

靶向 SARS-CoV-2 PL^{pro} 抑制剂的研究进展

高雨, 张国宁, 王玉成* (中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: 2019 年末, 新型冠状病毒(SARS-CoV-2), 即严重急性呼吸系统综合征冠状病毒 2 席卷全球, 对社会经济和人类健康造成了不可逆转的危害, 相应的抗病毒药物研发也因此受到了广泛关注。SARS-CoV-2 主要通过飞沫传播, 并在宿主细胞内经历复制、转录与翻译过程后, 以胞吞形式排出成熟病毒, 构成感染闭环。值得注意的是, 非结构蛋白 3 (nsp3) 编码的木瓜蛋白酶样蛋白酶(PL^{pro})在这个过程中发挥着重要作用。同时在去泛素化等炎症反应中, PL^{pro}也会帮助病毒逃避相应的免疫反应。因此, 靶向抑制 PL^{pro}, 不仅能够阻断病毒整体的复制过程, 也可以恢复宿主自身的免疫功能, 从而达到更好的抗 SARS-CoV-2 效果。综上, 本文拟从化合物的不同结构出发, 对近年来靶向 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的抑制剂研究进行探索性总结, 以期为抗 SARS-CoV-2 的药物发现提供理论参考。

关键词: 新型冠状病毒; 木瓜蛋白酶样蛋白酶靶点; 抑制剂; 治疗药物

doi: 10. 11669/cpj. 2024. 23. 002 **中图分类号:** R914 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001 - 2494 (2024) 23 - 2205 - 11

Research Progress in SARS-CoV-2 PL^{pro} Inhibitors

GAO Yu, ZHANG Guoning, WANG Yucheng* (*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences & Perking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: Since the end of 2019, the new coronavirus swept the world, causing irreversible harm to social economy and human health, so the search for corresponding antiviral drugs has aroused wide attention. SARS-CoV-2 is mainly transmitted by droplets, and after the process of replication, transcription and translation in the host cell, the mature virus is excreted in the form of endocytosis, forming a closed loop of infection. Notably, the papain like protease (PL^{pro}) encoded by non-structural protein 3 (nsp3) plays an important role in this process. At the same time, PL^{pro} also helps the virus evade the corresponding immune response in inflammatory reactions such as deubiquitination. Therefore, targeted inhibition of PL^{pro} can not only block the overall replication process of the virus, but also restore the host's own immune function, so as to achieve a better anti-SARS-CoV-2 effect. In summary, based on the different structures of the compounds, this paper intends to conduct an exploratory summary of the recent studies on inhibitor targeting SARS-CoV-2 PL^{pro}, in order to provide theoretical reference for the discovery of anti-SARS-CoV-2 drugs.

KEY WORDS: SARS-CoV-2; PL^{pro} target; inhibitor; therapeutic drug

2019 年, 新型冠状病毒感染暴发引起了人们对冠状病毒的再次关注, 新型冠状病毒(严重急性呼吸综合征冠状病毒 2, SARS-CoV-2)是导致这一灾难的罪魁祸首。追溯回 2003 年, SARS 病毒引起了非典流行, 此后诸如 HKU1-CoV、MERS-CoV 等冠状病毒被发现^[1]。根据国际病毒分类委员会标准, 这是一类同属 Nidovirales 目 Coronaviridae 科 Torovirinae 亚科 β -Sarbecovirus 亚属的冠状病毒。研究发现^[2], 这些病毒发生所涉及的起始传播物种来源(如蝙蝠等)具有一定的相似性, 且大多都为可以通过飞沫传播的人畜共患病毒, 感染后常伴有发热、咳嗽以及呼吸急促等特征症状^[3-4]。

SARS 病毒的生命周期过程非常复杂, 可以将其粗略分为: 进入宿主细胞、释放病毒基因、翻译相关蛋白、组装病毒

颗粒和胞吐释放病毒 5 个步骤。SARS-CoV-2 病毒, 是一类大小约 30kb 的单股正链 RNA 包膜粒子, 其中包含 4 个结构蛋白^[5]。进入体内后, 病毒粒子首先与人细胞表面的血管紧张素受体 2 (ACE2) 结合, 在丝氨酸蛋白酶 TMPRSS2 的参与激活下^[6]切割病毒刺突蛋白(S), 使其进入细胞内。随后为了复制病毒基因组, 存在于病毒基因组 5'端非翻译区的 2 个开放阅读框(ORF1a 和 ORF1b)会对所释放出的病毒 RNA 基因组进行翻译, 以此产生多蛋白 pp1a 与 pp1ab。这是一个繁琐的过程, 但可以简单理解为: 核糖体在两个阅读框移动的过程中, 如果 RNA 假结被解开, 那么停止密码子将会发挥作用, 翻译也随之停止形成 pp1a; 而少数情况下则会滑动至 5'-UUAAAC-3'融化假结, 再向后移动一个核苷位, 导致阅读框后移形成 pp1ab。在此之后, 两种半胱氨酸蛋白酶: 木瓜蛋

作者简介: 高雨, 女, 博士研究生 研究方向: 微生物与生化药理学
药物化学 Tel: (010)63165236

*** 通讯作者:** 王玉成, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究员 研究方向:

白酶样蛋白酶(PL^{pro})与凝乳蛋白酶样蛋白酶(3CL^{pro},又称M^{pro})会裂解多蛋白为单蛋白,释放出非结构蛋白(nsps)。Nsps又进一步组合成复合物,进行结构蛋白的翻译。最终非

结构蛋白与结构蛋白经过一系列组装形成成熟的病毒粒子,并通过胞吐作用从细胞中释放,再次感染临近细胞^[7-10]。过程见图1。

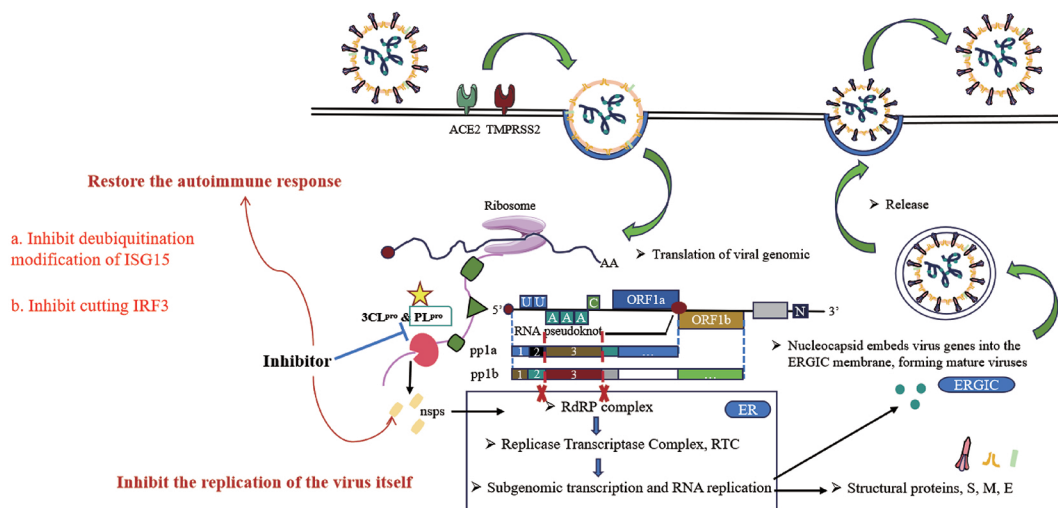


图1 新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的复制过程以及木瓜蛋白酶样蛋白酶(PL^{pro})抑制剂的作用靶点示意图

SARS-CoV-2的突然暴发对社会经济等方面造成了极大的冲击。同时由于其突变频率高、传播速率快等特点,也对公众健康具有一定程度的持续威胁。现阶段已有部分药物被紧急授权,但是,单一的治疗药物无法满足此类病毒导致的治疗需求。

因此,寻找治疗该类冠状病毒药物的研究仍然需要继续得到重视。

1 PL^{pro}的结构和作用

多蛋白的切割导致非结构蛋白的释放,这一过程在病毒复制的生命周期中至关重要。尤其对于该步骤中的关键元件PL^{pro}或3CL^{pro}的抑制,将对病毒后续整个复制过程产生毁灭性影响。然而PL^{pro}和3CL^{pro}两种蛋白酶之间虽然功能类似,却在基因编码与切割机制上存在一定的差异。其中3CL^{pro}是由nsp5编码,并切割nsp5-16位点;而PL^{pro}则是通过自切割从nsp3释放,然后切割nsp1/2、nsp2/3、nsp3/4之间的位点。

总的来说,抑制这两类蛋白酶均会影响病毒复制。但与3CL^{pro}相比,PL^{pro}还会参与炎症反应中细胞风暴的抑制过程^[11],这意味着靶向PL^{pro}的抑制剂(药物分子)将可以通过阻碍病毒生命周期和恢复宿主自身免疫的双重机制来发挥更好的治疗效果,见图1。因此,PL^{pro}常被作为探寻抗SARS-CoV-2病毒药物的主要靶点之一。

1.1 PL^{pro}结构

PL^{pro}是SARS-CoV-2中最大非结构蛋白Nsp3(212)的8个结构域之一。有研究表明,SARS-CoV PL^{pro}与SARS-CoV-2 PL^{pro}两者间的总体序列同源率为79%,而SARS-CoV-2 PL^{pro}与MERS-CoV PL^{pro}同源率仅为50%^[12]。尽管如此,SARS-

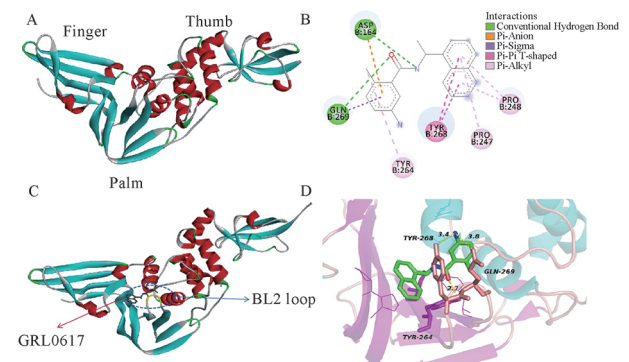
CoV PL^{pro}与SARS-CoV-2 PL^{pro}仍存在一定差异,如:与SARS-CoV PL^{pro}相比,SARS-CoV-2 PL^{pro}的去泛素活性降低,主要表现在k48连接的Ub链水解作用减弱。但值得注意的是,SARS-CoV-2 PL^{pro}的去糖基化活性较之SARS-CoV PL^{pro}却表现出增强的效果。

此类半胱氨酸蛋白酶由N端泛素化结构域(Ubl结构域)与催化结构域组成,换言之,PL^{pro}就是通过其半胱氨酸蛋白酶活性发挥作用。催化结构域是1个类似右手拇指-手掌-手指结构,由4个α螺旋(右手拇指)、6个β折叠(手掌)以及4个反平行的β折叠(手指)构成。锌离子在手指结构域内与其中的4个半胱氨酸残基(Cys189-X-X-Cys192-Xn-Cys224-X-Cys226)配位形成的四面体结构对于酶的活性至关重要。催化结构域的活性位点则位于拇指与手掌子域之间的α螺旋与β折叠间隙内,由半胱氨酸(Cys111)作为亲核试剂、组氨酸(His272)作为一般酸碱、天冬氨酸(Asp286)作为半胱氨酸去质子化辅助残基组成了催化三联体。此外,在催化活性位点附近还存在由6-氨基酸(残基267-272)组成的柔性阻断环2(BL2),可以根据Cys270/Cys271的质子化状态打开或关闭,从而决定配体能否进入活性中心。总的来说,PL^{pro}共形成S4~S1四个活性口袋,其中S1与S2特异性较强,只能以甘氨酸残基结合,这也是为什么已报道的大多数PL^{pro}抑制剂均为非共价抑制剂的原因,而S3口袋则以正电疏水残基为主,S4口袋仅容纳疏水残基^[13-19],见图2。

1.2 PL^{pro}作用

SARS-CoV、SARS-CoV-2、MERS-CoV等冠状病毒编码的PL^{pro}可以切割多蛋白为非结构蛋白(nsp1-nsp3),从而对病毒生命周期产生相应影响。此外,也有研究发现,泛素特异性蛋白酶(USP)亚家族真核去泛素化酶的催化结构域与PL^{pro}

的结构域也表现出了一定的相似性,其切割特异性是针对含有一致序列的(R/K)LXGG的柔性多肽^[16,20]。Klemm等^[21]的研究表明,冠状病毒可以通过与PL^{pro}作用抑制先天性免疫途径,进一步促进病毒的生成,这主要是通过去除干扰素刺激基因产物15(ISG15)蛋白的泛素化修饰实现。Moustaqil等^[22]则首次揭示了干扰素因子3(IRF3)在体外可以被PL^{pro}切割。作为I型干扰素产生和应答的主要因子,IRF3对巨噬细胞与自然杀伤细胞引发的抗病毒效应至关重要,因此,PL^{pro}这一作用效果将破坏体内本身的病毒排斥反应,进一步促进病毒在体内的感染。



A - 蛋白酶结构示意图 PDB:7d47; B ~ D - 蛋白酶与 GRL0617 结合示意图 PDB:7ejm。

图2 PL^{pro}结构示意图

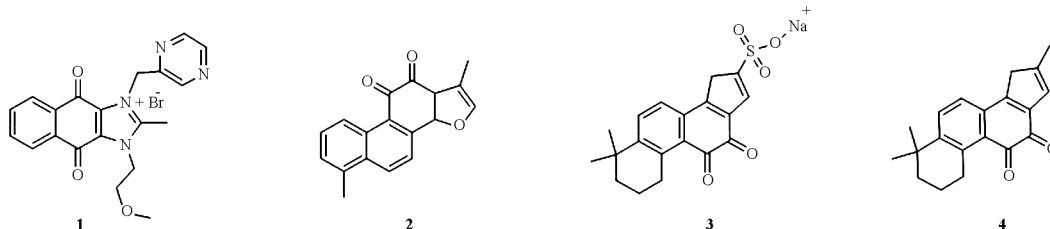


图3 含醌类的 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[23-26]

2.2 含萘类与其他类结构化合物

2.2.1 GRL0617结构与PL^{pro}的结合模式

GRL0617是一种靶向SARS-CoV PL^{pro}的有效抑制剂,因SARS-CoV与SARS-CoV-2的高度序列同源性,可作为SARS-CoV-2 PL^{pro}的靶向抑制剂^[27]。Zhao等^[23]对GRL0617(化合物5, IC₅₀ = 1.39 μmol · L⁻¹)与蛋白酶的分子模拟结果也证实了这一点(图4)。

非共价抑制剂GRL0617^[28],结合时位于PL^{pro}泛素特异性蛋白的USP结构域,通过阻断ISG15 C端与PL^{pro}的结合、抑制ISG15的去泛素化效应和避免免疫应答反应的下调来抑制病毒的复制^[29]。同时PL^{pro}活性位点的一系列氢键和疏水作用也进一步稳定了两者的结合作用^[30]。

Rao等^[31]揭示了GRL0617与PL^{pro}的结合模式:其中,裸露的伯氨基与SARS-CoV-2的Asp164、酰胺羰基与SARS-CoV-2的Gln269,以及酰胺羰基的仲胺基和水分子与SARS-CoV-2的Tyr273残基均形成了强的氢键结合。此外,萘环与苯环的π-π共轭也会与SARS-CoV-2的Tyr268产生相互作用。

综上,PL^{pro}在SARS病毒的成熟、宿主炎症反应的发生与自身免疫抑制反应的降低等多方面发挥着重要作用,是一个治疗SARS-CoV-2的潜在药物靶标。

2 PL^{pro}抑制剂

本节根据化合物不同结构分类介绍近期针对SARS-CoV-2 PL^{pro}的抑制剂研究。

2.1 含醌类结构化合物

为了确定靶向SARS-CoV-2 PL^{pro}的先导物,Zhao等^[23]通过高通量筛选获得了一系列化合物,最终指出YM155[化合物1,半数抑制常数(IC₅₀) = 2.47 μmol · L⁻¹]、丹参酮(化合物2, IC₅₀ = 2.21 μmol · L⁻¹)对PL^{pro}表现出一定的抑制活性。Xu等^[24]利用已建立的筛选技术,发现了丹参酮II A磺酸钠(化合物3, IC₅₀ = 1.65 μmol · L⁻¹)可以与PL^{pro}发生直接相互作用。然而值得注意的是,磺酰基在抑制剂的活性构象中占据了关键位置,这可能与参与核心环形成或与影响侧链结合相关,例如:当没有磺酰基存在时,丹参酮II A(化合物4)将失去抑制活性^[25]。之后Ma和Wang两位学者^[26]对YM155、丹参酮以及相关类似物如隐丹参酮等醌类化合物做了相关机制研究,研究表明,这是一类非特异性的PL^{pro}抑制剂,以致蛋白酶变性的方式使其失活,然而遗憾的是,此类化合物在细胞水平的PL^{pro}抑制作用微乎其微,仍需要进一步地深入探索。化合物结构见图3。

笔者利用Discovery Studio软件对这一结合模式加以验证,结果见图2。据此,他们设计了一个具有相同萘基团的可能化合物6(图4),分子动力学模拟显示其与SARS-CoV-2 PL^{pro}的Tyr268结合高于对照,且在蛋白结合间隙中存在更多的氨基酸相互作用。这说明化合物6将可能是一个更有效的PL^{pro}抑制剂先导化合物。此外,Gao等^[32]的研究表明,GRL0617的结合还诱导了PL^{pro} BL2环的关闭,使得底物结合间隙缩小,从而阻止与底物LXGG的结合。

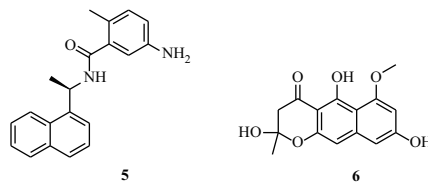


图4 化合物5(GRL0617)和含萘类的PL^{pro}抑制剂6的结构示意图^[23,31]

2.2.2 GRL0617 的代谢途径及其他类结构衍生化合物 在 GRL0617 的骨架基础上引入乙酰基即得 HY17542 (化合物 **5a**), 因其在体内快速去乙酰化成为 GRL0617, 所以亦可以作为 PL^{pro} 的靶向抑制剂。Cho 等^[33] 在体外对 GRL0617 与 HY-17542 的药物代谢进行了相关检测, 并揭示出 GRL0617

的代谢途径, 结果表明, GRL0617 在 I 期代谢中半衰期小于 30 min, 这说明 GRL0617 具有较高的清除率。重组酶实验也证实了一些代谢酶 (如: CYP3A4、CYP3A5、CYP2D6) 将在其中参与 GRL0617 的消除以及羟基化代谢物的形成过程, 见图 5。

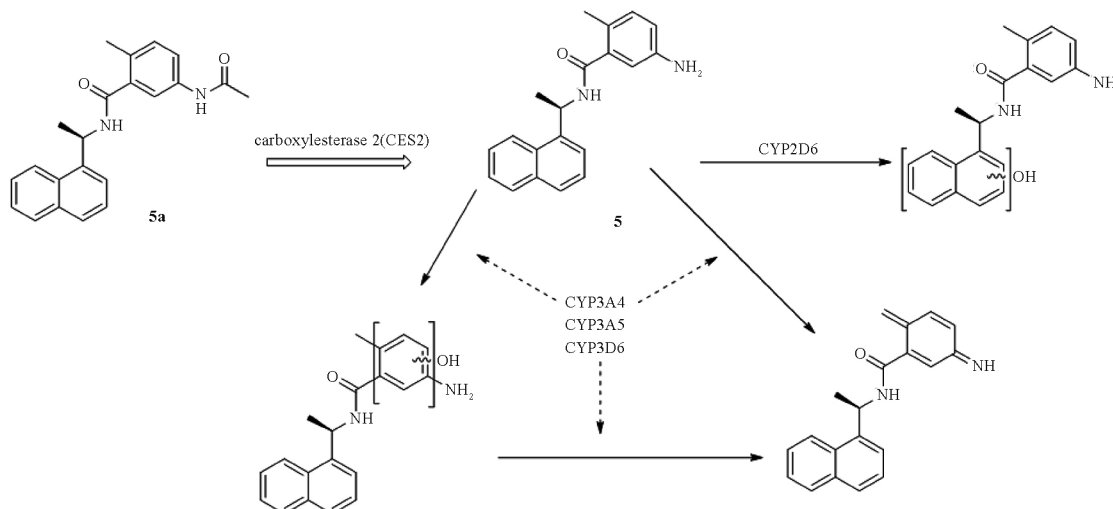


图 5 GRL0617 的代谢消除示意图^[33]

随后, 根据 GRL0617, 研究者们发现了一系列具有类似结构而非萘骨架的多种化合物, 在计算机模拟与实验验证中均获得了较好的结果。

Sayaf 等^[34] 首先通过模拟结合确定了类似化合物 **7** 的分子对接模型, 指出其对对接得分高于 GRL0617, 并鼓励对该系列化合物进行体外和体内的实验验证。Patel 等^[27] 从 ZINC 数据库中收集化合物, 同时筛选出与 GRL0617 有相似结构的系列化合物, 再利用分子动力学模拟研究了化合物 **8** 作为最佳配体与蛋白的稳定结合作用, 这为该抑制剂的研究提供了基础数据支持。

为了进一步提高抗病毒效力, Shen 等^[35] 以 GRL0617 为起始支架, 保留苯酰胺与 BL2 环残基的氢键结合网络, 设计了一系列新型 2-苯基噻吩 PL^{pro} 抑制剂, 使其抗病毒效力和蛋白酶结合亲和力较 GRL0617 ($IC_{50} = 1.61 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 而言提高了约十倍。这是一种利用多个浅结合位点的协同性设计策略, 他们从中成功获得化合物 **9** ($IC_{50} = 0.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **10** ($IC_{50} = 0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 预测可以作为有效 PL^{pro} 抑制剂开发的先导。Wu 等^[36] 在研究中采用了比 GRL0617 结合更好的 XR8-89 作为对照筛选, 通过测试大量化合物取得初步成功。XR8-89 (化合物 **11**, $IC_{50} = 0.113 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 作为 GRL-0617 的衍生物之一, 在其中表现出良好的蛋白活性抑制效率。此外, Ayoup 等^[37] 还以 GRL0617 为先导, 利用非经典同分异构体 1,2,4-噁二唑取代酰胺主链, 通过调整支架对病毒靶标的效力, 证明了化合物 **12** 可以作为双重靶向 SARS-CoV-2 PL^{pro} ($IC_{50} = 7.197 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和刺突蛋白的有效抑制剂, 这为进一步优化 PL^{pro} 抑制剂、多角度改善抗病毒活性

提供了优化思路(图 6)。

2.2.3 GRL0617 的含萘类结构衍生化合物 Ghosh 等^[30] 报道了一类新型可逆非共价抑制剂, 代表性化合物 GRL0687 (化合物 **13**, $IC_{50} = 0.56 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SARS-CoV-1) 具有一定的抗 PL^{pro} 活性。将 GRL0617 的氨基替换为二甲氨基, 得到的化合物 **14** ($IC_{50} = 0.36 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SARS-CoV-1; $IC_{50} = 0.48 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, SARS-CoV-2), 表现出显著提高的抗病毒活性。以 GRL0687/GRL0617 为支架, Castillo-Campos 等^[38] 利用分子模拟的方法研究了 67 种萘衍生非共价抑制剂, 据此提出了可能的有效配合物, 其中化合物 **15**、**16** 预测得分较好。Amin 等^[39] 以 GRL0687 与 GRL0617 为先导合成了系列化合物, 代表化合物如: 衍生物 **17** ($IC_{50} = 0.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **18** ($IC_{50} = 0.46 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 衍生物 **15** ($IC_{50} = 0.39 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**16** ($IC_{50} = 0.58 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**19** ($IC_{50} = 0.47 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 均展示出了良好的 PL^{pro} 抑制活性, 这与 Campos 的研究结果一致。同时, 他们也对此类化合物进行了构效关系分析, 指出: ①萘基与嘧啶片段对于活性残基结合的相互作用至关重要; ②甲基的立体构型是调节 PL^{pro} 结合亲和力的关键因素; ③苯环上的 5-氨基和卤素取代更有利于 PL^{pro} 的抑制活性, 这为含萘环的 PL^{pro} 抑制剂设计提供了理论思路。

相应地, Calleja 等^[40] 报道了新型含萘环的嘧啶支架抑制剂 **20** ($IC_{50} = 1.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **21** ($IC_{50} = 0.79 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 研究表明, 与 GRL0617 相比, 化合物 **21** 可以更加有效地抑制 SARS-CoV-2 PL^{pro}。Sanders 等^[41-42] 在 GRL0617 的类似物上引入了拟肽连接剂和亲电性反应试剂, 从而设计出一系列共

价抑制剂,其中抑制剂 **22** ($IC_{50} = 0.094 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **23** ($IC_{50} = 0.230 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 PL^{pro} 的抑制活性显著提升。这说明共价结合在高效抑制剂设计中的重要意义。此外,

Shan 等^[43]还确定了蛋白结合共晶结构,在此基础上优化系列化合物,从中得到了一种有效的选择性 SARS-CoV-2 PL^{pro} 抑制剂 **24** ($IC_{50} = 0.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

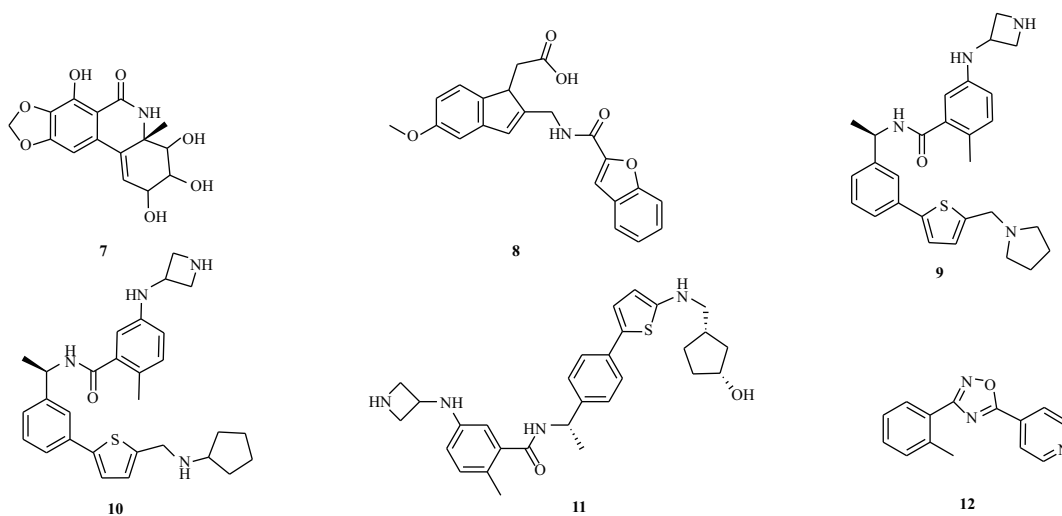


图6 GRL0617 衍生的其他类 PL^{pro} 抑制剂结构示意图^[27,34-37]

尽管目前对 GRL0617 已经进行了很多改造设计与合成,但化合物对酶的抑制活性改善仍然没有展示出非常明显的优势,这也是该类研究面临的一大挑战,原因可能在于该类结构的抑制剂在 PL^{pro} 上缺乏 S1/S2 的结合口袋。基于此, Ma 等^[44]对设计合成的系列化合物进行了分子对接,研究表明,与 GRL0617 相比,用烷基将酰基替换后的化合物 **25** ($IC_{50} = 0.64 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和化合物 **26** ($IC_{50} = 0.67 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对

受体结合区产生了影响,即氨基与 Asp164 侧链、Arg166 发生了氢键相互作用。此外,配体还与 Tyr264 形成了新的 T 形 $\Pi-\Pi$ 共轭,这区别于 GRL0617 中的 Tyr268 催化活性位点,同时还在萘环与 Pro246 之间形成了疏水作用。以上 2 个发现,共同解释了化合物 **25** 和 **26** 抑制效力高于 GRL0617 的原因,佐证了上述 GRL0617 衍生物因缺乏与 PL^{pro} 结合的口袋,而活性改善较弱的观点(图 7)。

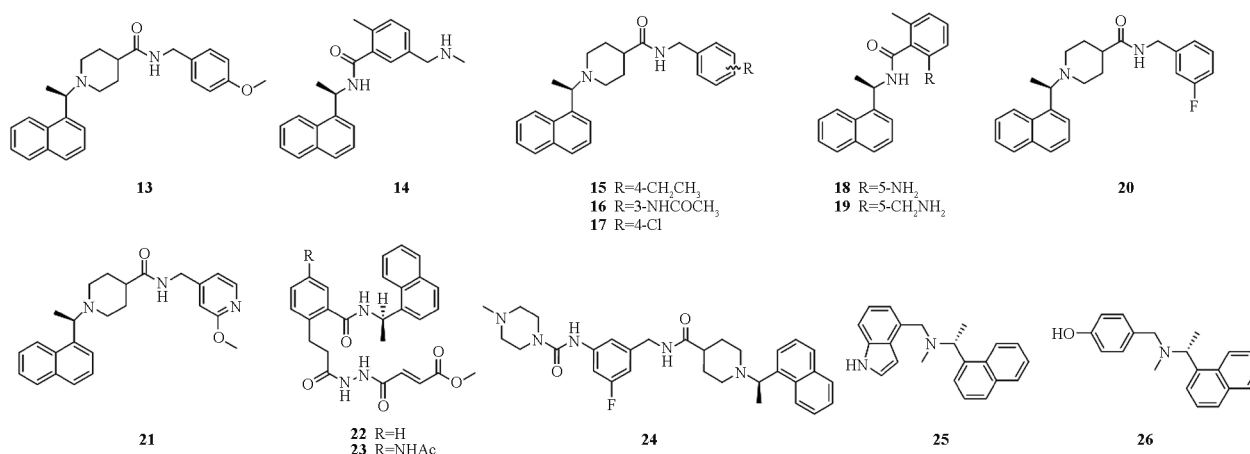


图7 GRL0617 衍生的含萘类 PL^{pro} 抑制剂结构示意图^[30,38-41,43-44]

2.3 含氮稠和杂环类结构化合物

2.3.1 喹啉类、嘧啶类与嘌呤类结构化合物

Chen 等^[25]发现,氯氧嘧啶的衍生物 **27** ($IC_{50} = 6.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),作为一种喹啉骨架化合物,可以通过破坏 PL^{pro} -ISG15 的相互作用来恢复宿主先天免疫,并在低微摩尔水平上对 SARS-CoV-2 及其变体产生抗病毒作用。Bajaj 等^[45]基于巯基嘧

啶片段确定新药效团后,经过高通量筛选得到了一个可逆共价抑制剂化合物 **28** ($IC_{50} = 5.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。Swaim 等^[46]发现,6-巯基嘌呤(6-TG,化合物 **29**)是一种直接作用的 SARS-CoV-2 抗病毒药物,主要通过抑制细胞内 p1a 多蛋白的加工以及体内外 PL^{pro} 对 ISG15 的解偶联作用来发挥抗病毒效应。此外,6-TG 还可以转化成为 6-硫鸟嘌呤核糖

核苷酸,再与脱氧核苷酸结合插入病毒 RNA 中,额外产生次要的抗病毒作用(图 8)。

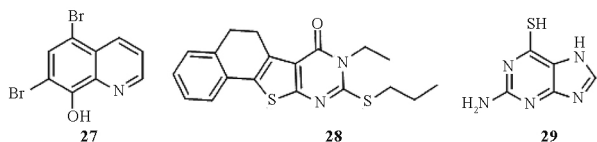


图 8 喹啉、嘧啶、嘌呤类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[25,45-46]

2.3.2 含硫类或含硒类氮杂稠合环结构化合物 Liu 等^[47]发现了两类新的支架,其中代表化合物 **30** 和化合物 **31** 被证明会在锌指结构域上与 PL^{pro} 发生结合。他们指出,共价抑制剂 **30** 与非共价抑制剂 **31**,两者在 50 nmol · L⁻¹ 对 PL^{pro} 的抑制率分别为 42.9% 和 44.9%,同时化合物 **30** 和 **31** 也被鉴定为强效的 3CL^{pro} 抑制剂。这说明化合物 **30** 和化合物 **31** 或许能够作为双靶点抗冠状病毒药物的先导结构,为抗 SARS-CoV-2 的

药物研究提供了新的方向。与抑制剂 **30** 相似的含硒骨架化合物 **32** (IC₅₀ = 236 nmol · L⁻¹)、**33** (IC₅₀ = 256 nmol · L⁻¹) 与化合物 **34** (IC₅₀ = 339 nmol · L⁻¹)、**35** (IC₅₀ = 263 nmol · L⁻¹) 也在纳摩尔范围内显示出对 SARS-CoV-2 的抑制效力^[48],这意味着硒元素在 PL^{pro} 抑制中具有重要的作用,有必要进行深入探索。

Yuan 等^[49]通过计算机辅助筛选的方法获得了有一种具有广谱抗病毒活性的非共价抑制剂 F0213 (化合物 **36**, IC₅₀ = 4.55 μmol · L⁻¹),并指出其具有双重治疗的功能:即一方面通过阻断病毒多蛋白切割来抑制冠状病毒复制;另一方面,亦在拮抗 PL^{pro} 去泛素化活性的同时促进了机体自身的抗病毒免疫效应。

此外, Mirza 等^[50]还通过测试得到了对 PL^{pro} 表现出显著抑制活性的化合物 **37**,并提出化合物 **37** 可以作为潜在抗 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的化学先导物,值得进一步的体外评估验证(图 9)。

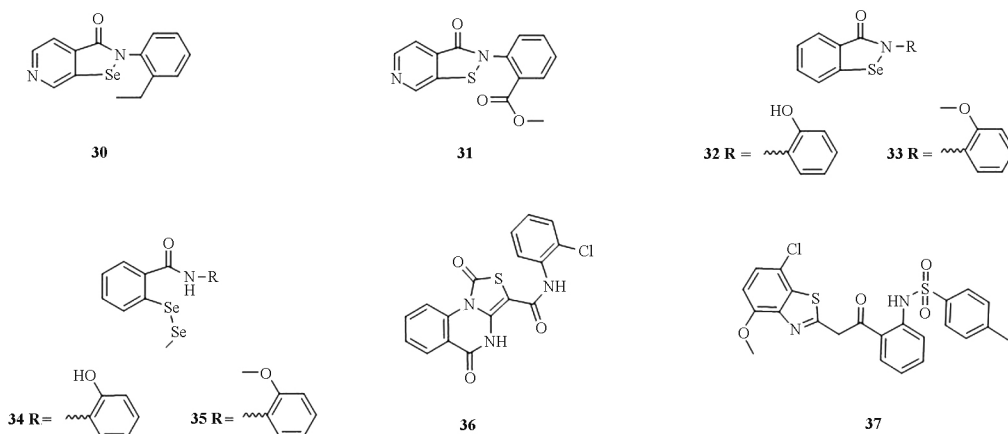


图 9 含硫或含硒氮杂稠合环类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[47-50]

2.3.3 其他类氮杂稠合环结构化合物 Tian 等^[51]采用基于结构的药效团建模和分子对接相结合的筛选方式,得到了化合物 **38** (IC₅₀ = 0.6 μmol · L⁻¹) 和化合物 **39** (IC₅₀ = 0.8 μmol · L⁻¹),两者均表现出高于 GRL0617 的抑制效果。尤其是化合物 **39**,由于能稳定结合蛋白酶的催化位点,而表现出了强效的 PL^{pro} 抑制作用。Han 等^[52]也通过筛选获得了

具有 α-氯酰胺片段的化合物 **40** (IC₅₀ = 18 μmol · L⁻¹),其在细胞中抑制 SARS-CoV-2 复制的同时,还会与 PL^{pro} 活性位点的半胱氨酸残基发生共价结合,从而表现出一定的抗病毒潜力。Hersi 等^[53]则对多种抑制 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的先导物进行了表型筛选,从中获得了具有较好肝微粒体代谢稳定性的化合物 **41** (IC₅₀ = 93.3 nmol · L⁻¹) (图 10)。

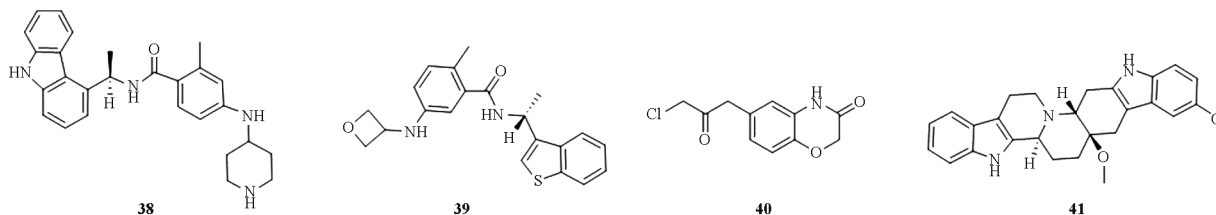


图 10 其他氮杂稠合环类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[51-53]

2.4 含二硫键类结构化合物

Hu 等^[54]报告了含有二硫键类化合物 **42** 和 **43** 的作用机制:通过与 PL^{pro} 的 Cys270 发生共价结合来变构抑制蛋白

酶活性。类似地, Bagdonas 等^[55]利用荧光热移测定筛选了大量化合物,最终将二硫化物鉴定为有效的 PL^{pro} 抑制剂,其中化合物 **44** (IC₅₀ = 0.54 μmol · L⁻¹)、**45** (IC₅₀ =

0.43 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**46** ($\text{IC}_{50} = 0.63 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 均展示出对 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的较强抑制活性。双硫仑(化合物 **47**) 由于在体外表现出抑制 PL^{pro} 的抗病毒活性, 也被推测具有抗

SARS-CoV-2 的潜力。Nogara 等^[56] 的研究也通过分子对接模拟等技术发现, 双硫仑的亚砷代谢物 **48** 亦是靶向 PL^{pro} 的潜在共价抑制剂(图 11)。

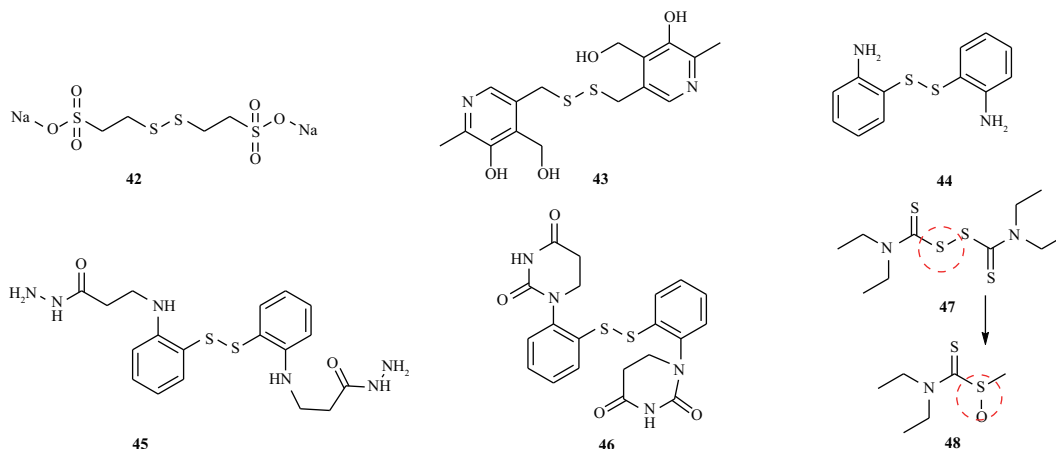
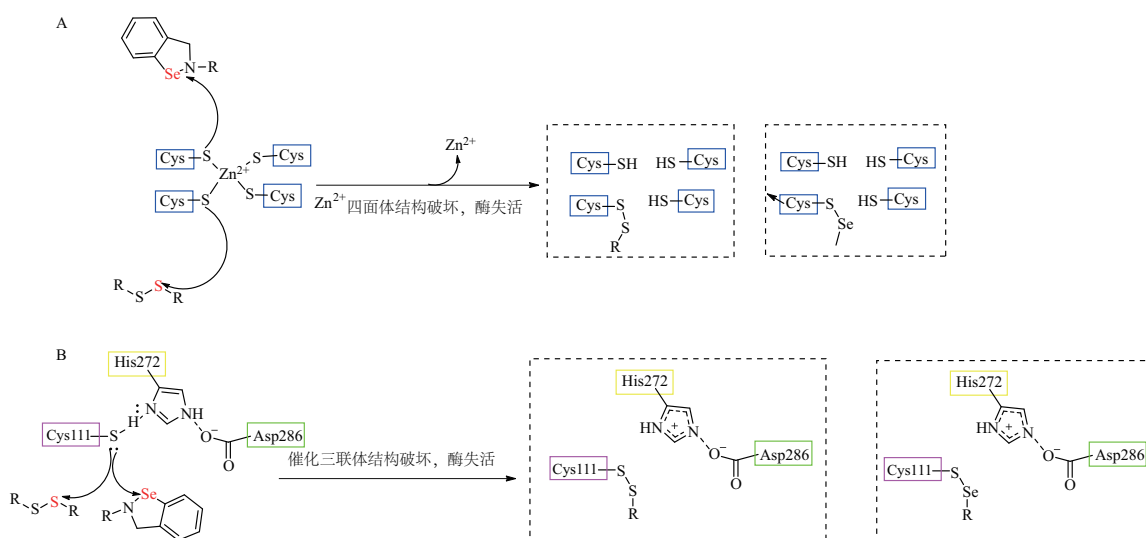


图 11 二硫键类 PL^{pro} 抑制剂结构示意图^[54-56]

值得注意的是, 二硫类化合物与前文提到的含硒类化合物在抑制 PL^{pro} 方面具有类似的双重作用机制^[57-58]: 一方面通过与锌离子四面体中的硫元素形成结合键, 破坏酶本身的

稳定结构; 另一方面还可以与具有催化活性的半胱氨酸残基产生共价结合, 从而导致酶活性的丧失, 并以此发挥抑制作用, 见图 12。



A - 破坏蛋白酶催化中心的锌离子四面体结构, 导致酶失活; B - 破坏酶的催化三联体结构, 导致酶失活。

图 12 二硫化合物与含硒化合物抑制 PL^{pro} 作用示意图^[57-58]

2.5 含肽类结构化合物

Wang 等^[59] 报道了一种靶向 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的新型共价拟肽类抑制剂 **49** ($\text{IC}_{50} = 0.23 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 并通过 X 射线晶体结构证实了其与蛋白酶催化残基 Cys111 之间的共价结合模式, 这为靶向 PL^{pro} 的抑制剂研究提供了一类新的结构骨架。Gao 等^[60] 以基于载体的药物设计为基础, 鉴定出一系列可能针对 SARS-CoV-2 PL^{pro} 的靶向抑制剂, 并且还对其具有初步抑制活性的化合物进行了分子筛选: 通过分子对接与非键相互作用模拟, 化合物 **50** ($\text{IC}_{50} = 0.90 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 被确定为最佳抑制剂。此外, Rut 等^[17] 还利用蛋白结合晶体结构信息, 对前期所获得的系列抑制剂

进行了优化改造, 从而开发出化合物 **51** 和化合物 **52**, 研究表明, 这两个化合物对于 SARS-CoV-2 PL^{pro} 均具有选择性的有效抑制作用(图 13)。

2.6 含金属类结构化合物

金属配合物在药物设计上也被广泛应用。

研究表明^[61], 金金属药物可以有效抑制 SARS-CoV-2 PL^{pro}, 而作用机制与二硫类化合物和含硒化合物类似, 即正是由于金金属配合物对酶结构域中锌离子四面体结构造成破坏, 从而才会导致酶活性丧失。此类含金金属的代表性化合物如 **53** ($\text{IC}_{50} = 1.04 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、**54** ($\text{IC}_{50} = 1.44 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 **55** ($\text{IC}_{50} = 0.96 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。

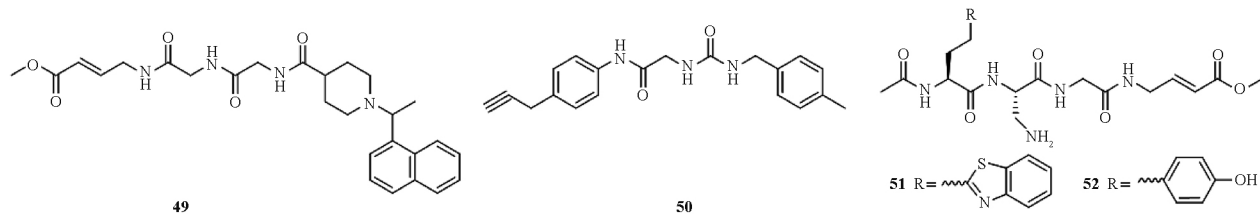


图 13 拟肽类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^{[[17,59-60]]}

锌离子在体外也是 SARS-CoV-2 PL^{pro}的高效抑制剂^[62]。Shetler 等^[63]在综合评估了金属离子对 PL^{pro}催化活性的影响之后,就曾指出锌对 PL^{pro}的抑制作用最大,其次是锰,而钙、镁和铁对 PL^{pro}的影响或可忽略不计,这为进一步研究以 PL^{pro}为靶点的金属配合物类抑制剂提供了参考。金属核的选择对抗 SARS-CoV-2 效果产生着重要影响。Kladnik 等^[64]就指出,吡硫酮锌(化合物 **56**, IC₅₀ = 0.50 μmol · L⁻¹)在

体外对 PL^{pro}具有抑制活性,而钐配合物则表现较差,这侧面印证了 Shetler 等得出的结论。

含碘配体的银氮杂环碳复合物也被证明是一种罕见的非竞争性抑制剂。特别是,此类抑制剂仅对 SARS-CoV-2 PL^{pro}有效,而对 3CL^{pro}无效,代表化合物有抑制剂 **57** (IC₅₀ = 0.24 μmol · L⁻¹) 与抑制剂 **58** (IC₅₀ = 0.196 μmol · L⁻¹)^[65](图 14)。

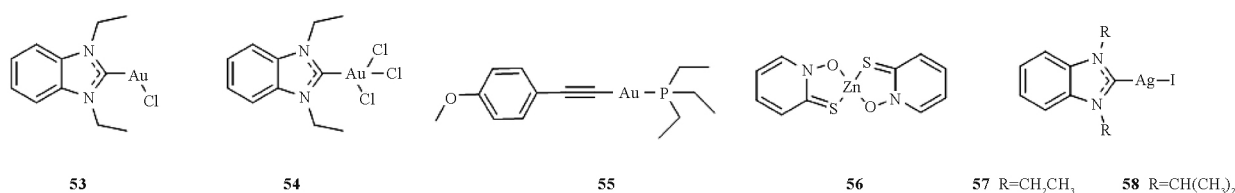


图 14 金属类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^{[[61,64-65]]}

2.7 含黄酮类、有机酸类与天然产物来源的其他类结构化合物

一些天然产物来源的化合物对 SARS-CoV-2 PL^{pro}也存在着抑制作用,例如黄酮类与酸类等。

2.7.1 天然产物来源的含黄酮类结构化合物

Kawall 等^[66]提出,杨梅素(化合物 **58**, IC₅₀ = 12.1 μmol · L⁻¹)和茶黄素(化合物 **59**, IC₅₀ = 7.3 μmol · L⁻¹)可以通过抑制 SARS-CoV-2 PL^{pro}的水解,来阻止病毒复制,并且具有促进宿主先天免疫反应的作用,是一类具有潜力的抗 SARS-CoV-2 先导

化合物。Parmar 等^[67]利用高通量结构的虚拟筛选模式,从 NPASS 天然产物库中鉴定出最佳化合物 Caesalpinaphenol A (化合物 **60**),其结合能与 GRL0617 相当。Li 等^[68]证实了双黄酮类化合物也是有效的 PL^{pro}抑制剂,如阿门托双黄酮(化合物 **61**, IC₅₀ = 9.5 μmol · L⁻¹)等。特别地,蛋白裂解实验(Pro-ISG15)的结果进一步证实:此类化合物对 PL^{pro}介导的去 ISG 酰化反应也存在着一定的抑制效果,将会在病毒免疫逃逸过程中发挥关键作用,通过促进自身免疫的恢复来阻断病毒感染(图 15)。

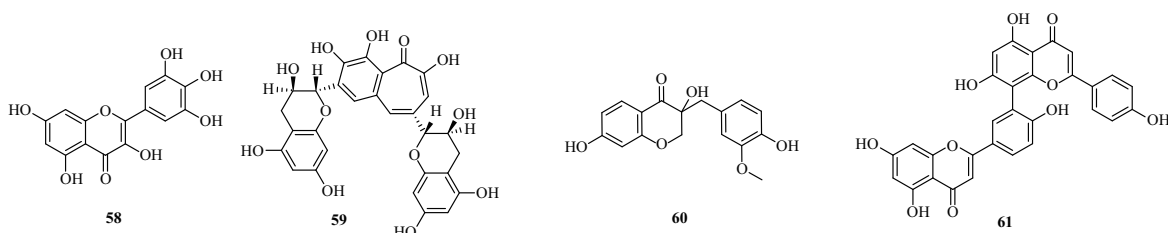


图 15 黄酮类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^{[[66-68]]}

2.7.2 天然产物来源的有机酸类结构化合物

Yan 等^[69]建立了一种荧光偏振筛选方法用以发现 PL^{pro}抑制剂,同时利用这一方法,鉴定出:腰果酸(化合物 **62**, IC₅₀ = 24.26 μmol · L⁻¹)可以作为一种新型 PL^{pro}竞争性抑制剂。Chen 等^[70]的研究也指出,银杏酸(化合物 **63**, IC₅₀ = 16.30 μmol · L⁻¹)是一种靶向 PL^{pro}的不可逆抑制剂,在体外以无毒浓度破坏 SARS-CoV-2 的复制(图 16)。

2.7.3 天然产物来源的其他类结构化合物

天然产物结构种类多样,来源丰富。除上述这些化合物外, Li 等^[71]还从葡萄果实中进行探索与筛选得到了化合物 **64** (IC₅₀ = 5.23 μmol · L⁻¹) 和 **65** (IC₅₀ = 4.51 μmol · L⁻¹), 对 PL^{pro}也表现出一定的抑制活性。更有意义的是,研究中发现:此类化合物在体外也具有有效的抗炎活性,这使其进一步提高了抗冠状病毒的潜力(图 17)。

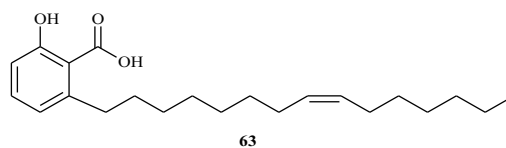
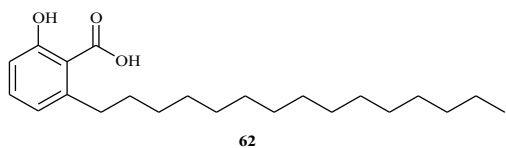


图 16 有机酸类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[69-70]

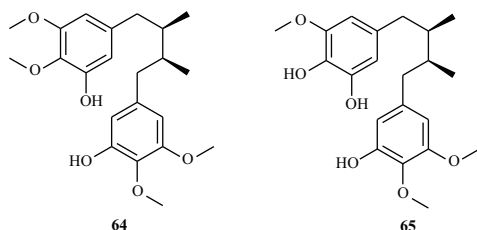


图 17 天然产物来源的其他类 PL^{pro}抑制剂结构示意图^[71]

3 总结与展望

新冠疫情的暴发始料未及,至今仍没有一类抗 SARS 药物可以应对突发的情况。尽管现阶段 SARS-CoV-2 带给人们的阴影已经渐渐淡去,但不可否认的是,此类病毒,尤其是 SARS-CoV-2 因为其极高的突变频率,仍对公众健康具有持续的潜在威胁。因此开发新型的抗 SARS 病毒药物依旧迫在眉睫。

对病毒基因复制过程中的关键蛋白 PL^{pro}进行抑制,将会在阻碍病毒复制的同时恢复宿主免疫反应,从而发挥一定的治疗效果。PL^{pro}也因此成为了研发具有双效抗 SARS-CoV-2 药物的理想靶点。现阶段已存在多种基于此靶点开发的抑制剂研究,然而由于化合物缺乏与 S1、S2 口袋的结合作用以及 PL^{pro} BL2 环自身的活动性,其中的多数抑制剂都不能稳定地结合在活性位点,这对此类抑制剂的研发造成了困难。所以,寻找新型的 PL^{pro}蛋白酶抑制剂仍是大势所趋。另外, SARS 病毒多具有同源性,故而以 SARS-CoV-2 PL^{pro}抑制剂出发进行的化合物结构改造,也将有望推动广谱类抗冠状病毒药物的获得。

近期以计算机辅助等智能化筛选为前提,针对 SARS-CoV-2 PL^{pro}抑制剂研究的进展势头迅猛。将这些化合物进行合理的设计与分类,主要集中在醌类化合物、萜类及其他类化合物(GRL0617 及其衍生物)、含氮稠杂环类化合物、含二硫键类化合物、拟肽类化合物、含金属类化合物、天然产物来源的黄酮类、有机酸类和其他类化合物等。

基于此,本研究从 SARS-CoV-2 病毒复制过程出发,通过介绍 PL^{pro}的结构与功能引入 PL^{pro}抑制剂的作用机制,同时以化合物结构特征为分类依据,对该靶点的抑制剂发现进行了探索性总结,以期新型抗 SARS-CoV-2 与广谱抗 SARS 病毒的药物研发提供理论支持。

REFERENCES

[1] CALLEJA D J, LESSENE G, KOMANDER D. Inhibitors of SARS-CoV-2 PL^{pro} [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 876212. DOI:10.3389/fchem.2022.876212.

[2] HOLMES E C, GOLDSTEIN S A, RASMUSSEN A L, et al. The origins of SARS-CoV-2: a critical review [J]. *Cell*, 2021, 184

(19): 4848-4856.

[3] LIU Y, NING Z, CHEN Y, et al. Aerodynamic analysis of SARS-CoV-2 in two Wuhan hospitals [J]. *Nature*, 2020, 582 (7813): 557-560.

[4] ADIL M T, RAHMAN R, WHITELAW D, et al. SARS-CoV-2 and the pandemic of COVID-19 [J]. *Postgrad Med J*, 2021, 97 (1144): 110-116.

[5] FEHR A R, PERLMAN S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1282: 1-23. DOI: 10.1007/978-1-4939-2438-7_1.

[6] BIAN J W, ZHAO R S, ZHAI S D, et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 receptor angiotensin converting enzyme 2 and its related intervention drugs [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2020, 55(10): 761-766.

[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(3): 155-170.

[8] YAN S, WU G. Spatial and temporal roles of SARS-CoV PL^{pro}-a snapshot [J]. *FASEB J*, 2021, 35(1): e21197. DOI:10.1096/fj.202002271.

[9] JACKSON C B, FARZAN M, CHEN B, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022, 23(1): 3-20.

[10] HOFFMANN M, KLEINE-WEBER H, SCHROEDER S, et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor [J]. *Cell*, 2020, 181(2): 271-280.

[11] ZHANG J W, HU X, JIN P F. Cytokine storm induced by SARS-CoV-2 and the drug therapy [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2020, 55(5): 333-336.

[12] LI H, TAN X C, JIANG D, et al. Research progress in coronavirus and its therapeutic drugs [J]. *Chin Pharm J (中国药理学杂志)*, 2020, 55(4): 284-292.

[13] ARYA R, KUMARI S, PANDEY B, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins [J]. *J Mol Biol*, 2021, 433 (2): 166725. DOI:10.1016/j.jmb.2020.11.024.

[14] ULLRICH S, NITSCHKE C. SARS-CoV-2 Papain-like protease: structure, function and inhibition [J]. *ChemBiochem*, 2022, 23 (19): e202200327. DOI:10.1002/cbic.202200327.

[15] MAITI B K. Can papain-like protease inhibitors halt SARS-CoV-2 replication? [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3 (5): 1017-1019.

[16] MA C, HU Y, WANG Y, et al. Drug-repurposing screening identified tropifexor as a SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitor [J]. *ACS Infect Dis*, 2022, 8(5): 1022-1030.

[17] RUT W, LV Z, ZMUDZINSKI M, et al. Activity profiling and structures of inhibitor-bound SARS-CoV-2-PL^{pro} protease provides a framework for anti-COVID-19 drug design [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(42): eabd4596. DOI:10.1126/sciadv.abd4596.

[18] KANDEEL M, KITADE Y, FAYEZ M, et al. The emerging SARS-CoV-2 papain-like protease: its relationship with recent coronavirus epidemics [J]. *J Med Virol*, 2021, 93(3): 1581-1588.

[19] HENDERSON J A, VERMA N, SHEN J. Assessment of proton-

- coupled conformational dynamics of sars and mers coronavirus papain-like proteases: implication for designing broad-spectrum antiviral inhibitors [J]. *J Chem Phys*, 2020, 153(11): 115101, DOI:10.1063/5.0020458.
- [20] GOLD I M, REIS N, GLASER F, *et al.* Coronaviral PL^{pro} proteases and the immunomodulatory roles of conjugated versus free Interferon Stimulated Gene product-15 (ISG15) [J]. *Seminars Cell Developmental Biol*, 2022, 132: 16-26. DOI:10.1016/j.semcdb.2022.06.005.
- [21] KLEMM T, EBERT G, CALLEJA D J, *et al.* Mechanism and inhibition of the papain-like protease, PL^{pro}, of SARS-CoV-2 [J]. *EMBO J*, 2020, 39(18): e106275. DOI:10.15252/embj.2020106275.
- [22] MOUSTAQIL M, OLLIVIER E, CHIU H P, *et al.* SARS-CoV-2 proteases PL^{pro} and 3CL^{pro} cleave IRF3 and critical modulators of inflammatory pathways (NLRP12 and TAB1): implications for disease presentation across species [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2021, 10(1): 178-195.
- [23] ZHAO Y, DU X, DUAN Y, *et al.* High-throughput screening identifies established drugs as SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors [J]. *Protein Cell*, 2021, 12(11): 877-888.
- [24] XU Y X, CHEN K, PAN J L, *et al.* Repurposing clinically approved drugs for COVID-19 treatment targeting SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *Int J Biol Macromol*, 2021, 188: 137-146. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.184.
- [25] CHEN X, CHEN K, ZHANG Z Y, *et al.* Investigating derivatives of tanshinone II A sulfonate sodium and chloroxine for their inhibition activities against the SARS-CoV-2 Papain-like Protease [J]. *ACS Omega*, 2022, 7(51): 48416-48426.
- [26] MA C, WANG J. Validation and invalidation of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2022, 5(2): 102-109.
- [27] PATEL R, PRAJAPATI J, RAO P, *et al.* Repurposing the antibacterial drugs for inhibition of SARS-CoV2-PL^{pro} using molecular docking, MD simulation and binding energy calculation [J]. *Mol Divers*, 2022, 26(4): 2189-2209.
- [28] OSIPIUK J, AZIZI S A, DVORKIN S, *et al.* Structure of papain-like protease from SARS-CoV-2 and its complexes with non-covalent inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 743. DOI:10.1101/2020.08.06.240192.
- [29] FU Z Y, HUANG B, TANG J L, *et al.* The complex structure of GRL0617 and SARS-CoV-2 PL^{pro} reveals a hot spot for antiviral drug discovery [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 488. DOI: 10.1038/s41467-020-20718-8.
- [30] GHOSH A K, SHAHABI D, IMHOFF M E C, *et al.* SARS-CoV-2 papain-like protease (PL^{pro}) inhibitory and antiviral activity of small molecule derivatives for drug leads [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2023, 96: 129489. DOI:10.1016/j.bmcl.2023.129489.
- [31] RAO P, PATEL R, SHUKLA A, *et al.* Identifying structural-functional analogue of GRL0617, the only well-established inhibitor for papain-like protease (PL^{pro}) of SARS-CoV2 from the pool of fungal metabolites using docking and molecular dynamics simulation [J]. *Mol Divers*, 2022, 26(1): 309-329.
- [32] GAO X P, QIN B, CHEN P, *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *Acta Pharm Sin B (药学报英文)*, 2021, 11(1): 237-245.
- [33] CHO H, KIM Y J, CHAE J W, *et al.* *In vitro* metabolic characterization of the SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors GRL0617 and HY-17542 [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1067408. DOI: 10.3389/fphar.2023.1067408.
- [34] SAYAF A M, AHMAD H, ASLAM M A, *et al.* Pharmacotherapeutic potential of natural products to target the SARS-CoV-2 PL^{pro} using molecular screening and simulation approaches [J]. *App Biochem Biotechnol*, 2023: 1-20. DOI: 10.1007/s12010-023-04466-1.
- [35] SHEN Z N, RATIA K, COOPER L, *et al.* Design of SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors for COVID-19 antiviral therapy leveraging binding cooperativity [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(4): 2940-2955.
- [36] WU Y F, PEGAN S D, CRICH D, *et al.* Identifying drug candidates for COVID-19 with large-scale drug screening [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(5):1-11.
- [37] AYOUP M S, ELSHAFFEY M M, ABDEL-HAMID H, *et al.* Repurposing 1,2,4-oxadiazoles as SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors and investigation of their possible viral entry blockade potential [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 252: 115272.
- [38] CASTILLO-CAMPOS L, VELÁZQUEZ-LIBERA J L, CABALLERO J. Computational study of the binding orientation and affinity of noncovalent inhibitors of the papain-like protease (PL^{pro}) from SARS-CoV-1 considering the protein flexibility by using molecular dynamics and cross-docking [J]. *Front Mol Biosci*, 2023, 10: 1215499. DOI:10.3389/fmolb.2023.1215499.
- [39] AMIN S A, GHOSH K, SINGH S, *et al.* Exploring naphthyl derivatives as SARS-CoV papain-like protease (PL^{pro}) inhibitors and its implications in COVID-19 drug discovery [J]. *Mol Divers*, 2022, 26(1): 215-228.
- [40] CALLEJA D J, KUCHEL N, LU B G C, *et al.* Insights into drug repurposing, as well as specificity and compound properties of piperidine-based SARS-CoV-2 PL^{pro} inhibitors [J]. *Front Chem*, 2022, 10: 861209.
- [41] SANDERS B C, POKHREL S, LABBE A D, *et al.* Potent and selective covalent inhibition of the papain-like protease from SARS-CoV-2 [J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 1733.
- [42] TAN H, HU Y, JADHAV P, *et al.* Progress and challenges in targeting the SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(11): 7561-7580.
- [43] SHAN H Y, LIU J P, SHEN J L, *et al.* Development of potent and selective inhibitors targeting the papain-like protease of SARS-CoV-2 [J]. *Cell Chem Biol*, 2021, 28(6): 855-865.
- [44] MA C L, SACCO M D, XIA Z L, *et al.* Discovery of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors through a combination of high-throughput screening and a flippase-based reporter assay [J]. *ACS Cent Sci*, 2021, 7(7): 1245-1260.
- [45] BAJAJ T, WEHRI E, SURYAWANSHI R K, *et al.* Mercaptoprimidines are reversible covalent inhibitors of the papain-like protease (PL^{pro}) and inhibit SARS-CoV-2 (SCoV-2) replication [J]. *RSC Adv*, 2023, 13(26): 17667-17677.
- [46] SWAIM C D, DWIVEDI V, PERNG Y C, *et al.* 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PL^{pro} [J]. *Science*, 2021, 24(10): 103213.
- [47] LIU W D, WANG J, WANG S Y, *et al.* Discovery of new non-covalent and covalent inhibitors targeting SARS-CoV-2 papain-like protease and main protease [J]. *Bioorg Chem*, 2023, 140: 106830. DOI:10.1016/j.bioorg.2023.106830.
- [48] WEGLARZ-TOMCZAK E, TOMCZAK J M, TALMA M, *et al.* Identification of ebselen and its analogues as potent covalent inhibitors of papain-like protease from SARS-CoV-2 [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3640. DOI: 10.1038/s41598-021-83229-6.
- [49] YUAN S F, GAO X P, TANG K M, *et al.* Targeting papain-like protease for broad-spectrum coronavirus inhibition [J]. *Protein Cell*, 2022, 13(12): 940-953.
- [50] MIRZA M U, AHMAD S, ABDULLAH I, *et al.* Identification of novel human USP2 inhibitor and its putative role in treatment of COVID-19 by inhibiting SARS-CoV-2 papain-like (PL^{pro}) protease [J]. *Comput Biol Chem*, 2020, 89:

107376. DOI: 10.1016/j.combiolchem.2020.107376.
- [51] TIAN X Y, ZHAO Q F, CHEN X H, *et al.* Discovery of novel and highly potent inhibitors of SARS-CoV-2 Papain-like protease through structure-based pharmacophore modeling, virtual screening, molecular docking, molecular dynamics simulations, and biological evaluation [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13; 817715.
- [52] HAN H S, GRACIA A V, RØISE J J, *et al.* A covalent inhibitor targeting the papain-like protease from SARS-CoV-2 inhibits viral replication [J]. *RSC Adv*, 2023, 13(16); 10636-10641.
- [53] HERSI F, SEBASTIAN A, TARAZI H, *et al.* Discovery of novel papain-like protease inhibitors for potential treatment of COVID-19 [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 254; 115380.
- [54] HU H C, WANG Q, SU H X, *et al.* Identification of cysteine 270 as a novel site for allosteric modulators of SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *Angew Chem (Int Ed Engl)*, 2022, 61(52); e202212378.
- [55] BAGDONAS M, ČEREPENKAITĖ K, MICKEVIČIŪTĖ A, *et al.* Screening, synthesis and biochemical characterization of sars-cov-2 protease inhibitors [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17); 13491.
- [56] NOGARA P A, OMAGE F B, BOLZAN G R, *et al.* Reactivity and binding mode of disulfiram, its metabolites, and derivatives in SARS-CoV-2 PL^{pro}; insights from computational chemistry studies [J]. *J Mol Model*, 2022, 28(11); 354.
- [57] SARGSYAN K, LIN C C, CHEN T, *et al.* Multi-targeting of functional cysteines in multiple conserved SARS-CoV-2 domains by clinically safe Zn-ejectors [J]. *Chem Sci*, 2020, 11(36); 9904-9909.
- [58] OMAGE F B, MADABENI A, TUCCI A R, *et al.* Diphenyl diselenide and SARS-CoV-2: in silico exploration of the mechanisms of inhibition of main protease (m^{pro}) and papain-like protease (PL^{pro}) [J]. *J Chem Inf Mod*, 2023, 63(7); 2226-2239.
- [59] WANG Q, CHEN G F, HE J, *et al.* Structure-based design of potent peptidomimetic inhibitors covalently targeting SARS-CoV-2 Papain-like protease [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10); 8633.
- [60] GAO H W, DAI R H, SU R L. Computer-aided drug design for the pain-like protease (PL^{pro}) inhibitors against SARS-CoV-2 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159; 114247.
- [61] GIL-MOLES M, BASU U, BÜSSING R, *et al.* Gold metallodrugs to target coronavirus proteins: inhibitory effects on the Spike-ACE2 Interaction and on PL^{pro} protease activity by auranofin and gold organometallics [J]. *Chemistry*, 2020, 26(66); 15140-15144.
- [62] TAO X, ZHANG L, DU L B, *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 replication by zinc gluconate in combination with hinokitiol [J]. *J Inorg Biochem*, 2022, 231; 111777.
- [63] SHETLER C L, FERREIRA J C, CARDOSO T H S, *et al.* Therapeutic potential of metal ions for COVID-19: insights from the papain-like protease of SARS-CoV-2 [J]. *Biochem J*, 2022, 479(20); 2175-2193.
- [64] KLADNIK J, DOLINAR A, KLJUN J, *et al.* Zinc pyrithione is a potent inhibitor of PL^{pro} and cathepsin L enzymes with ex vivo inhibition of SARS-CoV-2 entry and replication [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2022, 37(1); 2158-2168.
- [65] GIL-MOLES M, O'BEIRNE C, ESAREV I V, *et al.* Silver N-heterocyclic carbene complexes are potent uncompetitive inhibitors of the papain-like protease with antiviral activity against SARS-CoV-2 [J]. *RSC Med Chem*, 2023, 14(7); 1260-1271.
- [66] KAWALL A, LEWIS D S M, SHARMA A, *et al.* Inhibitory effect of phytochemicals towards SARS-CoV-2 papain like protease (PL^{pro}) proteolytic and deubiquitinase activity [J]. *Front Chem*, 2022, 10; 1100460.
- [67] PARMAR P, RAO P, SHARMA A, *et al.* Meticulous assessment of natural compounds from NPASS database for identifying analogue of GRL0617, the only known inhibitor for SARS-CoV2 papain-like protease (PL^{pro}) using rigorous computational workflow [J]. *Mol Divers*, 2022, 26(1); 389-407.
- [68] LI L Y, MA L Y, HU Y, *et al.* Natural biflavones are potent inhibitors against SARS-CoV-2 papain-like protease [J]. *Phytochemistry*, 2022, 193; 112984.
- [69] YAN H H, LIU Z C, YAN G G, *et al.* A robust high-throughput fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 papain-like protease inhibitors [J]. *Virology*, 2022, 574; 18-24.
- [70] CHEN Z N, CUI Q H, COOPER L, *et al.* Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of SARS-CoV-2 cysteine proteases [J]. *Cell Biosci*, 2021, 11(1); 45.
- [71] LI B, QIAO L S, XIAO Q, *et al.* Effects of diarylbutane lignans from Schisandra chinensis fruit on SARS-CoV-2 3CL^{pro} and PL^{pro} and their *in vitro* anti-inflammatory properties [J]. *Phytomed Plus Int J Phytother Phytopharmacol*, 2023, 3(2); 100432.

(收稿日期:2024-02-11)