的抗 SARS-CoV-2 药物的先导化合物。

1.5 以取代甲基酮为弹头的拟肽类抑制剂 2020 年, Hoffman 等^[30] 通过研究甲基酮弹头处的各种取代基对 SARS-CoV-2 抑制活性的影响, 最终发现化合物 **24** (图 12A) 强烈抑制主蛋白酶的活性, 其 K_i 值为 $0.27 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。研究者解析了其 SARS-CoV-2 M^{pro} 的复合物晶体结构 (图 12B), 羟甲基酮弹头部分的羰基碳与 M^{pro} 活性位点 Cys145 形成共价键, 生成四面体甲

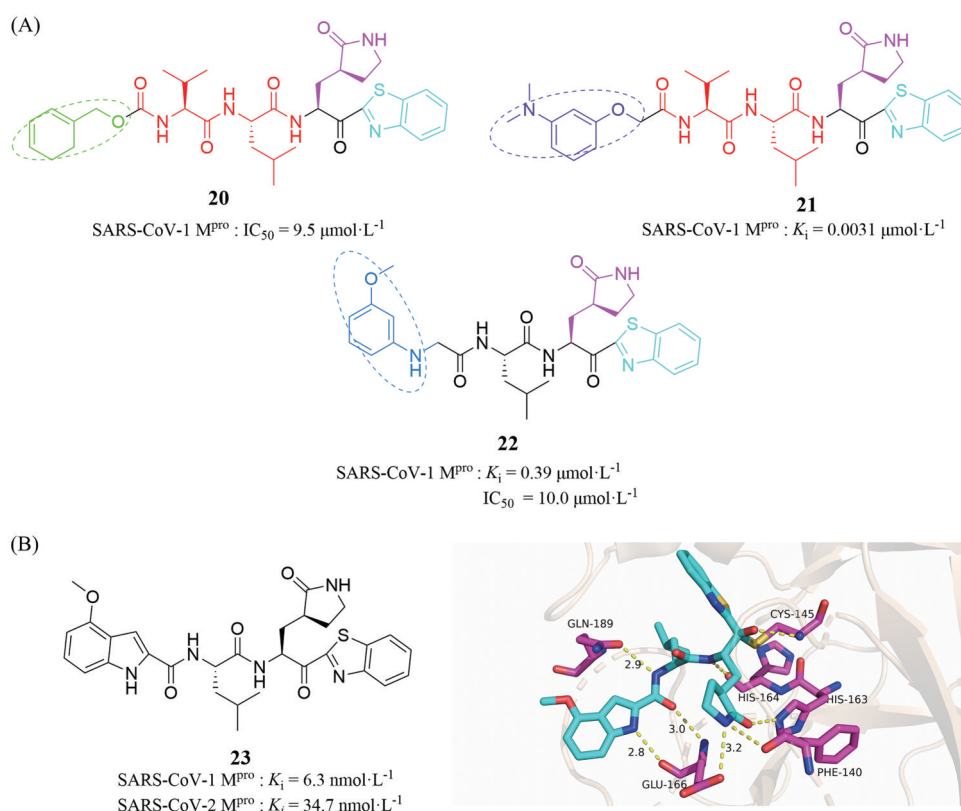


Figure 11 (A) The structures of compounds **20-22**. (B) X-ray structure of the complex of **23** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7E18). This figure was shown in Pymol 2.5

醇配合物 (键长 1.8 Å C-S)。该甲醇羟基通过水桥与 Cys145 的主链 NH 和 Gly143 的酰胺 NH 形成氢键。在 S1 口袋中, **24** 的内酰胺羰基与 His163 的侧链形成氢键, Glu166 的主链羰基和 NH 与 **24** 的吡啶片段的 NH 和 C2 羰基形成“ β -折叠型”氢键, 结构中亲酯性亮氨酸片段结合在由 Asp187、Arg188、Gln189、Met49 和 His41 残基形成的疏水 S2 口袋中并与 Gln189 侧链形成氢键。抑制剂 P1 位的 NH 与 His164 的主链羰基形成氢键。临床前实验显示 **24** 的药代动力学性质良好, 但是其渗透性和口服利用度较低, 难以口服给药。因此 Boras 等^[31]设计了 **24** 的磷酸酯前药化合物 **25**, 实验表明其溶解性更佳。因此, 目前 **24** 在临床上是以其前药形式即 **25** 对 COVID-19 住院患者进行静脉治疗。

文献^[32]报道含有 α -乙酰氧甲基酮结构的拟肽类共价抑制 **26** 和 **27** 抑制 SARS-CoV-2 主蛋白酶的 IC_{50} 分别为 1.5 和 19.5 nmol·L⁻¹, 细胞水平抗 SARS-CoV-2 活性的 EC_{50} 值分别为 21.5 和 10.1 μ mol·L⁻¹。为进一步提高其抗病毒活性, 对 **26** 和 **27** 构效关系分析并优化得到 **28** (图 13), 其 IC_{50} 值为 19.0 nmol·L⁻¹, EC_{50} 值为 0.3 μ mol·L⁻¹。此外, 结构生物学研究表明, **28** 与 Cys145 共价结合。优化得到的化合物 **28** 具有较好的抗 SARS-CoV-2 活性, 表明其具有成为候选药物的较大潜力。

1.6 以 Michael 受体为弹头的拟肽类抑制剂 Jin 等^[33]基于从头设计的研究策略发现含 Michael 受体的

化合物 **29** (图 14) 是主蛋白酶的强效抑制剂 ($k_{obs}/[I] = 11\ 300 \pm 880\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$), 并率先解析了 SARS-CoV-2 M^{pro} 与 **29** 复合物的晶体结构, 结果表明乙烯基的碳原子和 Cys145 的硫原子之间发生 Michael 加成, 形成长为 1.8 Å 的 C-S 共价键, 证实了化合物 **29** 的共价结合模式。

2 非肽类抑制剂

2.1 共价非肽类 M^{pro} 抑制剂 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 的衍生物 carmofur (卡莫氟, **30**, 图 15A) 是一种有效的抗肿瘤药物, 用于治疗胃癌、乳腺癌等^[34,35]。2020 年, Jin 等^[36]通过筛选 10 000 多个化合物, 发现 carmofur 体外抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC_{50} 值为 1.82 μ mol·L⁻¹, 在 Vero E6 细胞内抑制病毒复制的 EC_{50} 为 24.3 μ mol·L⁻¹。**30** 与 M^{pro} 的复合物晶体结构表明其结构中脂肪酸的羰基“弹头”与催化位点 Cys145 形成 C-S 共价键。此外, **30** 还通过与氨基酸残基形成大量氢键和疏水作用使化合物稳定结合在主蛋白酶的活性中心。羰基氧占据氧阴离子孔, 与 Gly143 和 Cys145 的主链酰胺形成氢键。以延伸构象出现的脂肪酸尾部则占据疏水的 S2 腔中, 与 His41、Asp187 和 Met165 的侧链形成疏水相互作用 (图 15B)。该研究也为基于 carmofur 基本结构而合理设计 COVID-19 药物提供了相关依据。

维生素 K3 是维生素 K 的人工合成形式之一, 又称甲萘醌, 可作为凝血药物和维生素补充剂使用。Wang 等^[37]通过 FRET 法从 FDA 批准的药物库中筛选发现维

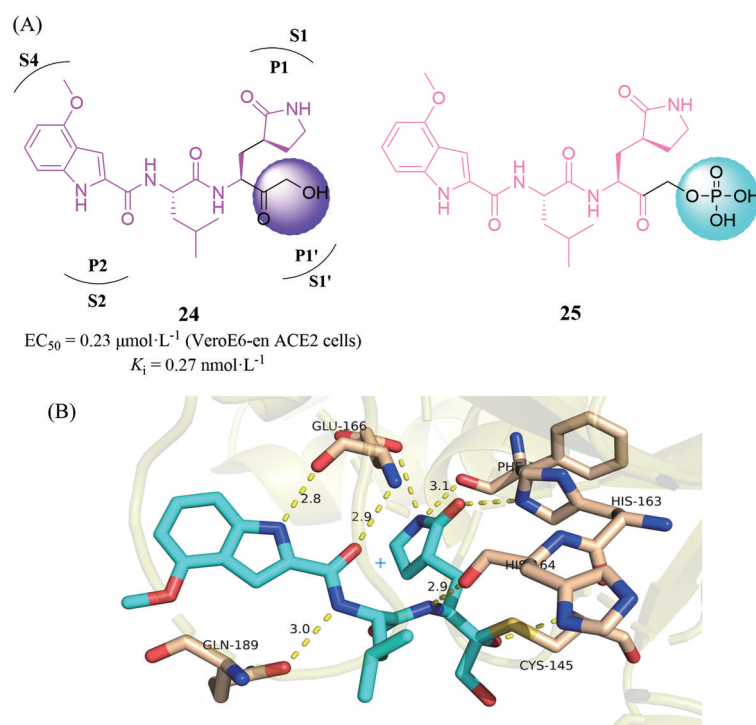


Figure 12 (A) The structures of compounds **24** and **25**. (B) Cocrystal structure of **24** and SARS CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6XHM). This figure was shown in PyMol 2.5

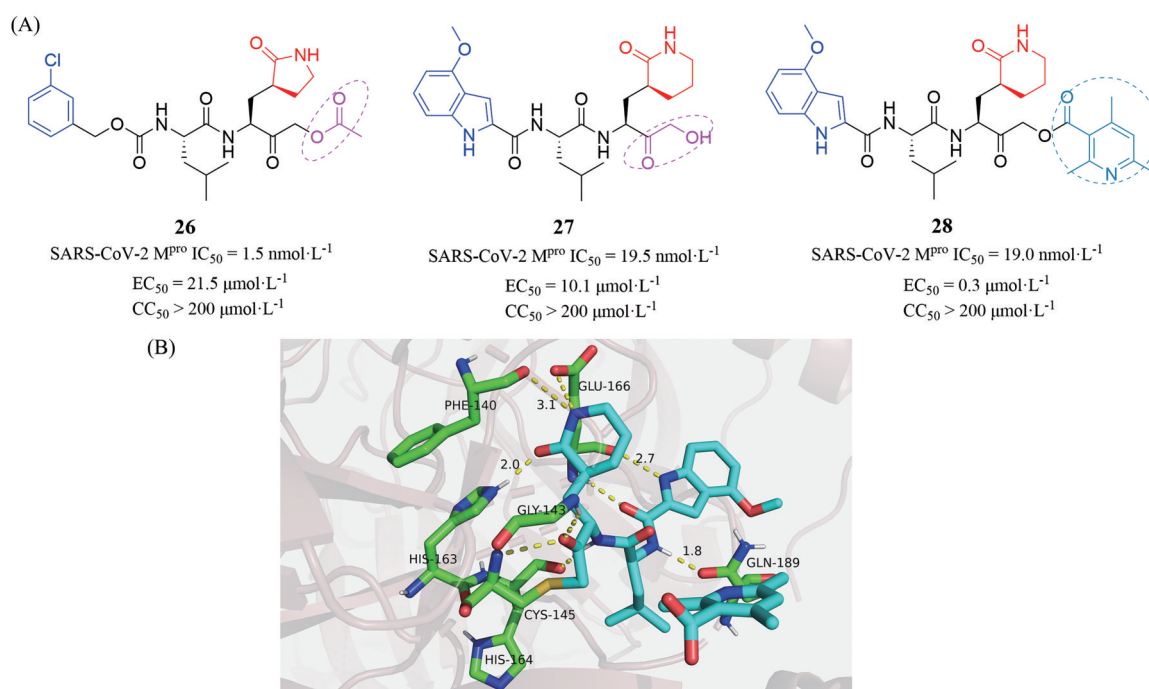


Figure 13 (A) The structures of compounds **26–28**. (B) X-ray structure of the complex of **28** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7MBI). This figure was shown in Pymol 2.5

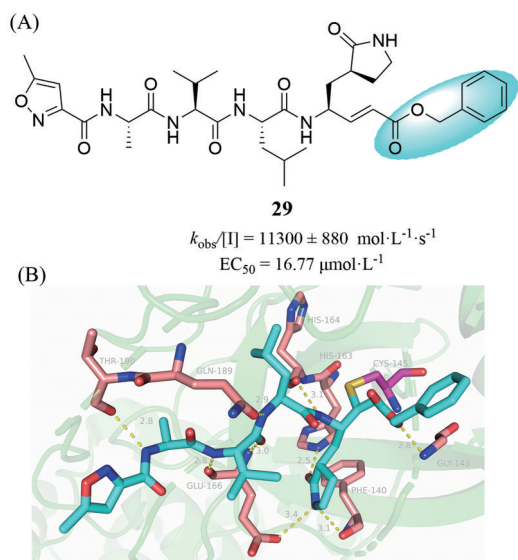


Figure 14 (A) Chemical structure of compound **29** inhibitor. (B) X-ray structure of the complex of **29** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6LU7). This figure was shown in Pymol 2.5

生素 K3 (**31**, 图 16) 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 具有显著抑制活性, IC₅₀ 为 4.78 μmol·L⁻¹。维生素 K3 通过醌结构的 Michael 加成与半胱氨酸的硫醇进行共价结合。此外还发现, 维生素 K3 的抑酶活性具有时间依赖性, 在 3 和 33 min 时, 其 IC₅₀ 值分别为 20.96 和 4.78 μmol·L⁻¹, K_i 和 K_{inact} 值分别为 112.2 μmol·L⁻¹ 和 0.305 min⁻¹, 这一实验结果证实了化合物 **31** 可以与 M^{pro} 以共价键形式结合。

基于上述结果, 研究者进一步评估了一系列维生素 K3 类似物对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制活性, 发现其类似物 5,8-二羟基-1,4-萘醌 (**32**) 的抑制活性是 **31** 的 9.8 倍, IC₅₀ 为 0.49 μmol·L⁻¹。此外, 研究者还测定了 **31** 和 **32** 对 SARS-CoV-1 M^{pro} 的抑制活性, 显示对 SARS-CoV-1 M^{pro} 呈现出剂量依赖性抑制, IC₅₀ 分别为 10.21 和 1.75 μmol·L⁻¹。因此, **31** 和 **32** 具有成为广谱抗冠状病毒药物的潜力。

2020 年, 饶子和团队^[33]通过基于结构的药物设计、计算机虚拟筛选和高通量筛选策略, 同时结合其团队前期解析的高分辨 M^{pro} 三维结构, 对 10 000 多个老药、临床药物以及天然活性产物进行筛选, 发现 eblesen (依布硒, **33**, 图 17) 对主蛋白酶有显著抑制作用。依布硒此前已用于治疗听力障碍等多种疾病的 II 期临床试验 (NCT01452607), 并表现出良好的安全性。研究显示其对 M^{pro} 的 IC₅₀ 值为 0.67 μmol·L⁻¹, 当浓度为 10 μmol·L⁻¹ 时, 该化合物在 Vero 细胞中显示出较强的抗 SARS-CoV-2 效果 (EC₅₀ = 4.67 μmol·L⁻¹)。结构生物学研究表明, eblesen 的硒原子可和 M^{pro} 的 S1' 腔的 Cys145 形成共价键。目前 eblesen 作为 SARS-CoV-2 M^{pro} 候选药物, 在美国已获批进入 II 期临床试验 (NCT04483973、NCT04484025)。同时, Huff 等^[38]以 eblesen 为先导化合物, 运用合理药物设计策略得到一系列苯并噻唑酮类化合物, 其中化合物 **34** 在 Vero E6 细胞中的抗病毒活性较 eblesen 有较大提升 (EC₅₀ = 0.8 μmol·L⁻¹)。类似

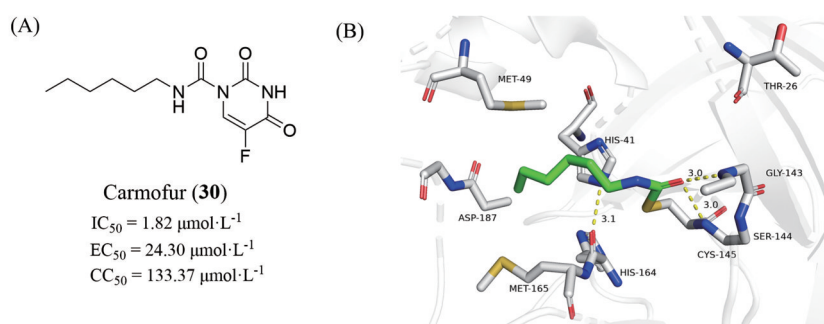


Figure 15 (A) The structure of compound **30**. (B) X-ray structure of the complex of **30** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7BUY). This figure was shown in Pymol 2.5

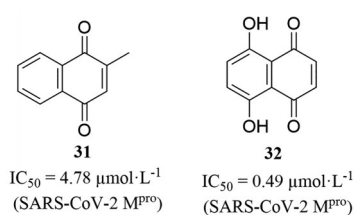


Figure 16 The structures of compounds **31** and **32**

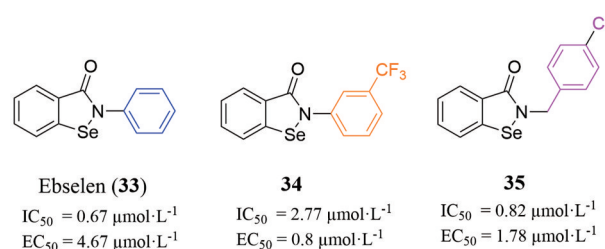


Figure 17 The structures of compounds **33–35**

的, Amporndanai 等^[39]通过对 ebselen 进行结构修饰, 得到抗病毒活性更优的化合物 **35**, 其对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC₅₀ 值为 0.82 μmol·L⁻¹, 在 Vero E6 细胞中的抗病毒活性为 1.78 μmol·L⁻¹。优化得到的化合物 **34** 和 **35** 抗 SARS-CoV-2 活性均有所提升, 因此以化合物 **33** 为先导, 值得进一步的结构修饰。

2020 年, Ma 等^[40]利用 Ugi 四组分反应合成了一系列新型非肽类共价主蛋白酶抑制剂, 涉及到一些尚未在半胱氨酸蛋白酶抑制剂中被应用的新弹头。其中化合物 **36** 和 **37** (图 18) 活性较好, 抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC₅₀ 值分别为 0.43 和 0.08 μmol·L⁻¹, 在 Vero E6 和 Caco2-hACE2 细胞中显著抑制 SARS-CoV-2 复制, EC₅₀ 值在

微摩尔至亚微摩尔范围。M^{pro} 与 **36** 的共晶结构表明结构中的吡啶环与 M^{pro} 的 S1 口袋中的 His163 形成氢键, 联苯基团伸向疏水性 S2 口袋, 并与催化碱 His41 形成 π-π 堆积作用; 另外, 吡啶环和 α-甲基苯的酰胺片段分别与 Glu166 的主链形成氢键。这个 α-甲基苯基向下翻转到底物通道的核心, 并与联苯基团形成额外的 π-π 堆积作用, 二氯乙酰胺弹头与 Cys145 形成共价键。研究人员发现的新型半胱氨酸反应弹头和高靶标特异性的共价 M^{pro} 抑制剂, 证明了二卤代和三卤代乙酰胺作为新型半胱氨酸反应弹头的可行性, 有利于进一步开发抗 SARS-CoV-2 药物。

2.2 非共价非肽类 M^{pro} 抑制剂 为了提高发现非共

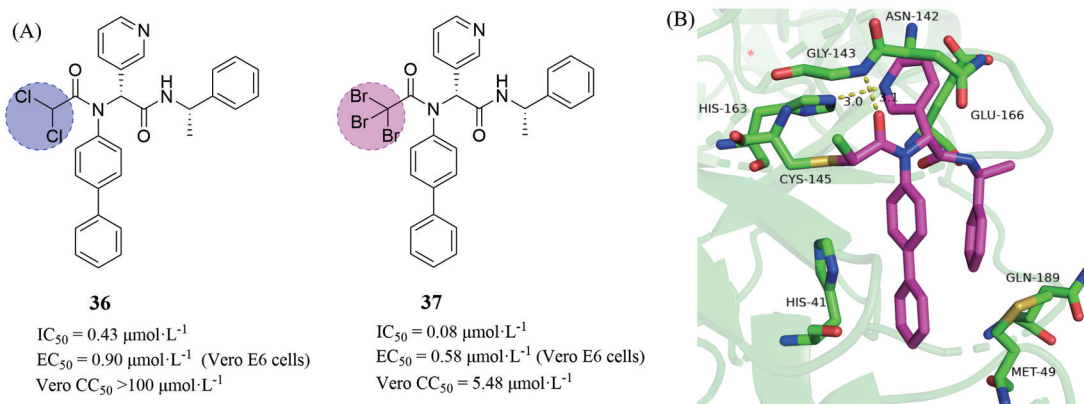


Figure 18 (A) The structures of compounds **36** and **37**. (B) X-ray structure of the complex of **36** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7RN1). This figure was shown in Pymol 2.5

价 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂的效率, 盐野义公司^[41]综合运用计算机辅助药物筛选, 分析多个主蛋白酶晶体, 构建合适的药效团模型, 采用质谱法对得分前 300 的化合物进行体外活性筛选, 得到一批苗头化合物 ($IC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。其中, 化合物 **38** (图 19) 不但对 M^{pro} 具有较好的抑酶活性 ($IC_{50} = 8.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且具有良好的 PK 特征。接着研究者以化合物 **38** 为先导, 首先对其 P1' 片段进行优化且保持与 Thr26 的氢键作用, 使其能够更好的契合 S1' 口袋, 获得了化合物 **39**。**39** 保持了良好的 PK 特征, 且抑酶活性提高了 90 倍。接着, 研究者对 **39** 的 P1 酰胺部分用杂环进行取代, 最终得到临床候选药物化合物 **40**, 其抑酶活性的 IC_{50} 值为 $13 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 细胞水平抑制病毒复制的 EC_{50} 为 $0.37 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物 **40** 与 M^{pro} 的晶体复合物结构显示, N-甲基三唑环与 His163 的侧链 NH 形成氢键, 2,4,5-三氟苯环与翻转后的 His41 形成 π - π 堆叠作用, 6-氯-2-甲基-咪唑与 Thr26 主链的 NH 形成氢键。此外, **40** 还具有较好的 PK 特征, 如高代谢稳定性 (人和大鼠肝微粒体分别为 96% 和 88%)、高口服生物利用度 ($F = 97\%$) 和大鼠体内低清除率 ($CL = 1.70 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$), 在猴和犬体内的 $t_{1/2}$ 较长, 分别为 10 和 30 h。化合物 **40** 较好的体内代谢性质, 表明其不需要与 ritonavir 联合用药, 且较高的口服生物利用度, 表明其可以开发为口服药物。此外, 体外实验显示 **40** 对 SARS-CoV-2 的各

种变异毒株、SARS-CoV-1、MERS 等冠状病毒均有较强抑制活性, 具有广谱抗病毒特性; 且对组织蛋白酶 B、L 等宿主细胞蛋白酶的抑制活性微弱 ($IC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明其对 M^{pro} 具有高选择性。综上, 化合物 **40**, 也即 ensitrelvir, 是首个非肽类、非共价、可口服的抗 SARS-CoV-2 临床候选药物。2022 年 2 月, 盐野义宣布已完成 ensitrelvir 的 IIb 期临床试验。6 月, 日本厚生劳动省理事会以“未表现临床症状改善”等为由, 延缓了其上市批准。次月, 日本政府再次延缓了其上市申请, 专家组认为需要更多的数据支持, 最终于 2022 年 11 月 22 日获得厚生劳动省的紧急监管批准。

Jacobs 等^[42]利用针对 SARS-CoV-1 M^{pro} 的 NIH 分子库 (约含 293 000 个化合物), 对其进行高通量筛选, 得到具有较好的抑制活性 ($IC_{50} = 2.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的二肽化合物 **41** (图 20A), 在此基础上, 通过 Ugi 四组分反应快速高效地发现了具有较高活性的化合物 **42** ($IC_{50} = 4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50} = 12.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。基于靶标相似性, 研究人员发现化合物 **42** 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 也具有较好的抑制活性 ($IC_{50} = 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[43]。2021 年, Kitamura 等^[44]运用基于结构的药物设计策略和 Ugi 四组分反应, 快速高效地发现了化合物 **43** (图 20B), 其抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC_{50} 为 $0.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 Vero E6 细胞中抑制 SARS-CoV-2 复制的 EC_{50} 为 $1.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, 结构生物学表明, **43** 和 SARS-CoV-2 主蛋白酶为

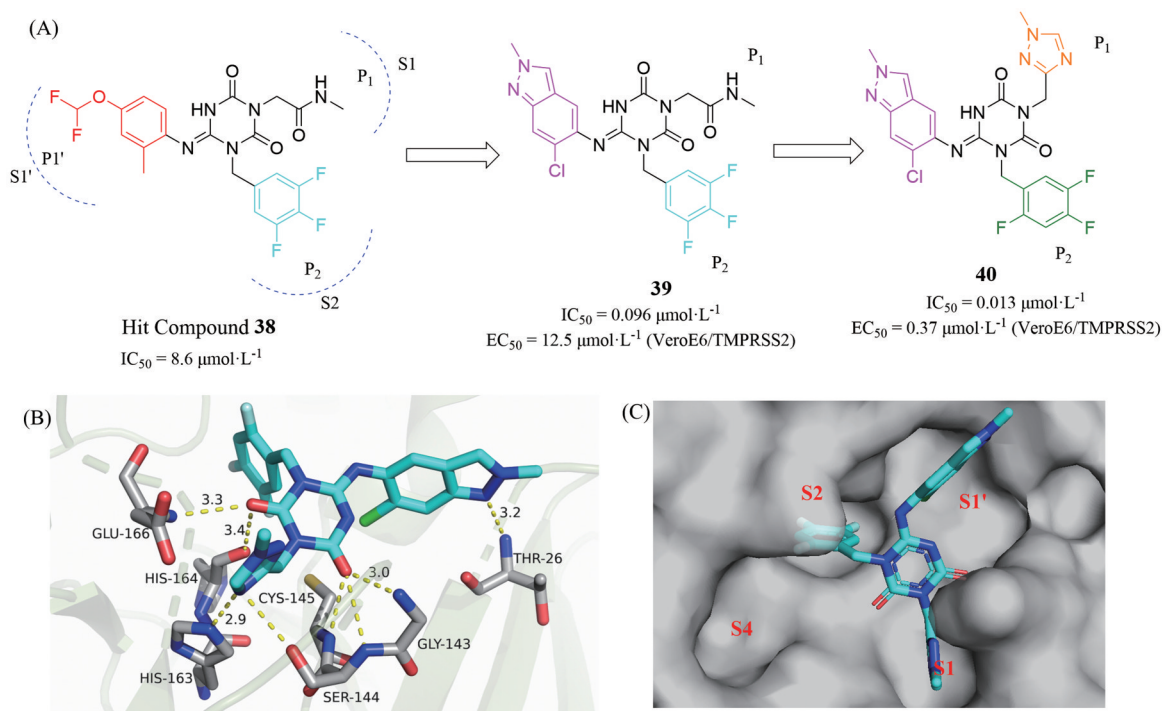


Figure 19 (A) Structural optimization and representative compounds in the development of compound **40**. (B) X-ray structure of the complex of **40** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7VU6). This figure was shown in Pymol 2.5. (C) Spatial occupancy of compound **40** at the M^{pro} active site

非共价结合,对主蛋白酶具有较好的选择性。其呋喃环部分占据 S1'腔,甲酰胺羰基与氧阴离子孔的顶端残基 Gly143 形成氢键,直接连接在呋喃酰胺部分的是 P2 联苯基团和 P1 吡啶环。P2 联苯基团伸向 S2 口袋中, P1 吡啶环占据 S1 口袋。

2021 年,研究人员基于“老药新用”的策略,通过高通量筛选从 1 900 种已安全使用的药物中发现了 masitinib (**44**,图 21),该药物是一种口服的酪氨酸激酶抑制剂,能够竞争性抑制新冠病毒主蛋白酶的活性,从而抑制新冠病毒的复制^[45]。其抑酶活性的 IC_{50} 值为 $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,细胞水平抗病毒活性为 $1.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为探究 **44** 的作用机制,研究者解析了 **44** 和 SARS-CoV-2

主蛋白酶的复合物结构,其中 **44** 吡啶环的氮原子与 S1 口袋底部的 His163 形成氢键,氨基噻唑环的氨基与 His164 形成氢键,疏水性甲基苯环占据 S2 口袋,与 His41 形成了 $\pi-\pi$ 堆积作用,苯甲酰胺基团远离 S4 口袋。这表明 **44** 是一个非共价的抑制剂,且能较好地契合主蛋白酶的活性位点,值得进一步修饰。

Kneller 等^[46]通过高通量虚拟筛选发现了哌嗪类 SARS-CoV-2 主蛋白酶非共价抑制剂化合物 **45** (图 22A),其 IC_{50} 值为 $0.68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但未测定其细胞活性和毒性。 M^{pro} 与 **45** 的共晶结构显示 **45** 以非共价形式结合到 M^{pro} 的活性位点,并占据 S1 和 S2 亚位点。该配体的尿嘧啶 P1 基团占据 S1 亚位点,连接在 P1 尿嘧啶

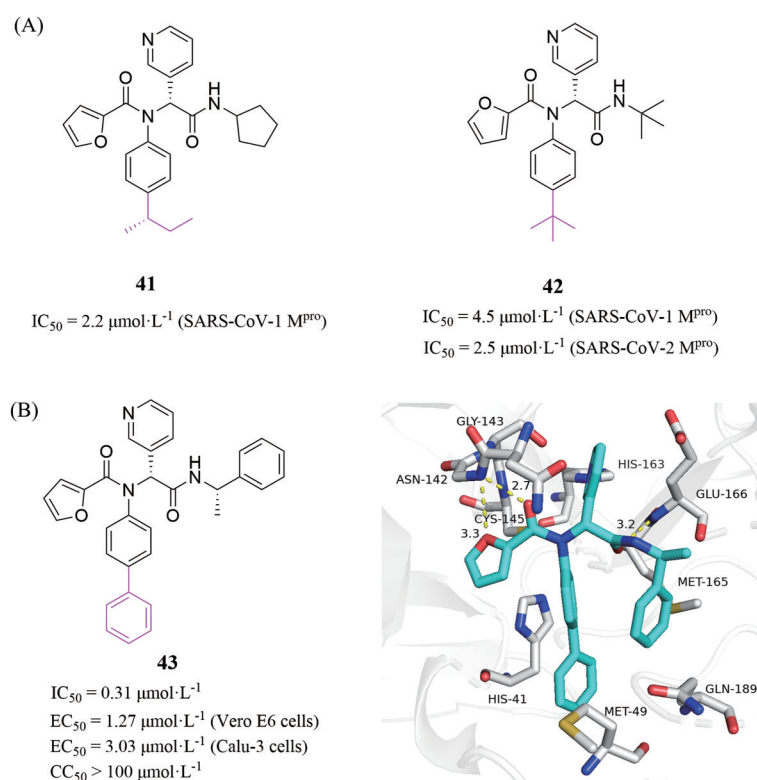


Figure 20 (A) The structures of compounds **41** and **42**. (B) Chemical structure of the non-covalent inhibitor **43** and X-ray structure of the complex of **43** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7KX5). This figure was shown in Pymol 2.5

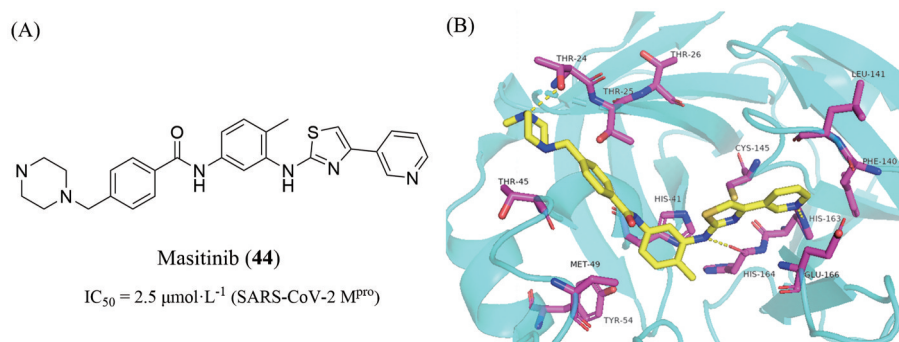


Figure 21 (A) The structure of compound **44**. (B) X-ray structure of the complex of **44** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7JU7). This figure was shown in Pymol 2.5

和中心哌嗪 linker 之间的羰基与 Gly143 形成直接的氢键作用, 芳香族二氯苯 P2 基团与 His41 产生 π - π 堆积作用。随后, 研究者利用计算机模拟契合到 M^{pro} 的结构中, 对化合物 **45** 的骨架进行修饰。通过改变苯环 3、4 和 5 位的取代基对 P2 基团进行了广泛的修饰, 发现 **46** 和 **47** (图 22B) 抑酶活性较好, 对 M^{pro} 的 IC_{50} 值均为 $0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此, 化合物 **45** 是一个良好的先导化合物, 值得进一步进行结构修饰。

本团队^[47]基于化合物 **45** 与主蛋白酶的复合物晶体结构, 运用多位点结合以及优势片段组装策略, 引入现有高活性 M^{pro} 抑制剂在各结合口袋的优势基团, 使其同时占据活性中心的多个亚位点, 提高配体与 M^{pro} 的亲合力。首先在哌嗪环上引入酰胺基团, 连接优势取代基以占据 S4 口袋, 筛选得到化合物 **48** (图 23), 对 M^{pro} 抑制活性较好, IC_{50} 值为 $0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但由于该化合物透膜性差, 导致细胞活性较弱 ($EC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。为了改善其透膜性, 将占据 S1 腔的乳酸片段用结构多样的优势片段取代, 通过靶标及细胞活性测试、靶标特异性实验、结合模式确证以及初步的成药性评价, 最终发现化合物 **49** 有较强的抑酶活性 ($IC_{50} = 0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 细胞水平抑制 SARS-CoV-2 的 EC_{50} 值为 $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是上市药物瑞德西韦的 3 倍左右, 且细胞毒性极低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。该化合物对 SARS-CoV-2 M^{pro} 具有良好的靶标选择性 (对人组织蛋白酶 B、F、K 和 L 以及半胱天冬酶 3 的 $IC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **49** 与 M^{pro} 共晶结构显示, 该分子以非共价形式稳定结合在 M^{pro} 催化位点。新引入的酰基噻吩甲胺侧链可额外占据主蛋白酶活性中心的 S3、S4 亚位点, 与关键氨基酸 Glu166 的主链形成氢键; S1 的吡啶环保留了与 His163 的关键作用力, 同时有助于提高透膜性。初步成药性研究显示 **49** 在大鼠体内半衰期为 1.73 h, 口服生物利用度 $F =$

7.2%。以化合物 **49** 为代表的非共价非肽类 M^{pro} 抑制剂展现出了优异的抗 SARS-CoV-2 活性及高靶标选择性, 结构生物学信息为进一步的结构优化奠定基础。

Zhang 等^[48]基于已建立的荧光共振能量转移实验分析发现了 9,10-二氢菲类非共价 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂, 尤其以化合物 **50** 和 **51** 的抑酶活性最强, IC_{50} 值分别为 1.55 和 $1.81 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 24)。进一步的酶动力学分析表明, 它们通过混合动力学方式剂量依赖性地抑制 M^{pro} 。分子对接模拟揭示了 **50** 在二聚体界面和靶标的底物结合腔中的结合模式。此外, **50** 在胃肠道、人血浆和人肝微粒体中表现较好的代谢稳定性, 表明该化合物具有开发为口服药物的潜力。

2022 年, 西湖大学基于 DNA 编码化合物库的筛选技术 (DEL) 发现了一类强效特异性 SARS-CoV-2 M^{pro} 非共价抑制剂^[49]。其中化合物 **52** (图 25) 在体外抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 IC_{50} 值为 $72 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 在 A549-hACE2 细胞中抑制 SARS-CoV-2 的 EC_{50} 值为 $12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **52** 对 SARS-CoV-2 突变株也显示出良好活性, 在 Caco-2 和 A549-TMPRSS2-ACE2 细胞系统中, 化合物 **52** 抑制 Delta 变异株的 EC_{50} 分别为 21 和 $10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在 Caco-2 细胞抗 Omicron 变异株的 EC_{50} 为 $24 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 略优于 nirmatrelvir。

由于 SARS-CoV-1、MERS-CoV 与 SARS-CoV-2 的 M^{pro} 之间分别具有 96% 和 50% 的序列相似性, 因此对 **52** 进行了 SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 M^{pro} 抑制活性测试, IC_{50} 分别为 $55 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在 Calu-3 细胞水平上抑制 SARS-CoV 和 MERS-CoV 活性的 EC_{50} 分别为 19 和 $53 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, **52** 与 3 种冠状病毒的晶体复合物非常相似, 表明化合物 **52** 是一个广谱冠状病毒 M^{pro} 抑制剂。 **52** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结果显示, 其异噻啉占据 S1 空腔, 氮原子和羰基分别与

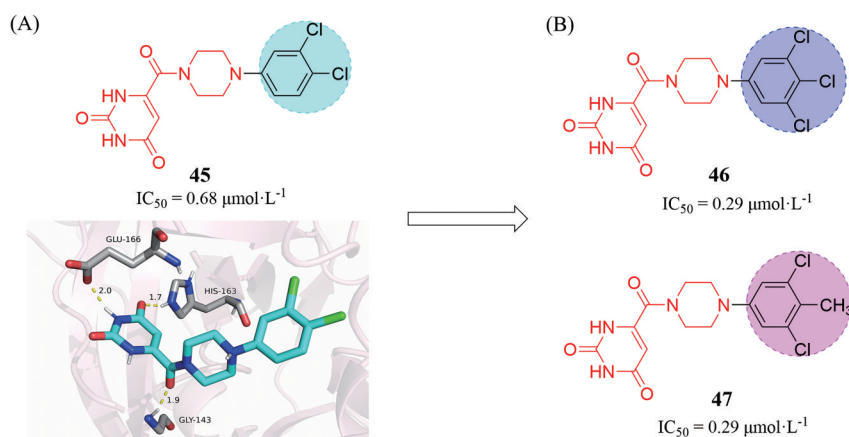


Figure 22 (A) The structure of compounds **45** and X-ray structure of the complex of **45** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7N8C). This figure was shown in Pymol 2.5. (B) The structures of compounds **46** and **47**

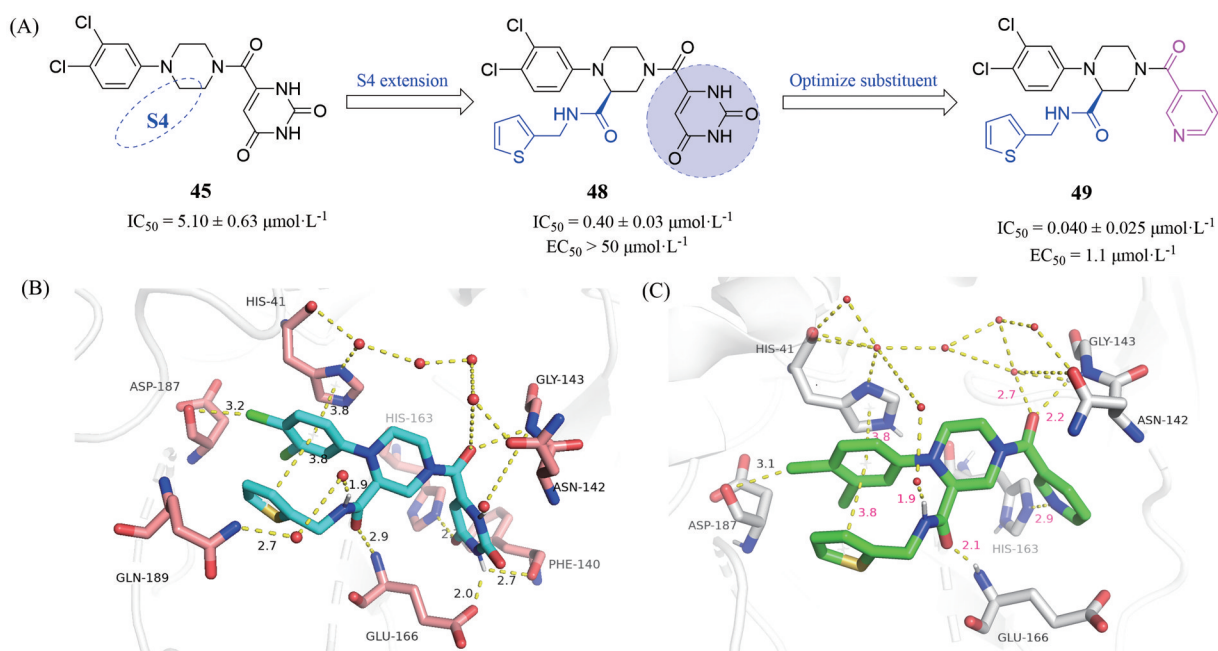


Figure 23 (A) Structural optimization and representative compounds in the development of compound 49. (B) co-crystal structure of 48 with SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 8ACD). (C) co-crystal structure of 49 with SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 8ACL)

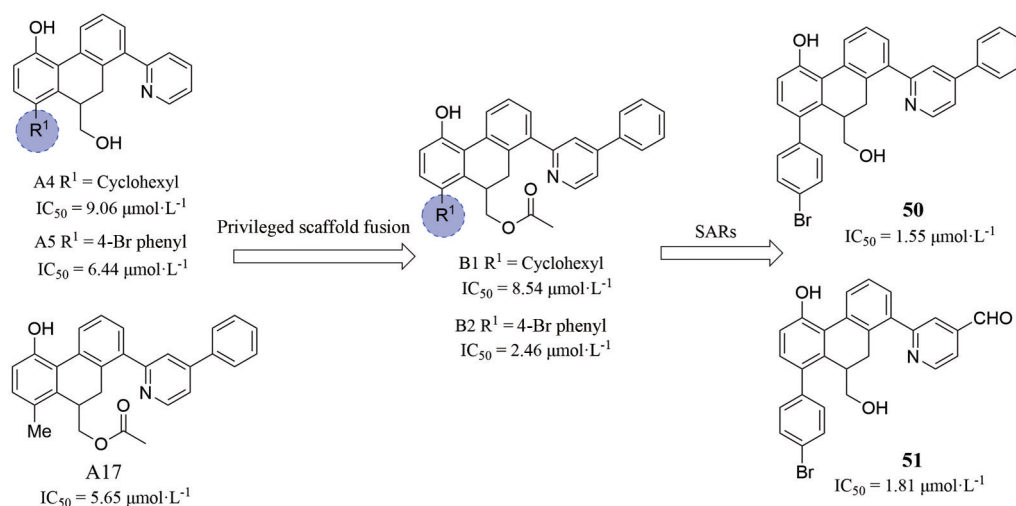


Figure 24 Structural optimization and representative compounds in the development of compounds 50 and 51

His163和Asn142的侧链形成氢键;苯环上的硝基和溴分别占据S2和S4空腔,羰基氧与Glu166的主链酰胺形成氢键;苯环和Gln189侧链的氨基- π 相互作用有助于提高52的结合力,硝基的强吸电子能力使芳香环带正电荷,从而增强了氨基- π 相互作用,也增加了溴和Thr190羰基之间的卤键强度。研究者以小鼠模型评价了化合物52体内抗SARS-CoV-2的活性,结果显示,在K18-hACE2转基因小鼠实验中,其活性与nirmatrelvir相当。但药代动力学研究表明,52需要与CYP3A4抑制剂利托那韦联合使用。目前,化合物52已完成临床前研究,2022年9月6日获国家药品审评中心批准正式进入临床试验。

3 天然产物类抑制剂

中药在治疗新冠感染当中起着至关重要的作用。由于中药的安全性和在预防中的独特作用,在此次疫情中对患者采用中西医结合的方式,能够缩短患者的病程和减少重症的发生率^[50-52]。然而,人们对于中药活性成分是如何抑制新冠病毒的分子机制并不了解。紫草素属于萘醌类化合物,是中药紫草根的主要活性成分,具有抗病毒、抗菌、抗炎和抗肿瘤的作用^[53,54]。靶标活性测试表明紫草素抑制主蛋白酶的 IC_{50} 为 $15.75 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[33]。2020, SARS-CoV-2主蛋白酶与紫草素复合物晶体结构被报道^[55],揭示了中药活性成分紫草素(53,图26)抑制新冠病毒M^{pro}的分子机制,发现紫

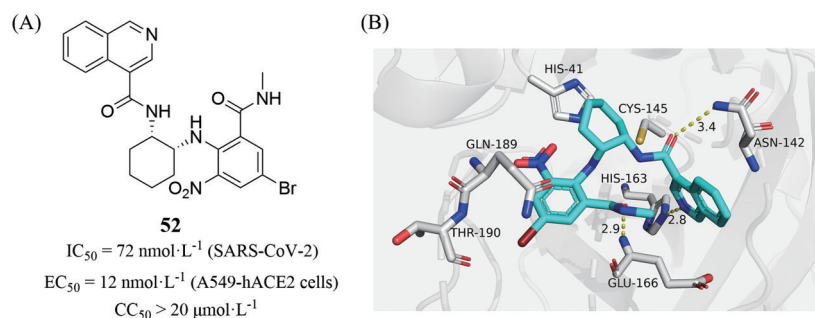


Figure 25 (A) The structure of compound **52**. (B) X-ray structure of the complex of **52** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7EN8). This figure was shown in Pymol 2.5

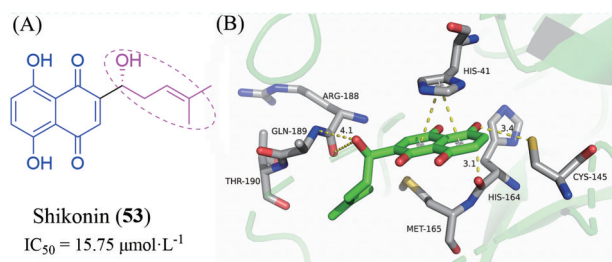


Figure 26 (A) Chemical structure of the non-covalent inhibitor shikonin (**53**). (B) X-ray structure of the complex of **53** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7CA8). This figure was shown in Pymol 2.5

草素以非共价形式结合在活性中心的 S1、S2 和 S3 口袋中, 其萘醌基团位于催化活性位点 His41 和 Cys145 之间, 与 His41 形成 π - π 相互作用, 紫草素尾部异己烯侧链的羟基和甲基分别与 S3 位的 Arg188 和 Gln189 形成氢键相互作用。

2020年, 许叶春课题组^[56]报道了黄芩苷和黄芩素作为 SARS-CoV-2 主蛋白酶抑制剂。该课题组首先利用 FRET 法测定了黄芩水提取物对新冠病毒 M^{pro} 的抑制活性, 发现其中两个组分在 $10.0 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时具有显著抑制作用, 而这两个组分中主要化合物分别为黄芩苷 (**54**, 图 27) 和黄芩素 (**55**)。进一步测定黄芩苷和黄芩素单体抑制 SARS-CoV-2 主蛋白酶的 IC_{50} 分别为 $6.41 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.94 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时 ITC 和 HRMS 确证了黄芩苷和

黄芩素以非共价形式特异性地与 M^{pro} 结合。随后又解析了 **55** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 复合物的晶体结构, 揭示了其独特的作用模式。共晶结构中的 3 个酚羟基分别与 Leu141、Gly143 的主链和 Ser144、His163 的侧链形成了多重氢键, 与 Gln189、Arg188、Met49、Cys44、His41 等残基形成了疏水相互作用。**55** 作用于主蛋白酶底物结合口袋中的核心位置, 并与两个催化残基、氧离子空穴、Glu166 和 S1、S2 位点等相互作用, 而这些都是识别底物及类肽抑制剂的关键残基和位点。细胞水平抗病毒结果显示, **54** 和 **55** 对 SARS-CoV-2 的复制均呈剂量依赖性抑制, EC_{50} 分别为 10.27 和 $1.69 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。活性数据表明 **55** 具有更好的抗 SARS-CoV-2 活性, 是一个较有潜力的先导化合物。

受黄芩苷和黄芩素类新冠主蛋白酶抑制剂研究的启发^[56], 2021, 研究者^[57]对黄酮类天然产物进行筛选后发现了两个 SARS-CoV-2 主蛋白酶的强效小分子抑制剂——杨梅素 (**56**, 图 28) 和二氢杨梅素 (**57**), IC_{50} 分别为 0.63 和 $1.14 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。SARS-CoV-2 M^{pro} 与杨梅素复合物的晶体结构表明 (图 29), Cys145 的巯基和邻苯三酚基团的 C6 原子形成 C-S 共价键, 羟基与 Thr26 的主链之间形成氢键, 色酮部分与 Glu189 和 His164 的侧链形成氢键。

尽管杨梅素和黄芩素均是 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂, 且它们都具有类黄酮骨架和邻苯三酚基团, 但它们

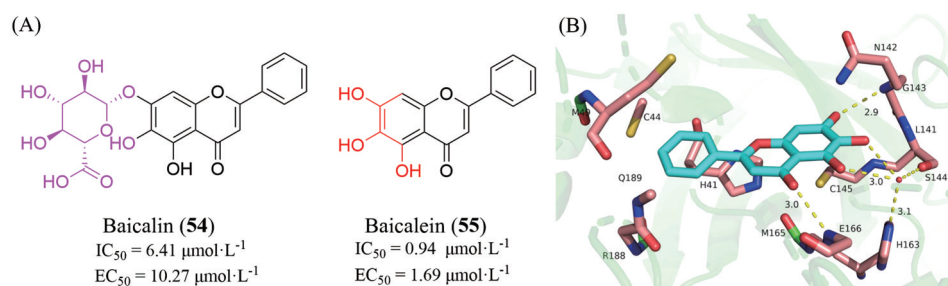


Figure 27 (A) The structures of compounds **54** and **55**. (B) X-ray structure of the complex of **55** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 6M2N). This figure was shown in Pymol 2.5

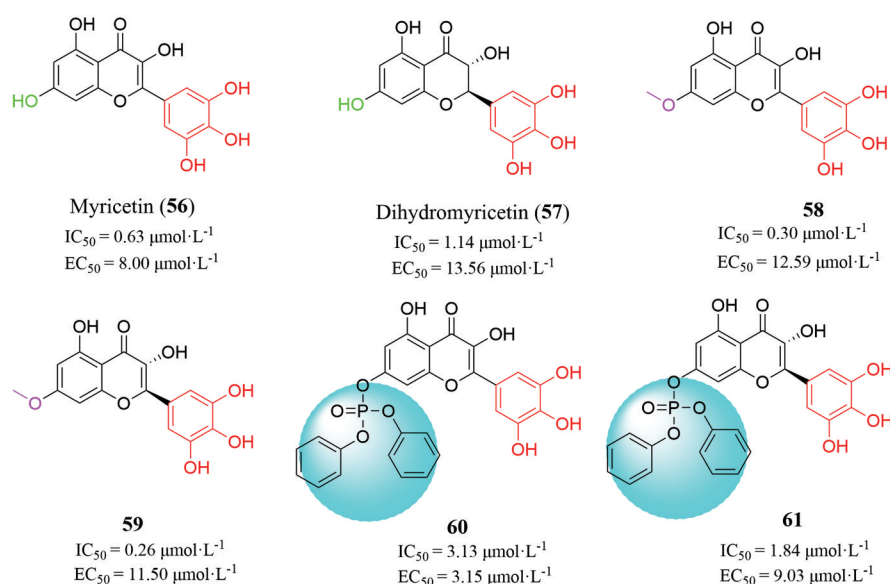


Figure 28 The structures of compounds 56-61

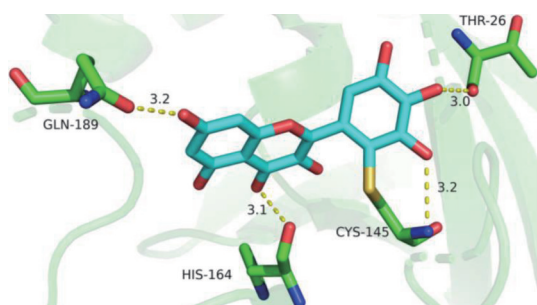


Figure 29 X-ray structure of the complex of 56 and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7DPP). This figure was shown in Pymol 2.5

与蛋白酶结合的相关作用模式和结构决定因素却迥异。具体来说,黄芩素是非共价抑制剂,而杨梅素与催化位点的 Cys145 建立 C-S 共价键。黄芩素的邻苯三酚基团与 Leu141、Gly143 的主链以及 Ser144 的侧链形成多个氢键,固定了氧阴离子环的构象,其用于稳定蛋白质水解反应的四面体过渡状态。而杨梅素的邻苯三酚基团作为亲电体与 Cys145 共价结合。基于杨梅素的结合模式,研究者^[57]设计了一系列杨梅素衍生物 58~61,其中 59 具有较好的抗病毒活性,且口服生物利用度达 18.1%,具有作为口服药物开发的潜力。

靛红,又名 2,3-吡啶酮或二氢吡啶-2,3-二酮,是一种从菘蓝属植物中提取出的常见天然小分子化合物,在抗菌、抗肿瘤、抗病毒、抗结核等方面具有重要药理活性^[58,59]。2006 年, Zhou 等^[60]运用基于靶标的药物设计策略合成一系列靛红衍生物,其中,化合物 5f (62, 图 30) 抑制 SARS-CoV-1 主蛋白酶的 IC₅₀ 为 0.37 μmol·L⁻¹,且其对木瓜蛋白酶、糜蛋白酶和胰蛋白酶均无抑制作用,选择性较高。由于 SARS-CoV-2 与 SARS-CoV-1 的

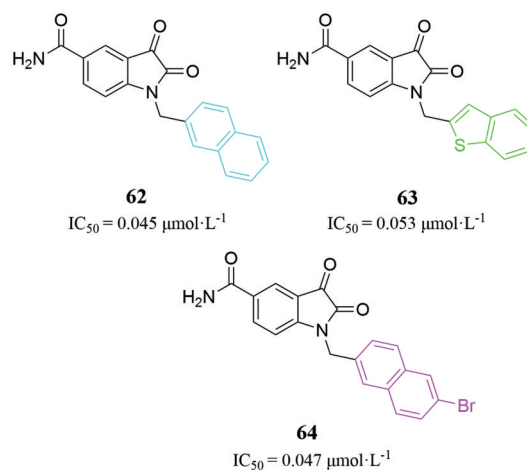


Figure 30 The structures of compounds 62-64

M^{pro} 有 96% 序列同源性,受此启发, Liu 等^[61]发现 62 抑制 SARS-CoV-2 主蛋白酶的 IC₅₀ 为 0.045 μmol·L⁻¹。为进一步提高其抗病毒活性,研究者又根据靶标结构设计合成了一系列新化合物,其中化合物 63 和 64 活性较好,其 IC₅₀ 分别为 0.053 和 0.047 μmol·L⁻¹。化合物 62~64 的抑酶活性均达到了纳摩尔级别,但靛红类化合物均存在细胞毒性大等问题,因此,有待进一步进行改造以降低细胞毒性。

冬凌草甲素是冬凌草的主要成分,具有抗肿瘤、抗炎、神经保护及抗菌等多种药理活性^[62,63],临床应用广泛。2022 年, Zhong 等^[64] 从中草药小分子库中发现冬凌草甲素 (65, 图 31) 可直接抑制 SARS-CoV-2 M^{pro} 的活性,其 IC₅₀ 为 2.16 μmol·L⁻¹。主蛋白酶与 65 复合物

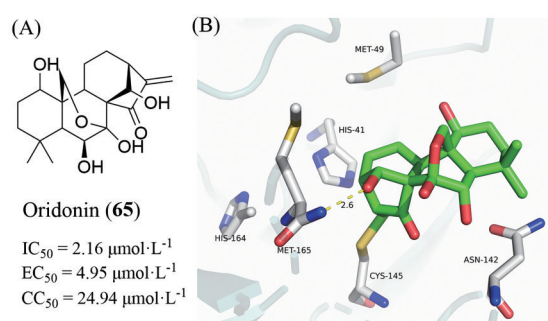


Figure 31 (A) The structure of compounds **65**. (B) X-ray structure of the complex of **65** and SARS-CoV-2 M^{pro} (PDB code: 7VIC). This figure was shown in Pymol 2.5

的晶体结构表明其与主蛋白酶的 Cys145 发生亲核加成反应, Cys145 上的巯基作为亲核基团与冬凌草甲素上的 α, β -不饱和烯炔发生化学反应, 形成 C-S 共价键, 以此导致主蛋白酶失活, 从而达到抑制病毒的目的。

4 总结与展望

新冠疫情自暴发以来, 肆虐全球, 虽然已批准多种疫苗上市, 然而因为病毒变异及疫苗保护效力等原因, 疫情形势依然十分严峻, 因此, 迫切需要开发出抗新冠病毒药物以应对目前及未来可能暴发的疫情^[65]。其中, 小分子口服药物具有无可比拟的优势, 被寄予厚望。

SARS-CoV-2 的复制是一个复杂、连续多步的过程, 其中发挥重要作用的蛋白酶 M^{pro}, 是治疗冠状病毒感染的关键药物靶标。迄今为止, 科学家们已解析了数百个小分子与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的晶体结构, 为基于靶标的精准药物设计提供了丰富的信息。

与传统的非共价抑制剂相比, 共价抑制剂具有延长药效、提高活性以及降低给药剂量的显著优势。因此, 可以预见共价结合将成为 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制剂的重要方向。当前, 向非共价 M^{pro} 抑制剂引入弹头的模式非常成功, 运用此策略实现的共价抑制剂大多是靶向催化位点的半胱氨酸等残基, 在此情况下不容忽视弹头的非键相互作用。此外, 由于已有非共价抑制剂为了与催化活性位点形成较强的相互作用, 在空间上一般已与活性位点形成良好的匹配, 留给额外引入的共价弹头的化学空间往往不够, 从而导致非共价抑制剂向共价抑制剂转变的结构改造程度和难度激增。因此, “弹头”优先的基于共价片段的结构进化策略^[66]以及靶向非催化位点残基的共价修饰、新“弹头”的开发将成为 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂设计的新热点。

另外, 不同类型 M^{pro} 非共价抑制剂中, 吡啶、稠环吡啶和含氮杂环等结构出现频次较高, 属于 M^{pro} 抑制剂的“优势结构”及“高效药效团元素”。因此, 基于这些优势片段结构, 构建基于模块化反应微量合成的化合

物库^[67]或基于合成方法学的自建化合物库^[68] (synthetic methodology-based library) 等技术, 将极大地提高发现高活性 M^{pro} 抑制剂的效率。

高效抗耐药性将成为未来 SARS-CoV-2 M^{pro} 的抑制剂的重要指标。交叉融通与整合创新是解决药物发现中新科学问题的“金钥匙”^[69-72], 例如, 多靶标药物设计、“底物包膜”理念、蛋白降解 (PROTAC) 等将成为设计抗耐药性 M^{pro} 抑制剂重要策略。

作者贡献: 杨婉玲和程玉森是文章框架的构思者并负责内容的撰写和文献整理; 高升华、刘新泳和展鹏指导论文写作; 宋乐天 and 叶冰对论文进行了检查和修改。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- [1] Su S, Wong G, Shi W, et al. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses [J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24: 490-502.
- [2] Mei M, Tan X. Current strategies of antiviral drug discovery for COVID-19 [J]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 671263.
- [3] Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579: 270-273.
- [4] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 141-154.
- [5] World Health Organization. WHO Coronavirus (COVID-19) [EB/OL]. <https://covid19.who.int/> (accessed December 15, 2022).
- [6] Stein SR, Ramelli SC, Grazioli A, et al. SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy [J]. *Nature*. 2022, 612: 758-763.
- [7] Menni C, Valdes AM, Polidori L, et al. Symptom prevalence, duration, and risk of hospital admission in individuals infected with SARS-CoV-2 during periods of omicron and delta variant dominance: a prospective observational study from the ZOE COVID study [J]. *Lancet*, 2022, 399: 1618-1624.
- [8] Gil C, Ginex T, Maestro I, et al. COVID-19: drug targets and potential treatments [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12359-12386.
- [9] Liu AL, Du GH. Drug discovery for COVID-19 treatment based on drug targets [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 1073-1080.
- [10] Berry M, Fielding BC, Gamielidien J. Potential broad spectrum inhibitors of the coronavirus 3CLpro: a virtual screening and structure-based drug design study [J]. *Viruses*, 2015, 7: 6642-6660.
- [11] Yang H, Yang M, Ding Y, et al. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100: 13190-13195.
- [12] Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, et al. Structural plasticity of SARS-CoV-2 3CL M^{pro} active site cavity revealed by room

- temperature X-ray crystallography [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 3202.
- [13] Zhang YZ, Holmes EC. A genomic perspective on the origin and emergence of SARS-CoV-2 [J]. *Cell*, 2020, 181: 223-227.
- [14] Liu Y, Ming W, Li CZ, et al. Advances in peptidomimetic inhibitors of coronavirus main protease [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1977-1990.
- [15] Ma C, Sacco MD, Hurst B, et al. Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease [J]. *Cell Res*, 2020, 30: 678-692.
- [16] Dai W, Zhang B, Jiang XM, et al. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease [J]. *Science*, 2020, 368: 1331-1335.
- [17] Frontier biopharmaceutical industry. Frontier biology and Shanghai institute of pharmaceutical research, Chinese academy of sciences have reached a project cooperation on the development of new drugs against 2019-nCoV [EB/OL]. http://www.phirda.com/artilce_21204.html.
- [18] Frontier biopharmaceutical industry. Voluntary disclosure of announcement on the approval of FB2001 for aerosol inhalation for phase II and III clinical trials [EB/OL]. http://vip.stock.finance.sina.com.cn/corp/view/vCB_AllBulletinDetail.php?stockid=688221&id=8683956
- [19] Sacco MD, Ma C, Lagarias P, et al. Structure and inhibition of the SARS-CoV-2 main protease reveal strategy for developing dual inhibitors against M^{pro} and cathepsin L [J]. *Sci Adv*, 2020, 6: eabe0751.
- [20] Qiao J, Li YS, Zeng R, et al. SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors with antiviral activity in a transgenic mouse model [J]. *Science*, 2021, 371: 1374-1378.
- [21] Martin YC. A bioavailability score [J]. *J Med Chem*, 2005, 48: 3164-3170.
- [22] Food and Drug Administration [EB/OL]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/coronavirus-covid-19update-fda-authorizes-first-oral-antiviral-treatment-covid-19>.
- [23] Pfizer [EB/OL]. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-shares-top-line-results-phase-23-epic-pep-study>.
- [24] Gahlawat A, Kumar N, Kumar R, et al. Structure-based virtual screening to discover potential lead molecules for the SARS-CoV-2 main protease [J]. *J Chem Inf Model*, 2020, 60: 5781-5793.
- [25] Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, et al. An oral SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor clinical candidate for the treatment of COVID-19 [J]. *Science*, 2021, 374: 1586-1593.
- [26] Li J, Lin C, Zhou X, et al. Structural basis of the main proteases of coronavirus bound to drug candidate PF-07321332 [J]. *J Virol*, 2022, 96: e0201321.
- [27] Zhang L, Lin D, Sun X, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors [J]. *Science*, 2020, 368: 409-412.
- [28] Thanigaimalai P, Konno S, Yamamoto T, et al. Development of potent dipeptide-type SARS-CoV 3CL protease inhibitors with novel P3 scaffolds: design, synthesis, biological evaluation, and docking studies [J]. *Eur J Med Chem*, 2013, 68: 372-384.
- [29] Konno S, Kobayashi K, Senda M, et al. 3CL protease inhibitors with an electrophilic arylketone moiety as anti-SARS-CoV-2 agents [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 2926-2939.
- [30] Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, et al. Discovery of ketone-based covalent inhibitors of coronavirus 3CL proteases for the potential therapeutic treatment of COVID-19 [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 12725-12747.
- [31] Boras B, Jones RM, Anson BJ, et al. Discovery of a novel inhibitor of coronavirus 3CL protease for the potential treatment of COVID-19 [J]. *bioRxiv*, 2021. DOI: 10.1101/2020.09.12.293498.
- [32] Bai B, Belovodskiy A, Hena M, et al. Peptidomimetic α -acyloxy-methylketone warheads with six-membered lactam P1 glutamine mimic: SARS-CoV-2 3CL protease inhibition, coronavirus antiviral activity, and *in vitro* biological stability [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 2905-2925.
- [33] Jin Z, Du X, Xu Y, et al. Structure of M^{pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors [J]. *Nature*, 2020, 582: 289-293.
- [34] Morimoto K, Koh M. Postoperative adjuvant use of carmofur for early breast cancer [J]. *Osaka City Med J*, 2003, 49: 77-83.
- [35] Gröhn P, Heinonen E, Kumpulainen E, et al. Oral carmofur in advanced gastrointestinal cancer [J]. *Am J Clin Oncol*, 1990, 13: 477-479.
- [36] Jin Z, Zhao Y, Sun Y, et al. Structural basis for the inhibition of SARS-CoV-2 main protease by antineoplastic drug carmofur [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2020, 27: 529-532.
- [37] Wang R, Hu Q, Wang H, et al. Identification of vitamin K3 and its analogues as covalent inhibitors of SARS-CoV-2 3CL^{pro} [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 183: 182-192.
- [38] Huff S, Kummetha IR, Tiwari SK, et al. Discovery and mechanism of SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 2866-2879.
- [39] Ampornnanai K, Meng X, Shang W, et al. Inhibition mechanism of SARS-CoV-2 main protease by ebselen and its derivatives [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 3061.
- [40] Ma C, Xia Z, Sacco MD, et al. Discovery of di- and trihaloacetamides as covalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors with high target specificity [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 20697-20709.
- [41] Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, et al. Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19 [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 6499-6512.
- [42] Jacobs J, Grum-Tokars V, Zhou Y, et al. Discovery, synthesis, and structure-based optimization of a series of *N*-(tert-butyl)-2-(*N*-arylamido)-2-(pyridin-3-yl) acetamides (ML188) as potent noncovalent small molecule inhibitors of the severe acute respira-

- tory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease [J]. J Med Chem, 2013, 56: 534-546.
- [43] Lockbaum GJ, Reyes AC, Lee JM, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with the non-covalent inhibitor ML188 [J]. Viruses, 2021, 13: 174.
- [44] Kitamura N, Sacco MD, Ma C, et al. Expedited approach toward the rational design of noncovalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors [J]. J Med Chem, 2022, 65: 2848-2865.
- [45] Drayman N, DeMarco JK, Jones KA, et al. Masitinib is a broad coronavirus 3CL inhibitor that blocks replication of SARS-CoV-2 [J]. Science, 2021, 373: 931-936.
- [46] Kneller DW, Li H, Galanie S, et al. Structural, electronic, and electrostatic determinants for inhibitor binding to subsites S1 and S2 in SARS-CoV-2 main protease [J]. J Med Chem, 2021, 64: 17366-17383.
- [47] Gao S, Sylvester K, Song L, et al. Discovery and crystallographic studies of trisubstituted piperazine derivatives as non-covalent SARS-CoV-2 main protease inhibitors with high target specificity and low toxicity [J]. J Med Chem, 2022, 65: 13343-13364.
- [48] Zhang JW, Xiong Y, Wang F, et al. Discovery of 9,10-dihydro-phenanthrene derivatives as SARS-CoV-2 3CL^{pro} inhibitors for treating COVID-19 [J]. Eur J Med Chem, 2022, 228: 114030.
- [49] Hou NK, Shuai L, Zhang LJ, et al. Development of highly potent noncovalent inhibitors of SARS-CoV-2 3CL^{pro} [J]. ACS Cent Sci, 2023, 9: 217-227.
- [50] Ma YB, Jia TT, Zhang RF, et al. Thoughts on TCM diagnosis and treatment of COVID-19 [J]. Chin Arch Tradit Chin Med (中华中医药学刊), 2023, 41: 19-23.
- [51] Fang BJ, Qi WS, Yang ZX, et al. Updated TCM treatment in diagnosis and treatment protocol for COVID-19 patients (Tentative 9th Edition) and its guidance on preventing and Treating SARS-CoV-2 Omicron variant infection [J]. J Shaanxi Univ Chin Med (陕西中医药大学学报), 2022, 45: 1-4.
- [52] Yang Z, Liu Y, Wang L, et al. Traditional Chinese medicine against COVID-19: role of the gut microbiota [J]. Biomed Pharmacother, 2022, 149: 112787.
- [53] Wang JL, Li HW, Yang CJ, et al. Advances in research on the anticancer mechanism of shikonin [J]. Anhui Med Pharm J (安徽医药), 2022, 26: 1061-1067, 1273.
- [54] Tan C, Zhou JX, Lu QQ, et al. The synergistic effect of shikonin and ebselen against *Staphylococcus aureus* [J]. Acta Microbiol Sin (微生物学报), 2022, 62: 1049-1060.
- [55] Li J, Zhou X, Zhang Y, et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease in complex with the natural product inhibitor shikonin illuminates a unique binding mode [J]. Sci Bull, 2021, 66: 661-663.
- [56] Su H, Yao S, Zhao W, et al. Discovery of baicalin and baicalein as novel, natural product inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease *in vitro* [J]. bioRxiv, 2020. DOI: 10.1101/2020.04.13.038687.
- [57] Su H, Yao S, Zhao W, et al. Identification of pyrogallol as a warhead in design of covalent inhibitors for the SARS-CoV-2 3CL protease [J]. Nat Commun, 2021, 12: 3623.
- [58] Hu YQ, Xu Z, Feng LS. The isatin hybrid and its antituberculosis activity [J]. World Notes Antibiot, 2017, 38: 90-98.
- [59] Xu Y, Xu Z. Antituberculosis activity of isatin derivatives [J]. World Notes Antibiot, 2018, 39: 258-271.
- [60] Zhou L, Liu Y, Zhang W, et al. Isatin compounds as noncovalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors [J]. J Med Chem, 2006, 49: 3440-3443.
- [61] Liu P, Liu H, Sun Q, et al. Potent inhibitors of SARS-CoV-2 3C-like protease derived from *N*-substituted isatin compounds [J]. Eur J Med Chem, 2020, 206: 112702.
- [62] Fu Y, Wang SJ, Zhang JN. Study on pharmacological activity and action mechanism of oridonin [J]. Food Drug (食品与药品), 2022, 24: 202-207.
- [63] Xie T, Yang ZQ, Xu WW, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological effects and clinical application of *Rabdosia rubescens* [J]. Chin Tradit Herb Drug (中草药), 2022, 53: 317-325.
- [64] Zhong B, Peng W, Du S, et al. Oridonin inhibits SARS-CoV-2 by targeting its 3C-Like protease [J]. Small Sci, 2022, 2: 2100124.
- [65] Liu QY, Wang XL. Strategies for the development of drugs targeting novel coronavirus2019-nCoV [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 181-188.
- [66] Hu HC. Discovery of covalent inhibitors against Lp-PLA2 and SARS-CoV-2 PL protease (Lp-PLA2、SARS-CoV-2 PL^{pro}的共价抑制剂发现研究) [D]. Shanghai: Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Science, 2022.
- [67] Wang X, Huang B, Liu X, et al. Discovery of bioactive molecules from CuAAC click-chemistry-based combinatorial libraries [J]. Drug Discov Today, 2016, 21: 118-132.
- [68] Gu J, Peng R, Guo C, et al. Construction of a synthetic methodology-based library and its application in identifying a GIT/PIX protein-protein interaction inhibitor [J]. Nat Commun, 2022, 13: 7176.
- [69] Xu SJ, Ding D, Liu XY, et al. Integrated medicinal chemistry: new modalities and methodologies in drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 2889-2901.
- [70] Xu SJ, Ding D, Liu XY, et al. Universal strategies and methodologies in broad-spectrum antiviral drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 1289-1300.
- [71] Xu SJ, Zhang XJ, Ding D, et al. Bioinorganic chemistry strategies in antiviral drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 576-592.
- [72] Xu SJ, Ding D, Zhang XJ, et al. Novel targets and strategies in antiviral drug discovery [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2022, 57: 903-916.