

## SARS-CoV-2 刺突蛋白抑制剂活性筛选方法研究进展

胡立德<sup>#</sup>, 刘传峰<sup>#</sup>, 李萍, 董冠宇, 刘新泳<sup>\*</sup>, 展鹏<sup>\*</sup>

(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:** 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引起的新型冠状病毒感染 (corona virus disease 2019, COVID-19) 对全球公共卫生和经济造成了前所未有的影响。SARS-CoV-2 通过其表面的刺突蛋白与宿主细胞膜上的血管紧张素转换酶 2 相结合是入侵宿主细胞的关键步骤, 以刺突蛋白为靶标的小分子药物成为抗 SARS-CoV-2 研究的热点。活性筛选是小分子药物研发的关键步骤。鉴于此, 本文综述了 SARS-CoV-2 刺突蛋白小分子抑制剂的活性筛选方法, 以期为靶向刺突蛋白的抗病毒药物研发提供参考。

**关键词:** 冠状病毒; 新型冠状病毒; 刺突蛋白; 药物筛选; 药物研发

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0298-15

## Recent advances in drug screening methods of SARS-CoV-2 spike protein

HU Li-de<sup>#</sup>, LIU Chuan-feng<sup>#</sup>, LI Ping, DONG Guan-yu, LIU Xin-yong<sup>\*</sup>, ZHAN Peng<sup>\*</sup>

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

**Abstract:** The pandemic of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has caused a serious impact on global public health and the economy. SARS-CoV-2 infiltrates host cells *via* its surface spike protein, which binds to angiotensin-converting enzyme 2 on the host cell membrane. As a result, small molecules targeting spike protein have emerged as a hotspot in anti-SARS-CoV-2 drug research. Activity screening is an important step in seeking small molecule drugs. Therefore, this article aims to review the biological activity evaluation methods of small molecule inhibitors targeting SARS-CoV-2 spike protein, with the goal of laying the foundation for the discovery of new anti-SARS-CoV-2 drugs.

**Key words:** coronavirus; SARS-CoV-2; spike protein; drug screen; drug discovery

冠状病毒属于冠状病毒科 (nidovirales) 冠状病毒属 (coronavirinae), 分为  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  和  $\delta$ -冠状病毒四种亚型<sup>[1]</sup>。冠状病毒是人类和脊椎动物的重要病原体, 目前已知有七种冠状病毒可以感染人体<sup>[2]</sup>。本世纪内 SARS-CoV<sup>[3]</sup>、MERS-CoV<sup>[4]</sup>、SARS-CoV-2 三种冠状病毒接连暴发, 严重危害人类健康。

SARS-CoV-2 属于  $\beta$ -冠状病毒, 为单股正链 RNA 病毒<sup>[5]</sup>, 主要编码 4 种结构蛋白 (图 1), 由外到内分别为刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、胞膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白) 以及核衣壳蛋白 (nucleocapsid, N 蛋白)。此外, 还有多种非结构蛋白质 (nonstructural protein) 组成的多聚蛋白质体 (polyprotein) pp1a 和 pp1ab<sup>[6]</sup>。这些蛋白在病毒的生命周期中发挥至关重要的作用。

SARS-CoV-2 的生命周期一般可分为以下阶段<sup>[7]</sup>:  
① 侵入阶段: 首先由 S 蛋白与宿主细胞表面的血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2)

收稿日期: 2023-04-25; 修回日期: 2023-06-30.

基金项目: 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31); 中国博士后科学基金 (2022M711938).

<sup>#</sup>共同第一作者.

<sup>\*</sup>通讯作者 E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0507

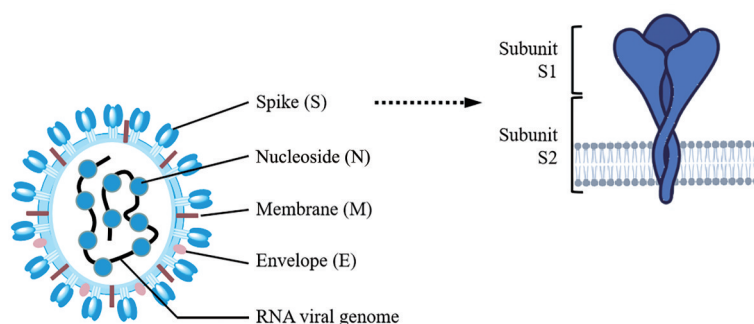


Figure 1 Structures of SARS-CoV-2 and spike protein

受体结合,介导病毒与细胞膜融合形成复合体,进而释放病毒遗传物质进入细胞中;② 遗传物质复制和翻译阶段:病毒在主蛋白酶 (main protease,  $M^{pro}$ ) 和木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease,  $PL^{pro}$ ) 作用下,水解生成多个成熟的非结构蛋白。再以 RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) 为核心形成 RNA 复制酶-转录酶复合物,参与病毒的遗传物质复制转录和翻译过程;③ 子代病毒释放阶段:复制的子代基因装载蛋白质后,经过胞吐作用释放,再感染其他宿主细胞。因此,理论上阻断或干扰生命周期中的任一环节均可抑制病毒复制和传播。

### 1 S 蛋白结构及功能

S 蛋白是高度糖基化的同源三聚体,其每个单体都含有 2 个功能不同的亚基 S1 和 S2 (图 2)<sup>[8]</sup>。通常, S1 亚基呈球形,主要包括 N-端结构域 (N-terminal domain, NTD)、受体结构域 (receptor-binding domain, RBD)、C 端结构域 1 (C-terminal domain 1, CTD1) 和 C 端结构域 2 (C-terminal domain 2, CTD2) 等结构域,其中 RBD 负责与宿主细胞 ACE2 结合过程; S2 亚基主要包括七肽

重复序列 1 (heptad repeat 1, HR1)、七肽重复序列 2 (heptad repeat 2, HR2) 和胞内结构域 (cytoplasmic domain, CD) 等结构域,负责促进病毒与宿主细胞的膜融合过程。S 蛋白与 ACE2 结合的过程中存在构象的变化,在结合 ACE2 前, S 蛋白三聚体以亚稳定融合前构象存在;结合 ACE2 后, S1 亚基脱落, S2 亚基形成融合后构象<sup>[9]</sup>。综上, S 蛋白的结构生物学研究阐述了 S 蛋白在 SARS-CoV-2 与宿主细胞膜受体结合及膜融合中起到的功能和作用,也为 S 蛋白小分子抑制剂的设计提供了理论依据。

目前,以 SARS-CoV-2 S 蛋白为靶标的抗病毒药物研发已成为热点之一。众所周知,活性筛选作为药物研发的关键环节,建立便捷、完整、高效的活性筛选体系是药物研发的瓶颈问题。鉴于此,本文简介了以 S 蛋白为靶标的小分子抑制剂活性筛选方法,有望为抗新冠病毒药物的研发提供参考。

### 2 SARS-CoV-2 刺突蛋白抑制剂活性筛选方法研究进展

目前,以 S 蛋白为靶标的小分子抑制剂活性筛选

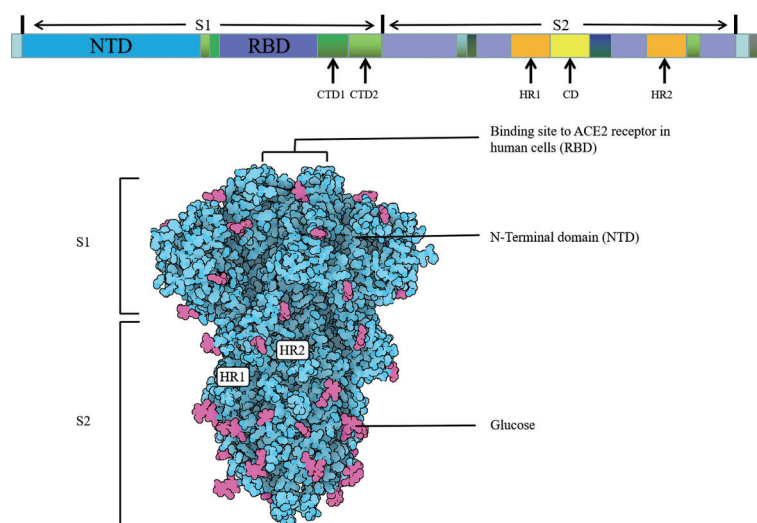


Figure 2 Biological structure of S protein; RBD: Receptor-binding domain; CTD1: C-terminal domain 1; CTD2: C-terminal domain 2; HR1: Heptad repeat 1; HR2: Heptad repeat 2; CD: Cytoplasmic domain

方法可以分为生物物理技术和生物化学技术。生物物理技术主要用于小分子-蛋白或蛋白-蛋白之间的亲和力测试,包括表面等离子共振技术 (surface plasmon resonance, SPR)、差分扫描荧光技术 (differential scanning fluorimetry, DSF) 和微量热泳动 (microscale thermophoresis, MST) 等方法;生物化学技术主要用于直观呈现小分子化合物对 SARS-CoV-2 S 蛋白的作用强度,包括免疫组织化学检测 (immunohistochemistry, IHC)、免疫荧光显微技术 (immunofluorescence microscopy, IF) 和细胞融合实验 (cell fusion) 等方法<sup>[10-12]</sup>。除了生物物理与生物化学的筛选方法外,虚拟筛选技术也应用于 S 蛋白抑制剂的发现 (图 3)。虚拟筛选的结果仍需后续生物物理和生物化学技术的佐证。因此,本文仅对虚拟筛选做概要性介绍,着重综述不同生物物理技术和生物化学技术的原理、优缺点、应用范围等方面。

## 2.1 生物物理技术

### 2.1.1 表面等离子共振技术

当光透过光疏介质产生的消逝波与介质中的等离子波发生共振时,能量从光子转移到表面等离子,使反射光的能量减少,从而检测到反射光强度大幅减弱。依据此原理建立的表面等离

子共振技术与传统检测分子相互作用方法相比,具有操作简单、耗时短、灵敏度高、可以无标记地实时测量动力学数据等优点<sup>[13]</sup>。

SPR 光学传感器 (图 4) 主要由光源、棱镜、传感芯片及检测器构成<sup>[14]</sup>。在 SPR 检测中,以靶标蛋白或小分子修饰传感器表面,分析物流经传感器 (表面镀有金膜) 后,蛋白-蛋白或蛋白-小分子识别结合作用会导致传感器表面折射率发生变化,随之引起 SPR 共振角或波长变化,进而对分析物进行定量分析。同时,SPR 还可以实时地记录分析物与配体的结合速率与解离速率。因此,在药物评价作用中可以通过拟合分子间相互作用直至达到整个动态平衡的过程,计算活性分子与受体间的结合/解离常数来判断该分子间亲和力大小,推断药物的作用机制。

2022 年 3 月,Shin 等<sup>[15]</sup>通过 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 筛选发现了一种抑制 RBD 和 ACE2 之间蛋白-蛋白相互作用的新型杂环骨架。其中 SB27012 (1, 图 5), 可以抑制 SARS-CoV-2 Spike-RBD 与 ACE2 的相互作用,  $IC_{50}$  为  $7.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。为了确定 SB27012 的直接靶点,以人源 ACE2 (h-ACE2) 为配体,

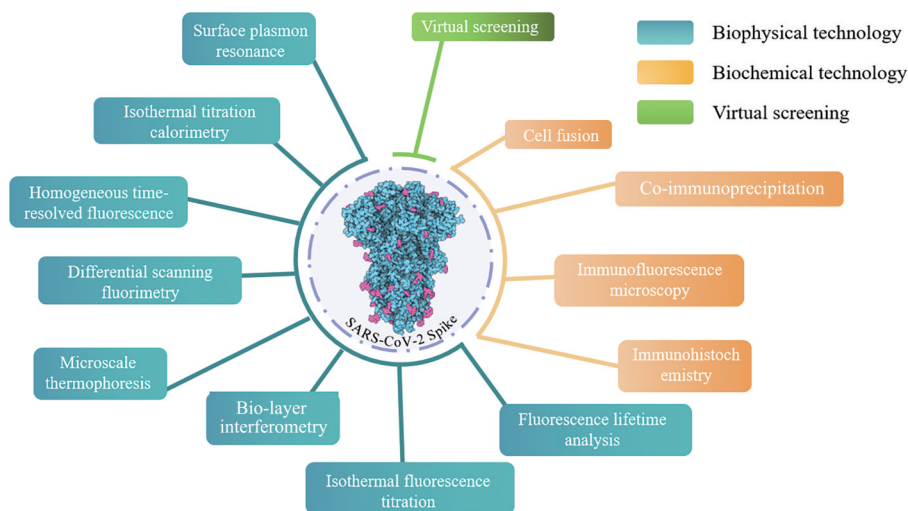


Figure 3 Common drug screen methods targeting SARS-CoV-2 S protein

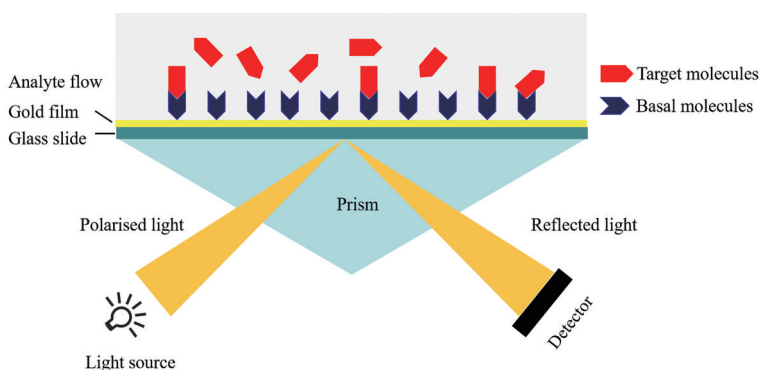


Figure 4 Schematic diagram of surface plasmon resonance (SPR)

将其固定在 CM5 芯片上 (Biacore T200 仪器), 在不同浓度下 ( $0.1 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 测量 SB27012 与 h-ACE2 的结合常数。结果表明 SB27012 与 h-ACE2 具有高亲和力 ( $K_d = 210 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 然后使用不同浓度的 SARS-CoV-2 Spike-RBD ( $0.1 \sim 100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 测量其与 SB27012 亲和力, 结果表明 SB27012 与 RBD 无直接结合作用。综上, SB27012 可能只与 hACE-2 直接结合, 破坏 RBD-ACE2 的相互作用。

2022年2月, Wang等<sup>[16]</sup>首先使用一种粗粒化分子动力学模拟方法 (coarse-grained molecular dynamic simulations), 发现 S 蛋白具有整体协同性, 即它的不同部分之间存在着相互影响的运动, 其中一个重要的变构调节路径为 S 蛋白上的 RBD 与其下方的两个亚域的连接处之间存在着相关运动。基于这个发现, 设计小分子插入到 S 蛋白的两个亚域之间, 可以阻碍蛋白质的构象变化从而抑制 S 蛋白与 ACE2 受体结合。为此, 研究者使用 SiteMap 软件, 在两个亚域附近识别到一个暴露且适合插入化合物的候选位点, 经两轮虚拟筛选, 从数千种化合物中筛选出三个潜在的有效变构调节剂: CPD7、CPD20 和 CPD26 (2~4, 图 5)。然后, 他们利用 SPR 技术测定这三种化合物与 S 蛋白结合力, 来验证计算机预测结果。将 SARS-CoV-2 全长 S 蛋白固定在芯片上, 注入梯度浓度待测化合物通过芯片, 结果显示 CPD7、CPD20 和 CPD26 都表现出与全长 S 蛋白浓度依赖性的结合,  $K_d$  值分别为 32.0、22.6 和  $14.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。最后, 细胞水平 (Vero E6) 抗病毒实验证明这三种化合物都能有效抑制 SARS-CoV-2 复制, 在  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下, 抑制率均大于 80% ( $n = 6$ )。

2021年9月, Singh等<sup>[17]</sup>采用了一种基于羧基传感器芯片的 SPR 技术, 将重组的 SARS-CoV-2 S 蛋白 S2 亚基作为配体固定在传感器上, 并用不同浓度高根二

醇 (erythrodiol) (5, 图 5) 注入到传感器芯片上, 分析高根二醇与 SARS-CoV-2 S 蛋白 S2 亚基之间的结合曲线, 结果显示: 两者结合速率常数  $K_{\text{on}}$  为  $1.93 \times 10^3 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 解离速率常数  $K_{\text{off}}$  为  $2.21 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ; 动力学平衡解离常数  $K_d$  为  $1.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 这表明两者之间有较高的亲和力。因此, 高根二醇是一种有效的 SARS-CoV-2 S 蛋白抑制剂。

**2.1.2 差示扫描荧光技术** 差示扫描荧光法是一种评价蛋白质热稳定性的方法, 该方法利用荧光定量 PCR 仪缓慢加热蛋白质样品, 并检测结构逐渐改变的蛋白质与荧光染料相结合的量, 从而测定出蛋白质的熔解温度 ( $T_m$ )。DSF 方法具有操作简单、样品消耗少、适用范围广等优点, 可以用于筛选蛋白质稳定性影响因素、优化蛋白质结晶条件、发现新型配体等方面。DSF 原理 (图 6) 为当蛋白质处于正常折叠状态时, 疏水部分包裹于蛋白质分子内部, 荧光染料无法结合。当外界温度升高时, 蛋白质折叠结构逐渐展开, 隐藏在内部的疏水部分暴露, 对疏水部分亲和力高的荧光染料逐渐结合到蛋白质上导致体系荧光信号增强。当温度上升到  $T_m$  时, 舒展的蛋白质发生聚集, 并排斥荧光染料的结合。脱落的荧光染料回归到周围环境中或在高温环境下猝灭, 导致体系荧光信号强度下降。因此, 通过检测荧光信号随温度变化的曲线, 可以测定出蛋白质的  $T_m$ 。当有配体与蛋白质结合时, 则会改变蛋白质折叠结构和稳定性, 并影响  $T_m$  值大小<sup>[18,19]</sup>。

纳米差视扫描荧光法 (Nano-DSF) 是根据色氨酸残基在蛋白质折叠和去折叠状态下荧光发射波长的不同, 直接测量蛋白质构象变化的无标记方法。其中, 埋藏在亲脂核心中的色氨酸在 330 nm 处发射, 而暴露在水环境中的色氨酸最大发射波长为 350 nm。因此, 监测 330~350 nm 之间的发射强度差异可以反映蛋白质

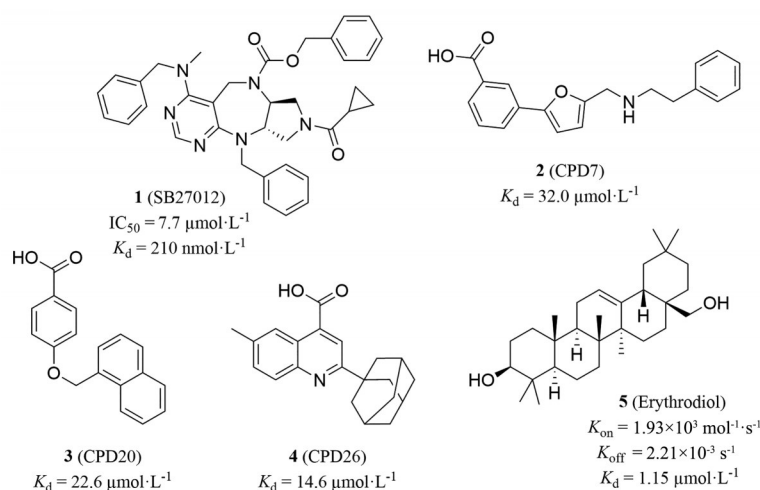
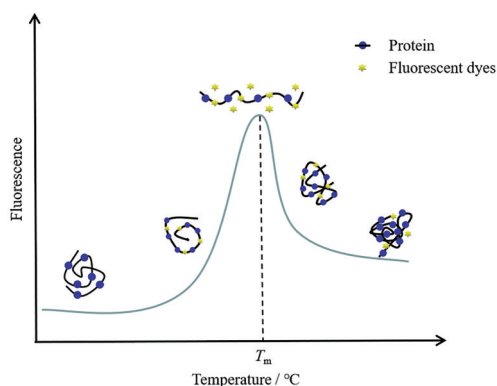


Figure 5 Chemical structures of compounds 1-5



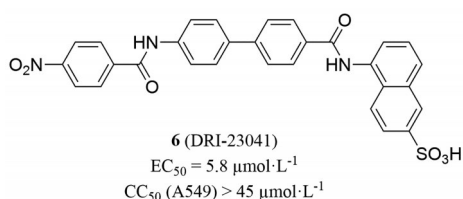
**Figure 6** Schematic diagram of differential scanning fluorimetry (DSF)

构象完整性。

2022年5月, Schmidt等<sup>[20]</sup>利用 Nano-DSF 筛选了几种膳食多酚对 h-ACE2 受体和 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的结合能力。结果表明, 咖啡因、咖啡酸、氯原酸、芹菜素、芹菜苷、芥子油苷和白藜芦醇等多酚能够显著降低刺突蛋白的  $T_m$ , 表明它们可能与 SARS-CoV-2 Spike-RBD 形成复合物。其中, 咖啡因和氯原酸的结合能力最强, 溶解温度分别降低了 6.5 和 5.9 °C。此外, 这些多酚还能够影响 ACE2 的稳定性, 其中咖啡因和氯原酸能够提高 ACE2 的  $T_m$ , 而其他多酚则能够降低 ACE2 的  $T_m$ 。结果表明, 这些多酚可能通过干扰刺突蛋白和 ACE2 之间的相互作用, 从而具有抗 SARS-CoV-2 的潜力。

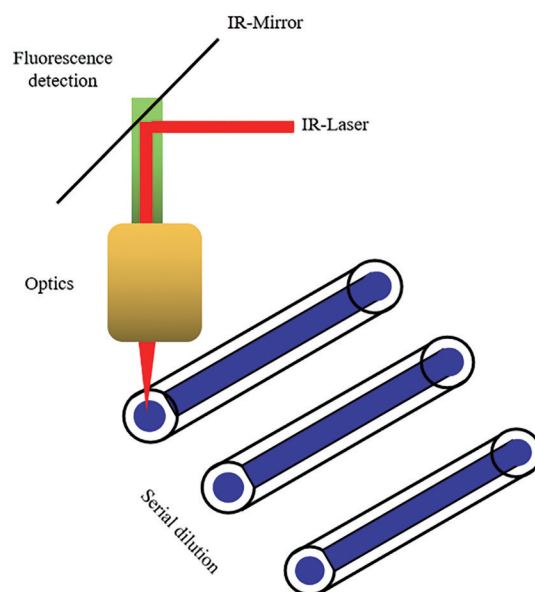
2021年6月, Bojadzic 等<sup>[21]</sup>利用无细胞 ELISA 模型分析技术发现了一批有机染料小分子能够阻断 SARS-CoV-2 S 蛋白与 h-ACE2 间的相互作用。在进一步蛋白质热位移实验中, DRI-23041 (6, 图7) 的存在会导致 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的熔融温度曲线发生明显左移, 而对 h-ACE2 熔融温度曲线无明显影响, 因此证明小分子的靶点很可能是 SARS-CoV-2 Spike-RBD。假病毒实验证明这些小分子具有抗 SARS-CoV-2 活性 ( $EC_{50} = 5.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 且细胞毒性低 ( $CC_{50} > 45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , A549 细胞)。

**2.1.3 微量热泳动技术** 微量热泳动是一种能够灵敏地检测生物分子相互作用的技术, 它可以通过测量结合后生物分子大小、电荷和水化层变化所引起的热泳



**Figure 7** Chemical structure of compound 6

动性变化来反映亲和力<sup>[22]</sup>。MST 实验原理 (图8): 首先用红外激光对含有荧光标记或色氨酸残基的样品进行局部加热, 形成一个微小的温度梯度场。然后, 观察并定量样品分子在温度梯度场中发生的定向运动。最后, 根据荧光强度变化计算出不同温度下受体、供体和供受体复合物之间已结合的数量比例, 并推算出二者的亲和常数。



**Figure 8** Schematic diagram of microscale thermophoresis (MST)

2022年5月, Schmidt等<sup>[20]</sup>利用 Nano-DSF 筛选了几种膳食多酚对 h-ACE2 受体和 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的结合能力, 并证明这些多酚可能干扰 SARS-CoV-2 Spike-RBD 和 ACE2 之间的相互作用。随后研究人员在多酚存在下进行基于荧光标记 S 蛋白和 ACE2 热泳动性变化的实验, 最初利用 Nano-red 标签标记 SARS-CoV-2 Spike-RBD 赖氨酸残基, 然而得到的滴定曲线没有显示稳定的响应。替换为含有镍的 NTC-red 标签标记 SARS-CoV-2 Spike-RBD 后, 在不含膳食多酚的情况下, ACE2 受体和 SARS-CoV-2 Spike-RBD 之间的  $K_d$  为  $7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。加入  $250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的绿原酸 (5-CQA, 7, 图9) 后  $K_d$  值增大近 10 倍 ( $K_d = 67 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 这表明加入绿原酸后 S 蛋白与 ACE2 的亲和力大大降低。说明绿原酸可能具有抑制 SARS-CoV-2 感染人细胞的潜力。

2020年5月, Ekins 等<sup>[23]</sup>利用计算机构建了 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的 3D 预测模型, 并从美国 FDA 批准的 2 400 个药物中筛选出具有结合潜力的化合物。随后研究<sup>[24]</sup>发现, 在虚拟筛选基础上利用微量热泳动测量技术测定了上述药物与 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的亲和力, 确定了五种  $\beta$ -受体阻滞剂 (卡维地洛、艾司洛尔、

比索洛尔、布新洛尔和普萘洛尔) 能够与 SARS-CoV-2 Spike-RBD 结合, 其中卡维地洛 (carvedilol, **8**, 图 9) 与 SARS-CoV-2 Spike-RBD 亲和力较高 ( $K_d = 364 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 并显示出体外抗 SARS-CoV-2 活性 ( $\text{EC}_{50} = 7.57 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 且细胞毒性较低 ( $\text{CC}_{50} = 18.07 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , CALU-3 细胞)。此外, 还发现卡维地洛能够降低感染小鼠肺部组织中 SARS-CoV-2 RNA 水平, 并改善肺部组织损伤, 具有进一步研究的价值。

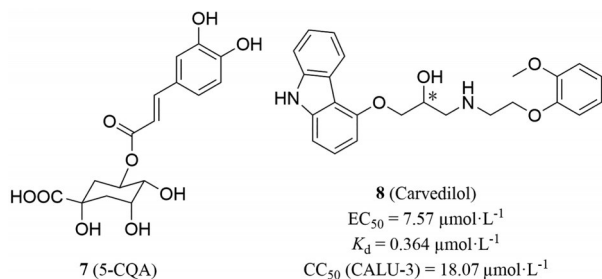


Figure 9 Chemical structures of compounds 7 and 8

**2.1.4 等温滴定量热技术** 等温滴定量热技术 (isothermal titration calorimetry, ITC) 是一种研究生物热力学与生物动力学的重要方法, 广泛用于蛋白质-蛋白质、蛋白质折叠/去折叠和蛋白质-小分子以及酶-抑制剂相互作用等领域<sup>[25]</sup>。ITC 基本原理 (图 10) 为: 将反应物溶液放置在温控样品池 (sample cell) 中, 通过一个热电偶回路与参比池偶联 (reference cell), 另一种反应物作为配体置于注射器 (syringe) 中。保持外界条件相同, 利用绝热装置将样品池和参比池分隔。在恒定温度下, 注射器恒速向样品池中滴加配体, 反应一定时间后, 样品池与参比池之间产生热差, 仪器显示出一个吸热或放热的峰<sup>[25-27]</sup>。该方法可用于计算溶液中两个或多个分子之间反应结合焓、定压热容 ( $\Delta C_p$ )、结合位点数 ( $n$ )、结合平衡常数 ( $K_d$ ) 和动力学数据 (如酶促反应的米氏常数  $K_m$  和催化速度常数  $K_{cat}$ )<sup>[28]</sup>, 从而得出反应的吉布斯自由能 ( $\Delta G$ ) 和熵变 ( $\Delta S$ )。

凝集素 (lectin) 是一种能与病毒表面糖链结合, 从而阻断病毒侵入过程的蛋白质。它广泛存在于植物、无脊椎动物和高等动物中<sup>[29]</sup>。2022 年, 研究者<sup>[30]</sup>在前期研究的基础上发现了一种抗病毒凝集素重组蓝藻抗病毒蛋白 N (cyanovirin-N, CV-N), 它对 SARS-CoV-2 有很强的抑制活性<sup>[31]</sup>。基于假病毒的实验表明, 针对 6 种不同 SARS-CoV-2 毒株, CV-N 的  $\text{EC}_{50}$  值在  $31 \sim 112 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$  之间。SPR 实验中, CV-N 与 S 蛋白表现出较高的亲和力 ( $K_d = 15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与 RBD ( $K_d > 1\,000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 ACE2 ( $K_d = 3\,500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的亲和力较低, 说明 CV-N 作用于 S 蛋白上非 RBD 结构域的特殊靶点。ITC 实验

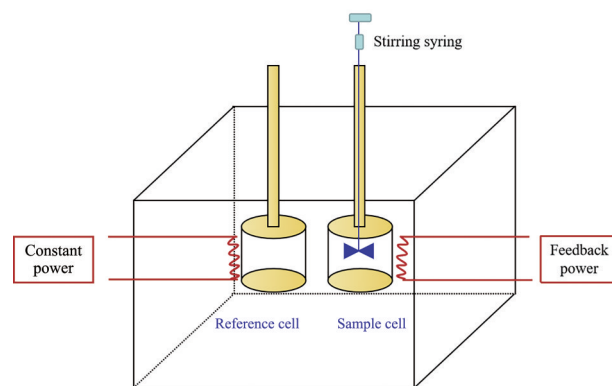


Figure 10 Schematic diagram of isothermal titration calorimetry (ITC)

中, 分别测定 CV-N 和 S 蛋白三聚体或者单聚体的结合常数和结合热力学参数。发现 CV-N 和蛋白三聚体有很强的结合,  $K_d$  为  $15 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 而且每个 Spike 三聚体可以结合两个 CV-N 分子。而 CV-N 和 Spike 单聚体的结合则较弱,  $K_d$  为  $1\,200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 并且每个 Spike 单聚体只能结合一个 CV-N 分子。这些数据表明 CV-N 可以识别并优先结合至 Spike 三聚体上。此外, CV-N 可以显著降低接种 SARS-CoV-2 的小鼠鼻腔内的病毒载量, 并提高小鼠存活率 (CV-N 处理组小鼠存活率为 80%, 而对照组存活率为 20%)。

2022 年, Chen 等<sup>[32]</sup>利用基于结构的虚拟筛选 (structure-based virtual screening) 从一个包含了近万种天然产物的化合物库中, 筛选出与 SARS-CoV-2 S 蛋白结合能力最高的 50 种苗头分子, 并采用等温滴定量热法验证化合物的结合亲和力。结果显示薯蓣皂苷元 (diosgenin, **9**, 图 11) 与 SARS-CoV-2 S 蛋白 S1 亚基有较高的结合能力, 滴定曲线在  $4\,000 \sim 5\,000 \text{ s}$  之间达到平衡,  $K_d = 0.468 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $\Delta G$  值在  $-37 \sim -26 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  之间。在进一步的假型慢病毒颗粒感染实验中, 薯蓣皂苷元在  $8.69 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ( $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 的浓度下阻止了 80% 以上的病毒感染细胞。

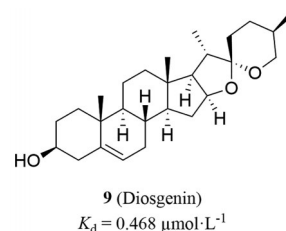


Figure 11 Chemical structure of compound 9

**2.1.5 生物膜干涉技术** 生物膜干涉技术 (bio-layer interferometry, BLI) 是一种实时检测分子间相互作用的技术, 原理 (图 12) 为在光纤传感器的表面固定一种

特定的配体分子 (basal molecules), 当光通过传感器时, 会在生物膜 (biocompatible surface) 内发生反射和折射而形成干涉图案 (reflect beams), 当该配体分子与目标分子 (target molecules) 结合时, 会改变传感器表面的生物膜厚度。生物膜厚度的变化会导致干涉图案发生位移, 从而反映出目标分子与配体分子之间的结合情况<sup>[33]</sup>。

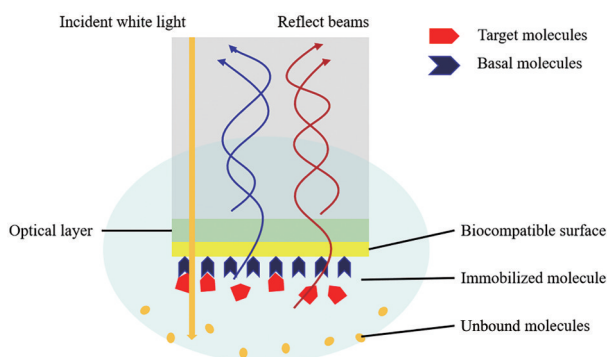


Figure 12 Schematic diagram of bio-layer interferometry (BLI)

2021年9月, Coghi等<sup>[34]</sup>利用虚拟筛选、分子动力学模拟和生物层析等方法, 来评估不同抗疟药物与 SARS-CoV-2 Spike-RBD和ACE2之间的相互作用强度和稳定性。生物膜干涉实验中, 将Spike-RBD与ACE2分别固定在生物传感器上, 然后将其暴露在不同的配体浓度下。结果显示, 青蒿酮 (artemisonone, **10**, 图13) 表现出与RBD较高的亲和力 ( $K_{d1} = 0.363 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与ACE2则亲和力较差 ( $K_{d2} = 681 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); 亚甲蓝 (methylene blue, **11**, 图13) 与前者相似, 与RBD亲和力较高 ( $K_{d1} = 0.226 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与ACE2亲和力较差 ( $K_{d2} = 475 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。青蒿酮、亚甲蓝都与SARS-CoV-2 Spike-RBD有良好的亲和力, 且远优于与ACE2的亲和力, 这表明这两种分子在能够结合抑制Spike-RBD的同时, 避免与ACE2结合。进一步研究发现, 青蒿酮和亚甲蓝都能够显著降低假病毒感染人类细胞系Huh7.5/ACE2的效率。

2021年7月, Yang等<sup>[35]</sup>从1800多种天然化合物中

经虚拟筛选发现了潜在的SARS-CoV-2 Spike-RBD抑制剂。进而在生物膜干涉实验中, 多酚类化合物柯里拉京 (corilagin, **12**, 图13) 与Spike-RBD的结合呈剂量依赖性关系, 平衡解离常数  $K_d = 17.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。h-ACE2与柯里拉京的结合呈剂量依赖性关系, 属于1:1的简单结合模式,  $K_d$ 为  $1.39 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。这表明柯里拉京可能通过与病毒Spike-RBD及宿主细胞ACE2受体的双重结合发挥抗病毒效果。此外, 在ELISA实验、体外假病毒系统及体内小鼠模型中均证明了柯里拉京能够有效抑制SARS-CoV-2与宿主细胞ACE2受体的相互作用, 并降低病毒感染率和肺部损伤程度。

**2.1.6 等温荧光滴定技术** 等温荧光滴定法 (isothermal fluorescence titration, IFT) 是一种利用荧光信号来研究分子间相互作用的技术。它的原理是在恒定的温度和pH条件下, 将一种分子 (通常是荧光分子) 逐步滴定到另一种分子 (通常是非荧光分子) 的溶液中, 观察荧光信号的变化。如果两种分子之间存在结合作用, 那么荧光信号会随着结合物的形成而发生变化, 例如增强或减弱、红移或蓝移等<sup>[36]</sup>。通过对荧光信号的拟合和分析, 可以得到结合反应的相关参数, 如结合常数、化学计量、自由能、焓变和熵变等。

与许多其他病原体一样, SARS-CoV-2感染细胞也依赖其表面的S蛋白与靶细胞的糖胺聚糖 (glycosaminoglycans, GAG) 的相互作用<sup>[37]</sup>, 已有研究表明硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 是SARS-CoV-2感染级联反应中的关键辅助因子, 并表征了HS与SARS-CoV-2的刺突糖蛋白的结合<sup>[38,39]</sup>。2021年, Ennemoser等<sup>[40]</sup>用等温荧光滴定法测定了SARS-CoV-2 S蛋白的两个结构域 (RBD和FL) 与依诺肝素 (enoxaparin), 硫酸乙酰肝素和硫酸皮肤素 (dermatan sulfate, DS) 的亲和力。他们发现, 在RBD与GAGs的结合中, HS的亲和力最高 ( $K_d = 600 \pm 78.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 其次是依诺肝素 ( $K_d = 678.4 \pm 116.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), DS ( $K_d = 912.5 \pm 63.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。然而, 在FL与GAGs的结合中, 依诺肝素反而有最高的亲和力 ( $K_d = 604.3 \pm 67.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), HS略低 ( $K_d =$

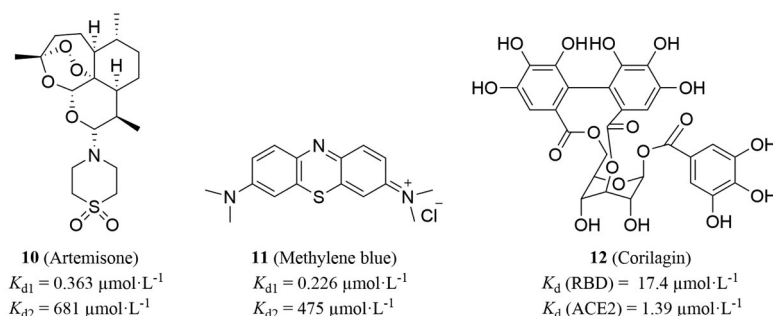


Figure 13 Chemical structures of compounds 10-12

$680.3 \pm 66.8 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 而 DS 仍然是最低 ( $K_d = 784.8 \pm 65.6 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。这表明, 外源添加依诺肝素可能作为天然 GAG 的竞争性抑制剂, 阻碍 SARS-CoV-2 黏附在细胞表面的过程。

**2.1.7 荧光寿命分析技术** 荧光寿命是指荧光团从激发态跃迁到基态的平均时间, 它反映了荧光团所处的微环境和相互作用的信息<sup>[41]</sup>。荧光寿命分析技术 (fluorescence lifetime analysis, FLT) 的原理是利用激发光源 (如激光或 LED) 产生窄脉冲光, 激发样品发射荧光, 然后检测单个荧光分子到达探测器的时间。通过多次重复该过程, 可以得到荧光寿命的分布。

2022 年, Ratnapriya 等<sup>[42]</sup>开发了一种基于荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 生物传感器的活细胞荧光寿命检测方法, 用于监测 SARS-CoV-2 S 蛋白的组装和构象变化。他们将 SARS-CoV-2 S 蛋白基因分别克隆到两个质粒中, 构建了一个由 SARS-CoV-2 Spike-meGFP (供体) 和 SARS-CoV-2 Spike-TagRFP (受体) 表达质粒组成的生物传感器系统。然后, 他们将得到的质粒瞬时转染到 HEK293T 细胞中, 抑制剂以  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度进行 FLT 实验, 筛选出两种显著改变 FLT-FRET 读数的抑制剂: aminobenzotropine (**13**, 图 14) 增强了 FLT 反应, 而阿莫沙平 (amoxapine, **14**, 图 14) 则相反, 显著降低 FLT 反应。进一步的热位移实验表明阿莫沙平和 aminobenzotropine 均选择性地改变 SARS-CoV-2 Spike-RBD 的熔融温度。这说明阿莫沙平和 aminobenzotropine 都可以与 SARS-CoV-2 Spike-RBD 结合, 但会引起 SARS-CoV-2 Spike-RBD 不同的构象变化。最后, 两种抑制剂在细胞水平表现出较好抗病毒活性 [ $\text{EC}_{50}$  (aminobenzotropine) =  $73.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{EC}_{50}$  (amoxapine) =  $17.3 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ], 且细胞毒性都较低 [ $\text{CC}_{50}$  (aminobenzotropine) >  $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{CC}_{50}$  (amoxapine) =  $47.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , A549 细胞]。

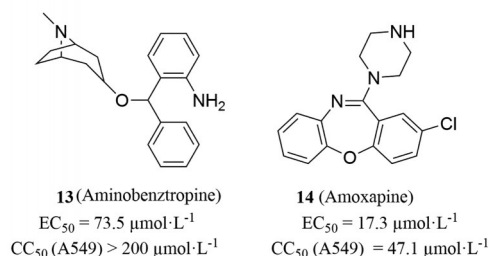


Figure 14 Chemical structures of compounds **13** and **14**

**2.1.8 均相时间分辨荧光技术** 时间分辨荧光技术 (time-resolved fluorescence energy transfer, TR-FRET) 是一种结合了荧光共振能量转移 (FRET) 和时间分辨

荧光技术 (time resolved fluoroimmunoassay, TRFIA) 的超微量检测技术。它利用稀土离子作为供体荧光团, 与受体荧光团形成能量转移。当供体和受体之间的距离很近时, 会产生信号。由于稀土离子的荧光寿命很长, 可以通过延迟检测来消除背景干扰, 提高信噪比和灵敏度<sup>[43]</sup>。均相时间分辨荧光技术 (homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF) 是基于 TR-FRET 技术的进一步改良, 主要区别为使用纳米微球作为信号放大载体。原理 (图 15) 为当标记 His 标签的供体蛋白 (donor protein) 和标记 GST 标签的受体蛋白 (acceptor protein) 相互作用时, 受体磁珠和供体磁珠随之靠近, 发生共振能量转移现象。而当分子抑制两者的作用时, 共振能量转移现象减弱。共振能量转移现象的减弱程度则反映分子对蛋白-蛋白相互作用抑制的强弱。

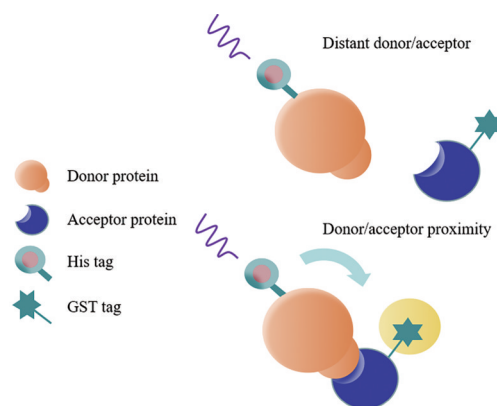


Figure 15 Schematic diagram of time-resolved fluorescence energy transfer (TR-FRET)

2022 年, Li 等<sup>[44]</sup>通过一种基于 HTRF 技术的高通量筛选平台, 筛选了两个化合物库, 共计 2 864 种分子。其中 DA 化合物库中的单宁酸、TopScience 化合物库中的 TS-984 (9-甲氧基坎草素-6-酮, **15**, 图 16) 和 TS1276 (葱醌) 具有抗 SARS-CoV-2 活性。单宁酸、9-甲氧基-6-酮和葱醌的  $\text{EC}_{50}$  (HTRF) 分别为  $49.71$ 、 $36.21$  和  $55.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。在 ACE2 过表达的 Capan2 细胞上测试了这四种化合物的抗病毒活性, 发现 TS984 的抑制作用最强, 且呈剂量依赖关系。

2022 年 1 月, Cecon 等<sup>[45]</sup>报道了 TR-FRET 检测方

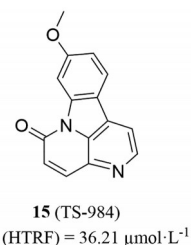


Figure 16 Chemical structure of compound **15**

法可以在活细胞中实时监测 RBD 与 ACE2 之间的结合,并探索了 ACE2 与活细胞质膜上的 SARS-CoV-2 S 蛋白的相互作用。研究发现,细胞特异性的膜成分或辅助因子,如 HSPGs (heparan sulfate proteoglycans)、TMPRSS2 (transmembrane protease serine 2) 和 CD4 (cluster of differentiation) 等,可以显著增强 RBD/ACE2 的相互作用。例如,通过 SPR 和 BLI 测定的 RBD/ACE2 复合体  $K_{on}$  值为  $1.8 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,而通过 TR-RET 法测得 HEK293 细胞中 RBD 与 ACE2 结合的  $K_{on}$  值为  $1.3 \times 10^6 \pm 5.1 \times 10^5 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ,后者是前者的 7.2 倍。

## 2.2 生物化学技术

### 2.2.1 免疫组织化学检测技术

免疫组织化学检测的主要原理是用携带显色标记的抗体或抗原与细胞原位相应抗原或抗体特异性结合发生呈色反应,使用显微镜或电子显微镜可以对相应抗原进行定位、定性和定量测定<sup>[46]</sup>。

桑黄 (*Sanghuangporus sanghuang*) 已被证明具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎、抗糖尿病、肝脏保护、神经保护和免疫调节等生物活性<sup>[47-49]</sup>。2022 年 9 月,Chien 等<sup>[50]</sup>研究了桑黄及其酚类化合物对体内外 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白表达的影响,将小鼠模型内脏组织用石蜡包装,切片 3  $\mu\text{m}$ ,用 ACE2 一抗或 TMPRSS2 一抗对小鼠肝、肾组织进行染色。结果显示,桑黄 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 组大鼠肾脏染色程度明显减弱,这表明桑黄的存在使肾脏部位 ACE2 和 TMPRSS2 表达明显减少,在肝脏中的表达也略有下降。这表明,桑黄可明显阻断肾组织中 ACE2 和 TMPRSS2 的表达。

2021 年,Li 等<sup>[51]</sup>利用 BLI 及免疫细胞化学检测证实柯里拉京可以干扰病毒 Spike-RBD 和宿主细胞 ACE2 受体的相互作用,进而发挥抗病毒作用。此外,还发现柯里拉京以剂量依赖性方式抑制 SARS-CoV-2 Spike-RBD 与 ACE2 的结合。需要强调的是,也有认为柯里拉京是一种针对 SARS-CoV-2 RdRp 的抑制剂<sup>[51]</sup>。因此,柯里拉京可能具有双重靶向抗 SARS-CoV-2 作用。

### 2.2.2 免疫荧光显微技术

免疫荧光显微技术(图 17)是使用荧光标记抗体与标本切片中组织或细胞表面的抗原进行反应,洗涤除去游离的荧光抗体后,于荧光显微镜下观察,在黑暗背景上可见明亮的特异荧光的显微技术<sup>[52]</sup>,包括直接法和间接法。这种技术主要靠观察切片标本上荧光抗体的染色结果作为抗原鉴定和定位的方法。

Yi 等<sup>[53]</sup>以 SARS-CoV-2-Spike-RBD 为靶点进行虚拟配体筛选,从甘草成分中筛选出 125 种小分子,然后用 ELISA 法测定了甘草化合物对 SARS-CoV-2 S 蛋白的抑制活性。在  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时,甘草次酸 (glycyrrheticin

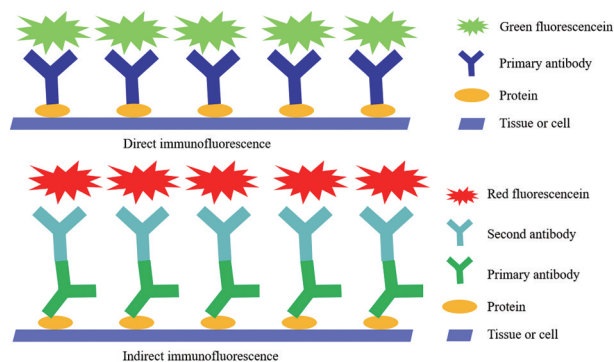


Figure 17 Schematic diagram of immunofluorescence microscopy (IF)

acid, GA, 16, 图 18) 和甘草皂苷 (A3, 17, 图 18) 的抑制率分别为 51.9% 和 45.1%, 显著高于其他甘草成分。在 Vero E6 细胞中, GA 抑制 SARS-CoV-2 复制的  $EC_{50}$  为  $3.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , A3 的  $EC_{50}$  为  $75 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随后,利用间接免疫荧光法验证其抗病毒效果的准确性<sup>[53]</sup>。分别用  $3$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  GA 和  $0.11$ 、 $0.33 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  A3 预处理病毒 24 h 后感染细胞,并使用抗病毒 S 蛋白一抗进行检测,结果显示,与无药组细胞相比,GA 和 A3 以剂量依赖性的方式显著抑制 SARS-CoV-2 感染,证实了 GA 和 A3 抗病毒活性结果的准确性。有研究发现 A3 的优异活性(是 GA 的 40 多倍)可能不只源自与 RBD 一个靶点结合<sup>[54]</sup>。因此,他们随后测试了 A3 针对 3CL<sup>pro</sup> 和 RdRp 的活性。SPR 结果显示, A3 与 nsp7 (RdRp 重要组成部分) 结合紧密 ( $K_d = 167 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 将 A3 与 nsp7 (从 nsp7-nsp8 复合物晶体结构中剥离得到) 进行分子对接时发现存在七个氢键,结合能量为  $-8.7 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。因此, nsp7 很可能是 A3 的新作用靶点。

Cys-488 是 SARS-CoV-2 中位于 RBD-ACE2 相互作用表面的保守残基,其可以在 SARS-CoV-2 S 蛋白中

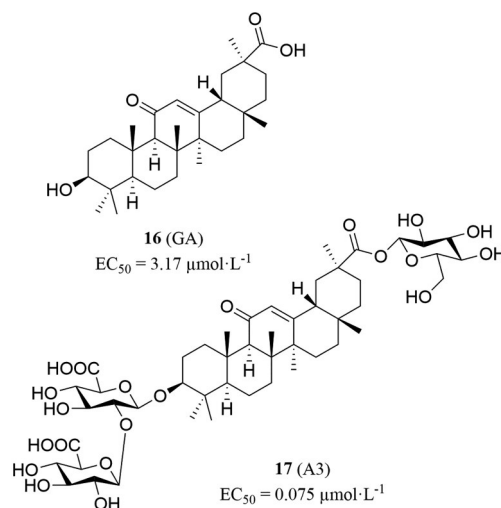


Figure 18 Chemical structures of compounds 16 and 17

形成二硫化物桥, 2022年, Murae等<sup>[55]</sup>利用免疫荧光显微技术证明破坏该二硫化物桥可以大幅削弱病毒的感染活性。在C488A突变株中, Cys-488被丙氨酸取代, 不再形成二硫化物桥。用荧光标记的Spike-C488A突变株感染过表达ACE2的HEK293T细胞, 12 h后于荧光显微镜下观察, 结果表现出, 与野生株相比, 突变株视野内绿色荧光细胞(合胞体)数量明显减少, 因此证明了Cys-488形成二硫化物桥在病毒侵入过程中发挥关键作用。

**2.2.3 细胞融合检测技术** 细胞融合(图19)是在自然条件下或用人工方法使两个或两个以上的细胞合并形成一个细胞的过程<sup>[56]</sup>。对SARS-CoV-2来讲, S蛋白与ACE2结合后, 可引发后续膜融合形成合胞体(syncytia), 通过检测合胞体的数量, 则可一定程度反映病毒的感染率, 对照组与实验组合胞体的数量差异则反映出化合物抑制能力的强弱。

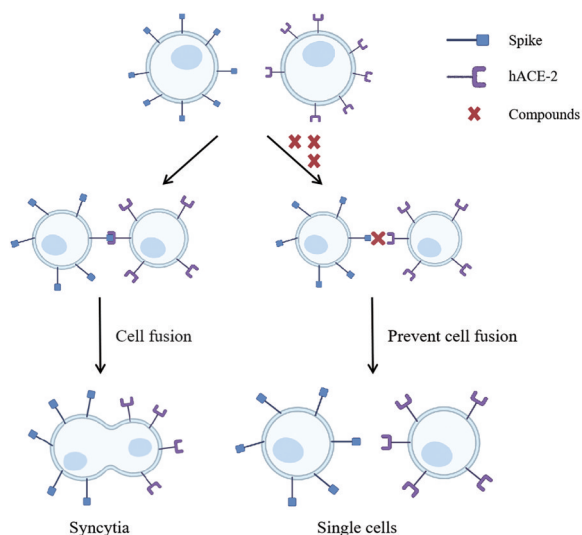


Figure 19 Schematic diagram of cell fusion

2022年, Johansen等<sup>[57]</sup>早期研究中发现几种阳离子两亲性药物(cationic amphiphilic drug, CADs)可以作为病毒的侵入抑制剂。因此, Chen等<sup>[58]</sup>对FDA批准的CAD药物进行筛选, 结果表明, 舍曲林(sertraline, SRT)对SARS-CoV-2假病毒感染的抑制作用最强,  $EC_{50}$ 为 $0.765 \pm 0.446 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。他们随后研究了SRT在SARS-CoV-2 S蛋白介导的细胞融合中的潜在作用。以表达SARS-CoV-2 S蛋白和增强型绿色荧光蛋白(EGFP)的293T细胞为效应细胞, 表达h-ACE2受体的Vero E6细胞为靶细胞, 将二者共培养。结果显示, SRT浓度为1.25、2.5和 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 均显著抑制效应细胞和靶细胞之间的融合, 形成的合胞体数量随抑制剂浓度梯度增加而减少。同时, 不表达S蛋白的293T细胞组未见

合胞体形成。此外, SPR结合实验中SRT与S蛋白具有较强的结合能力( $K_d = 142 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。SRT与S1亚基、S2亚基、RBD和ACE2的亲和力测定结果表明SRT与S1亚基亲和力( $K_d = 127 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )大于S2亚基( $K_d = 422 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与RBD结构域的亲和力最高( $K_d = 46.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 与ACE2的亲和力最低( $K_d = 50\,300 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。这说明, SRT靶向S蛋白RBD结构域发挥抑制膜融合作用。

糖尿病是发生严重COVID-19的高风险因素<sup>[59,60]</sup>, 为探究糖尿病患者更易感染SARS-CoV-2的原因, Tong等<sup>[61]</sup>从人血液中鉴定了几种具有抗SARS-CoV-2活性的小分子代谢物, 其中1,5-脱水-D-葡糖醇(1,5-anhydro-D-glucitol, 1,5-AG, **18**, 图20)与糖尿病相关。为验证1,5-AG在膜融合中的作用, 研究者以表达SARS-CoV-2 S蛋白的293T细胞为效应细胞, 以表达h-ACE2蛋白的293T/hACE2细胞为靶细胞, 进行了细胞融合实验。结果证实1,5-AG可抑制效应细胞和靶细胞之间合胞体的形成。此外, 1,5-AG在细胞水平显示出一定的抗病毒活性( $EC_{50} = 27.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

由于S蛋白的RBD含有几个二硫键或半胱氨酸残基, 这些残基附近可能形成二硫化物, 在一些病毒中已被证明对还原性物质较敏感。2021年, Manček-Keber等<sup>[62]</sup>推测影响半胱氨酸残基可以抑制病毒细胞进入的靶标, 于是利用细胞融合技术, 测试几种具有硫醇结构的上市药物对细胞融合的影响。结果表明N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)不抑制细胞融合; 然而, 其衍生物N-乙酰半胱氨酸酰胺(NACA, **19**, 图20)表现出强烈抑制合胞体形成的能力, 与对照相比,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下合胞体减少70%左右; 此外, L-抗坏血酸(L-ascorbic acid, **20**, 图20)也有效地抑制细胞融合,  $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下, 合胞体数量减少75%左右。

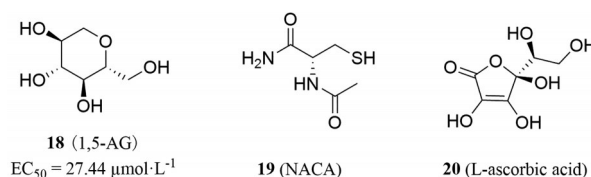
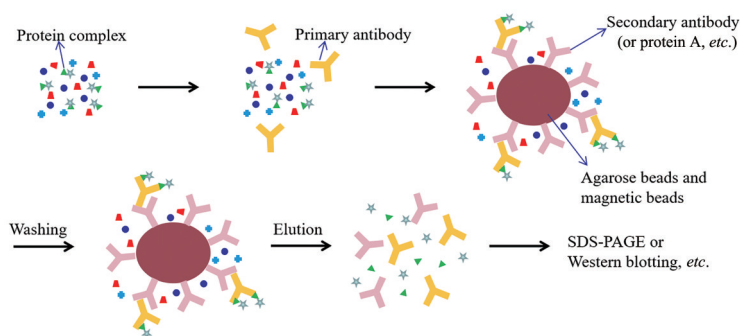


Figure 20 Chemical structures of compounds 18–20

**2.2.4 免疫共沉淀技术** 免疫共沉淀法(co-immunoprecipitation, Co-IP, 图21)用于研究蛋白质与其他分子间(如蛋白质、DNA、RNA和小分子等)相互作用, 细胞在非变性条件下被裂解时, 能够保留细胞内自然状态下大部分蛋白质间的相互作用, 将蛋白质A预先固化在磁珠上, 当用抗体免疫沉淀A蛋白时, 与A蛋白相



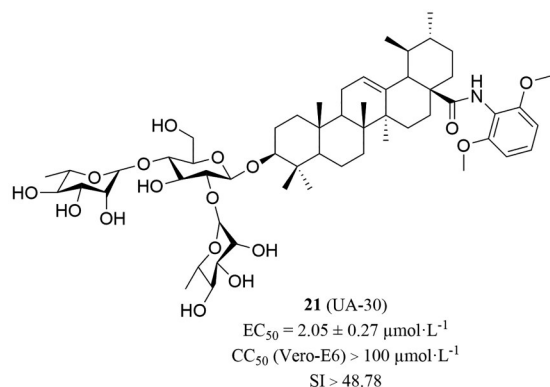
**Figure 21** Schematic diagram of co-immunoprecipitation (Co-PI)

互结合的蛋白质 B 也会一起沉淀下来。洗脱沉淀下来的蛋白后, 通过蛋白免疫印迹 (Western blot, WB) 或十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 对洗脱下来的蛋白进行鉴定和分析<sup>[63]</sup>。

早期研究已证实熊果酸 (ursolic acid, UA) 衍生物能在低微摩尔水平有效阻止 HIV 和流感病毒等多种包膜病毒的侵入过程<sup>[64,65]</sup>。2022 年, Li 等<sup>[66]</sup>在此基础上对 UA 进行了结构修饰, 活性测试表明 UA-30 (**21**, 图 22) 在 Vero-E6 细胞中抗 SARS-CoV-2 活性较高 ( $EC_{50} = 2.05 \pm 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 细胞毒性低 ( $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ); SPR 实验证明 UA-30 与 SARS-CoV-2 Spike 的亲和力高 ( $K_d = 0.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 这表明 S 蛋白是 UA-30 发挥抗 SARS-CoV-2 作用的主要靶标。为进一步探讨 UA-30 的准确作用位点, 研究人员进行了免疫共沉淀实验及 Western blot 实验, 结果显示 UA-30 不能阻断 S1 亚单位的受体结合域与人 ACE2 受体的相互作用, 说明 S1 并不是 UA-30 的作用位点。随后发现 UA-30 能够在 Vero E6 细胞系中以剂量依赖的方式显著地抑制融合巨细胞的形成, 表明其抗病毒特性可能与其阻断由 SARS-CoV-2 S2 亚基介导的膜融合作用相关。

### 2.3 虚拟筛选技术

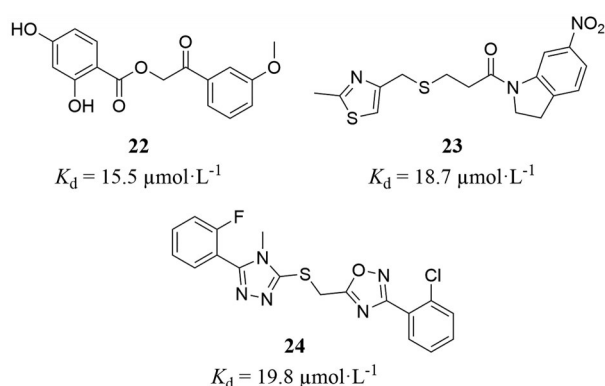
虚拟筛选 (virtual screening, VS) 是指在进行生物



**Figure 22** Chemical structure of compound **21**

活性筛选之前, 利用分子对接软件模拟靶点与候选分子间的结合模式和相互作用, 预测两者间的亲和力大小<sup>[67]</sup>, 以降低实际筛选化合物数目, 同时提高先导化合物发现效率。

2023 年, Wang 等<sup>[68]</sup>针对游离脂肪酸 (free fatty acids, FFA) 结合口袋, 采用基于结构的分层虚拟筛选发现了多类小分子 SARS-CoV-2 S 蛋白抑制剂。具体为, 首先对一个包含 323 426 种分子的 In-house 化合物库进行分子对接; 然后, 将评分靠前的 6 万个分子进行基于最小化的分子力学/泊松-波尔兹曼 (广义波恩) 表面积 (minimization-based molecular mechanics generalized-born surface area, MM-GB/SA) 计算和重新评分; 再逐个分析了排名靠前的 1 000 个结合构象, 并根据 SILCS FragMaps 标准筛选出 54 个化合物进行 SPR 实验验证。最终, 化合物 **22**~**24** 表现出较高的亲和力,  $K_d$  分别为 15.5、18.7 和 19.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (图 23)。



**Figure 23** Chemical structures of compounds **22**–**24**

三唑结构广泛存在于各种药物中<sup>[69]</sup>, 其衍生物具有抗菌、抗真菌、抗高血压、抗癌和抗病毒等广泛的药理作用, 引起普遍关注<sup>[70]</sup>。鉴于此, 2022 年, Al-Humaidi 等<sup>[71]</sup>利用 MOE 软件进行分子对接, 预测了 1,2,3-三氮唑-磺胺杂化产物与 SARS-CoV-2 S 蛋白和 Omicron S 蛋白的结合特性和亲和力, 并在细胞水平 (Vero E6) 具

有抗 SARS-CoV-2 活性。此外, 化合物 **25** (图 24) 能有效地抑制 SARS-CoV-2 ( $EC_{50} = 80.4 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), 且毒性低 ( $CC_{50} = 1\ 028.28 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )。

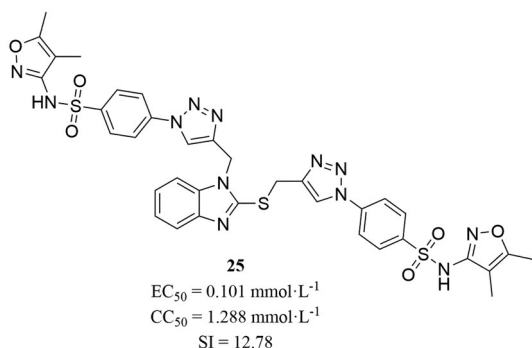


Figure 24 Chemical structure of compound **25**

2021 年, Xiong 等<sup>[72]</sup>首先依据 Pain 规则对 SPECS 数据库进行筛选, 将筛选出的 202 829 个化合物针对 SARS-CoV-2 Spike-RBD/h-ACE2 复合体的晶体结构进行虚拟筛选, 按照 SP 得分排名前 10% 化合物的结合模式, 以精确模式重新对接。再根据 XP 得分排名前 20% 的候选化合物进行聚类分析和目测筛选。最终, 109 个候选化合物被挑选出来, 购买进行生物测试。结果显示 DC-RA016 (**26**, 图 25) 和 DC-RA052 (**27**, 图 25) 对 SARS-CoV-2 Spike-RBD 和 h-ACE2 的结合具有中等的抑制作用,  $EC_{50}$  分别为  $26.63$  和  $62.08 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 且细胞 (HEK293 细胞) 毒性较低 ( $CC_{50}$  均大于  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。另外, 假病毒检测中 DC-RA016 和 DCR-A052 也表现出中等的抗病毒活性 ( $EC_{50}$  分别为  $22.44$  和  $68.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。

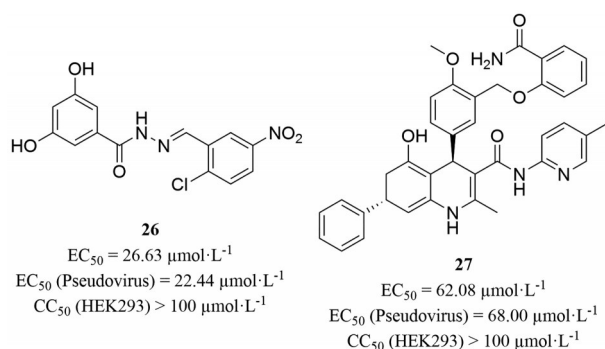


Figure 25 Chemical structures of compounds **26** and **27**

### 3 总结与展望

虽然疫情给人类社会带来的恐惧与危害正在逐渐褪去, 但我们仍处于新冠的“阴霾”下, 为预防危害性更强的变种毒株出现和疫情的反扑, 研发高效抗耐药的抗新冠小分子药物仍迫在眉睫。本文介绍了 SARS-CoV-2 S 蛋白结构及功能、综述了目前用于 SARS-CoV-2 S 蛋白抑制剂的活性筛选方法: 包括表面等离子共振

技术、差示扫描荧光技术、微量热泳动技术、等温滴定量热技术、生物膜干涉技术、等温荧光滴定技术、荧光寿命分析技术和均相时间分辨荧光技术等生物物理方法; 以及免疫组织化学检测技术、免疫荧光显微技术、细胞融合检测技术和免疫共沉淀技术等生物化学方法。此外, 还介绍了虚拟筛选方法在 S 蛋白配体发现中的应用。

不同方法在测试化合物与 S 蛋白亲和力、作用靶点、功能抑制等方面各有千秋。其中, 生物物理方法具有灵敏度高, 耗时短和用样量小等优势, 但存在操作难度较高、设备昂贵且后续数据处理复杂等不足; 生物化学方法操作简单、现象明显、可以直观地反应亲和力大小或抑制作用强弱。然而, 仍存在假阳/阴性概率高、重复实验耗时长、不能模拟复杂的体内环境等不足。因此, 多数研究往往需要联合运用生物物理和生物化学方法来验证结果的可靠性。值得关注的是, 随着类器官技术的不断成熟, 近期, 人呼吸道类器官模型已被用于评估 SARS-CoV-2 在人体呼吸道细胞的感染和复制能力<sup>[73]</sup>, 这预示着类器官药物在 SARS-CoV-2 侵入抑制剂筛选领域的潜力。

此外, SARS-CoV-2 由大量高度糖基化的蛋白质修饰<sup>[74]</sup>, S 蛋白的糖基化广泛影响病毒感染细胞的识别、穿透和结合<sup>[75,76]</sup>, 但绝大多数的活性筛选方法都未将 S 蛋白糖基化带来的屏蔽作用或其他影响涵盖在测试范围内, 这可能导致筛选出的高活性抑制剂在细胞水平测试时, 受 S 蛋白糖基化影响使得活性并不理想。

因此, 在未来研究中, 将生物物理及生物化学等多种方法进行综合评价, 开发更多高通量、高效率、低成本、低风险的活性筛选方法, 以减少误差较大、假阳性或假阴性的出现。此外, 需要深入探究 SARS-CoV-2 S 蛋白在不同条件下 (如温度、pH 值、离子浓度等) 及不同变异株中 (如 Alpha 株、Delta 株等) 发生构象变化或功能改变对抑制剂活性的影响机制。再者, 利用分子生物学技术表达出 S 蛋白的糖部分, 重现糖基化过程, 再结合不同筛选方法进行更严格的筛选以提高精准度。最后, 还需要加强对已知或潜在抑制剂 (如 ACE2 类似物、RBD 类似物、中和抗体等) 在临床试验中表现出来的有效性和安全性进行跟踪监测。

总之, 随着对病毒结构生物学研究的不断深入及药物设计策略应用的不断丰富, 再结合便捷、完整、高效的活性测试体系, 相信不久的将来可以实现通过靶向病毒 S 蛋白阻断侵入环节来“御病毒于国门之外”。

作者贡献: 胡立德和刘传峰负责全文的撰写; 李萍和董冠宇参与论文的修改; 刘新泳对论文进行整体的指导; 展鹏

对论文进行整体的指导和修改。

**利益冲突:** 所有作者均声明不存在利益冲突。

## References

- [1] Kaul D. An overview of coronaviruses including the SARS-2 coronavirus – molecular biology, epidemiology and clinical implications [J]. *Curr Med Res Pract*, 2020, 10: 54-64.
- [2] Li J, Jiang X, Xu S, et al. Medicinal chemistry strategies in seeking coronavirus inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 537-553.
- [3] Lipsitch M, Cohen T, Cooper B, et al. Transmission dynamics and control of severe acute respiratory syndrome [J]. *Science*, 2003, 300: 1966-1970.
- [4] Sharif-Yakan A, Kanj SS. Emergence of MERS-CoV in the Middle East: origins, transmission, treatment, and perspectives [J]. *PLoS Pathog*, 2014, 10: e1004457.
- [5] Chan JF, Kok KH, Zhu Z, et al. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 221-236.
- [6] Chen Y, Liu Q, Guo D. Emerging coronaviruses: Genome structure, replication, and pathogenesis [J]. *J Med Virol*, 2020, 92: 418-423.
- [7] V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 155-170.
- [8] Jackson CB, Farzan M, Chen B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23: 3-20.
- [9] Hu B, Guo H, Zhou P, et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2021, 19: 141-154.
- [10] Mediouni S, Mou H, Otsuka Y, et al. Identification of potent small molecule inhibitors of SARS-CoV-2 entry [J]. *SLAS Discov*, 2022, 27: 8-19.
- [11] Sabbah DA, Hajjo R, Bardaweel SK, et al. An updated review on SARS-CoV-2 main proteinase (M(pro)): protein structure and small-molecule inhibitors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2021, 21: 442-460.
- [12] Sun C, Zhang J, Wei J, et al. Screening, simulation, and optimization design of small molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein [J]. *PLoS One*, 2021, 16: e0245975.
- [13] Wei YJ. Efficacy of low molecular weight heparin sodium in patients with chronic pulmonary heart disease [J]. *China Med Pharm (中国医药科学)*, 2021, 11: 197-199.
- [14] Shankaran DR, Gobi KV, Sakai T, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for highly sensitive detection of 2,4,6-trinitrotoluene [J]. *Biosens Bioelectron*, 2005, 20: 1750-1756.
- [15] Shin YH, Jeong K, Lee J, et al. Inhibition of ACE2-spike interaction by an ACE2 binder suppresses SARS-CoV-2 entry [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2022, 61: e202115695.
- [16] Wang Q, Wang L, Zhang Y, et al. Probing the allosteric inhibition mechanism of a spike protein using molecular dynamics simulations and active compound identifications [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 2827-2835.
- [17] Singh SK, Singh S, Singh R. Targeting novel coronavirus SARS-CoV-2 spike protein with phytoconstituents of *Momordica charantia* [J]. *J Ovarian Res*, 2021, 14: 126.
- [18] Niesen FH, Berglund H, Vedadi M. The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2: 2212-2221.
- [19] Rosa N, Ristic M, Seabrook SA, et al. Meltdown: a tool to help in the interpretation of thermal melt curves acquired by differential scanning fluorimetry [J]. *J Biomol Screen*, 2015, 20: 898-905.
- [20] Schmidt D, Hakeem Said I, Ohl N, et al. Investigating the interaction between dietary polyphenols, the SARS CoV-2 spike protein and the ACE-2 receptor [J]. *Food Funct*, 2022, 13: 8038-8046.
- [21] Bojadzic D, Alcazar O, Chen J, et al. Small-molecule inhibitors of the coronavirus spike: ACE2 protein-protein interaction as blockers of viral attachment and entry for SARS-CoV-2 [J]. *ACS Infect Dis*, 2021, 7: 1519-1534.
- [22] Mao Y, Yu L, Yang R, et al. A novel method for the study of molecular interaction by using microscale thermophoresis [J]. *Talanta*, 2015, 132: 894-901.
- [23] Ekins S, Mottin M, Ramos P, et al. Déjà vu: stimulating open drug discovery for SARS-CoV-2 [J]. *Drug Discov Today*, 2020, 25: 928-941.
- [24] Gawriljuk VO, Zin PPK, Puhl AC, et al. Machine learning models identify inhibitors of SARS-CoV-2 [J]. *J Chem Inf Model*, 2021, 61: 4224-4235.
- [25] Velazquez-Campoy A, Freire E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1: 186-191.
- [26] Okhrimenko O, Jelesarov I. A survey of the year 2006 literature on applications of isothermal titration calorimetry [J]. *J Mol Recognit*, 2008, 21: 1-19.
- [27] Falconer RJ, Penkova A, Jelesarov I, et al. Survey of the year 2008: applications of isothermal titration calorimetry [J]. *J Mol Recognit*, 2010, 23: 395-413.
- [28] Liang Y. Applications of isothermal titration calorimetry in protein science [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40: 565-576.
- [29] Mazalovska M, Kouokam JC. Lectins as promising therapeutics for the prevention and treatment of HIV and other potential coinfections [J]. *Biomed Res Int*, 2018, 2018: 3750646.
- [30] Keyaerts E, Vijgen L, Pannecouque C, et al. Plant lectins are potent inhibitors of coronaviruses by interfering with two targets in the viral replication cycle [J]. *Antiviral Res*, 2007, 75:

- 179-187.
- [31] Muñoz-Basagoiti J, Monteiro FLL, Krumpal LRH, et al. Cyanovirin-N binds to select SARS-CoV-2 spike oligosaccharides outside of the receptor binding domain and blocks infection by SARS-CoV-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2214561120.
- [32] Chen GY, Pan YC, Wu TY, et al. Potential natural products that target the SARS-CoV-2 spike protein identified by structure-based virtual screening, isothermal titration calorimetry and lentivirus particles pseudotyped (Vpp) infection assay [J]. *J Tradit Complement Med*, 2022, 12: 73-89.
- [33] Hihara S, Taoka M, Tanaka M, et al. Visual responsiveness of neurons in the secondary somatosensory area and its surrounding parietal operculum regions in awake macaque monkeys [J]. *Cereb Cortex*, 2015, 25: 4535-4550.
- [34] Coghi P, Yang LJ, Ng JPL, et al. A drug repurposing approach for antimalarials interfering with SARS-CoV-2 spike protein receptor binding domain (RBD) and human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14: 954.
- [35] Yang L, Chen R, Hamdoun S, et al. Corilagin prevents SARS-CoV-2 infection by targeting RBD-ACE2 binding [J]. *Phytomedicine*, 2021, 87: 153591.
- [36] Xiang J, Liang Y, Chen N. Studies on the binding of sodium dodecyl sulfate to cellulase by isothermal titration calorimetry and fluorescence titration [J]. *Acta Chim Sin (化学学报)*, 2003, 61: 1949-1954.
- [37] Kim SY, Jin W, Sood A, et al. Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions [J]. *Antiviral Res*, 2020, 181: 104873.
- [38] Zhang Q, Chen CZ, Swaroop M, et al. Heparan sulfate assists SARS-CoV-2 in cell entry and can be targeted by approved drugs *in vitro* [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 80.
- [39] Clausen TM, Sandoval DR, Spliid CB, et al. SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2 [J]. *Cell*, 2020, 183: 1043-1057.
- [40] Ennemoser M, Rieger J, Muttenthaler E, et al. Enoxaparin and pentosan polysulfate bind to the SARS-CoV-2 spike protein and human ACE2 receptor, inhibiting vero cell infection [J]. *Biomedicines*, 2021, 10: 49.
- [41] Balasubramanian A, Teramoto T, Kulkarni AA, et al. Antiviral activities of selected antimalarials against dengue virus type 2 and Zika virus [J]. *Antiviral Res*, 2017, 137: 141-150.
- [42] Ratnapriya S, Braun AR, Cervera Benet H, et al. Broad tricyclic ring inhibitors block SARS-CoV-2 spike function required for viral entry [J]. *ACS Infect Dis*, 2022, 8: 2045-2058.
- [43] Roth D, Benz J, Grether U, et al. Homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer (TR-FRET) cofactor recruitment assay for PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2576: 155-169.
- [44] Li C, Zhou H, Guo L, et al. Potential inhibitors for blocking the interaction of the coronavirus SARS-CoV-2 spike protein and its host cell receptor ACE2 [J]. *J Transl Med*, 2022, 20: 314.
- [45] Cecon E, Burridge M, Cao L, et al. SARS-CoV-2 spike binding to ACE2 in living cells monitored by TR-FRET [J]. *Cell Chem Biol*, 2022, 29: 74-83.
- [46] Mona CE, Benz MR, Hikmat F, et al. Correlation of  $^{68}\text{Ga}$ -FAPi-46 pet biodistribution with fap expression by immunohistochemistry in patients with solid cancers: interim analysis of a prospective translational exploratory study [J]. *J Nucl Med*, 2022, 63: 1021-1026.
- [47] Song M, Park HJ. Anti-inflammatory effect of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice on dextran sodium sulfate-induced acute colitis in mice and LPS-activated macrophages [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154: 311-318.
- [48] Chandimali N, Huynh DL, Jin WY, et al. Combination effects of hispidin and gemcitabine *via* inhibition of stemness in pancreatic cancer stem cells [J]. *Anticancer Res*, 2018, 38: 3967-3975.
- [49] Kong S, Li J, Li S, et al. Anti-aging effect of chitosan oligosaccharide on d-galactose-induced subacute aging in mice [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16: 181.
- [50] Chien LH, Deng JS, Jiang WP, et al. Study on the potential of sanghuangporus sanghuang and its components as COVID-19 spike protein receptor binding domain inhibitors [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113434.
- [51] Li Q, Yi D, Lei X, et al. Corilagin inhibits SARS-CoV-2 replication by targeting viral RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11: 1555-1567.
- [52] Hirano M, Ando R, Shimozono S, et al. A highly photostable and bright green fluorescent protein [J]. *Nat Biotechnol*, 2022, 40: 1132-1142.
- [53] Yi Y, Li J, Lai X, et al. Natural triterpenoids from licorice potentially inhibit SARS-CoV-2 infection [J]. *J Adv Res*, 2022, 36: 201-210.
- [54] Li H, Sun J, Xiao S, et al. Triterpenoid-mediated inhibition of virus-host interaction: is now the time for discovering viral entry/release inhibitors from nature? [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 15371-15388.
- [55] Murae M, Shimizu Y, Yamamoto Y, et al. The function of SARS-CoV-2 spike protein is impaired by disulfide-bond disruption with mutation at cysteine-488 and by thiol-reactive *N*-acetyl-cysteine and glutathione [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2022, 597: 30-36.
- [56] Kloc M, Subudhi A, Uosef A, et al. Monocyte-macrophage lineage cell fusion [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 6553.
- [57] Johansen LM, DeWald LE, Shoemaker CJ, et al. A screen of approved drugs and molecular probes identifies therapeutics with anti-Ebola virus activity [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 290ra289.

- [58] Chen Y, Wu Y, Chen S, et al. Sertraline is an effective SARS-CoV-2 entry inhibitor targeting the spike protein [J]. *J Virol*, 2022, 96: e0124522.
- [59] Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study [J]. *Lancet*, 2020, 395: 1054-1062.
- [60] Zhu L, She ZG, Cheng X, et al. Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and pre-existing type 2 diabetes [J]. *Cell Metab*, 2020, 31: 1068-1077.
- [61] Tong L, Xiao X, Li M, et al. A glucose-like metabolite deficient in diabetes inhibits cellular entry of SARS-CoV-2 [J]. *Nat Metab*, 2022, 4: 547-558.
- [62] Manček-Keber M, Hafner-Bratkovič I, Lainšček D, et al. Disruption of disulfides within RBD of SARS-CoV-2 spike protein prevents fusion and represents a target for viral entry inhibition by registered drugs [J]. *FASEB J*, 2021, 35: e21651.
- [63] Fan T, Fan X, Ma C, et al. Applications of co-immunoprecipitation technique [J]. *Chin J Acupunct Moxib Electron Ed (中华针灸电子杂志)*, 2014, 3: 13-16.
- [64] Song G, Shen X, Li S, et al. Structure-activity relationships of 3-*O*- $\beta$ -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel H5N1 entry inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 93: 431-442.
- [65] Xiao S, Tian Z, Wang Y, et al. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives [J]. *Med Res Rev*, 2018, 38: 951-976.
- [66] Li H, Cheng C, Shi S, et al. Identification, optimization, and biological evaluation of 3-*O*- $\beta$ -chacotriosyl ursolic acid derivatives as novel SARS-CoV-2 entry inhibitors by targeting the prefusion state of spike protein [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 238: 114426.
- [67] Singh N, Chaput L, Villoutreix BO. Virtual screening web servers: designing chemical probes and drug candidates in the cyberspace [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: 1790-1818.
- [68] Wang Q, Meng F, Xie Y, et al. *In silico* discovery of small molecule modulators targeting the Achilles' heel of SARS-CoV-2 spike protein [J]. *ACS Cent Sci*, 2023, 9: 252-265.
- [69] Denora N, Trapani A, Laquintana V, et al. Recent advances in medicinal chemistry and pharmaceutical technology--strategies for drug delivery to the brain [J]. *Curr Top Med Chem*, 2009, 9: 182-196.
- [70] Dheer D, Singh V, Shankar R. Medicinal attributes of 1,2,3-triazoles: current developments [J]. *Bioorg Chem*, 2017, 71: 30-54.
- [71] Al-Humaidi JY, Shaaban MM, Rezki N, et al. 1,2,3-Triazole-benzofused molecular conjugates as potential antiviral agents against SARS-CoV-2 virus variants [J]. *Life (Basel)*, 2022, 12: 1341.
- [72] Xiong J, Xiang Y, Huang Z, et al. Structure-based virtual screening and identification of potential inhibitors of SARS-CoV-2 S-RBD and ACE2 interaction [J]. *Front Chem*, 2021, 9: 740702.
- [73] Li C, Huang J, Yu Y, et al. Human airway and nasal organoids reveal escalating replicative fitness of SARS-CoV-2 emerging variants [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, 120: e2300376120.
- [74] Gong Y, Qin S, Dai L, et al. The glycosylation in SARS-CoV-2 and its receptor ACE2 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2021, 6: 396.
- [75] Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, et al. Beyond shielding: the roles of glycans in SARS-CoV-2 spike protein [J]. *bioRxiv*, 2020. DOI: 10.1101/2020.06.11.146522.
- [76] Grant OC, Montgomery D, Ito K, et al. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 14991.