

· 药咖论坛 ·

SARS-CoV-2 主蛋白酶耐药机制与抗耐药性药物化学策略

谷漫玉[#], 叶冰[#], 高升华, 展鹏^{*}, 刘新泳^{**}

(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) 主蛋白酶 (main protease, M^{pro}) 在病毒复制周期中发挥关键作用, 是抗新冠病毒药物的重要靶点。然而, 病毒的快速变异引起了对 M^{pro} 抑制剂的耐药性问题, 对全球公共卫生构成严重威胁。对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的耐药机制进行总结, 并探讨了新型抗耐药性抑制剂的设计策略。针对 M^{pro} 耐药突变对现有抑制剂疗效的影响, 提出了多种基于靶标结构的抗耐药性药物设计方法, 如多位点占据、变构位点开发、共价结合等策略, 此外还探讨了蛋白降解靶向嵌合体 (proteolytic targeting chimera, PROTAC) 在降解病毒靶蛋白中的应用。为解决 SARS-CoV-2 M^{pro} 耐药性问题提供了新思路, 并为未来可能出现的冠状病毒疫情提供药物筛选和开发的参考。

[关键词] 严重急性呼吸综合征冠状病毒 2; 主蛋白酶; 耐药机制; 抗耐药性药物设计; 蛋白降解靶向嵌合体

[中图分类号] R978.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1001-5094 (2024) 09-0644-17

DOI: 10.20053/j.issn1001-5094.2024.09.002

Drug Resistance Mechanisms of SARS-CoV-2 Main Protease and Chemical Strategies for Anti-Resistant Drugs

GU Manyu, YE Bing, GAO Shenghua, ZHAN Peng, LIU Xinyong

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

[Abstract] The SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}) plays a key role in the viral replication cycle, and is an important target for anti-SARS-CoV-2 drugs. However, the rapid mutation of the virus has led to drug resistance with M^{pro} inhibitors, posing a serious threat to global public health. This article summarizes the resistance mechanisms of SARS-CoV-2 M^{pro} and explores the strategies for the design of new anti-resistant inhibitors. By analyzing the impact of M^{pro} resistance mutations on the efficacy of existing inhibitors, we summarized various target structure-based anti-resistance drug design methods such as multi-site occupancy, allosteric site development, and covalent binding, and discussed the utility of PROTAC technology in degrading resistant viral proteins, aiming to provide innovative solutions to the drug resistance problem of SARS-CoV-2 M^{pro} and some reference for drug screening and development in response to potential future coronavirus pandemics.

[Key words] SARS-CoV-2; main protease; drug resistance mechanism; anti-resistant drug design; PROTAC

冠状病毒是一类能引起人畜急性慢性呼吸道疾病的广泛存在的病原体。冠状病毒科分为 α 、 β 、 γ 、

δ 4 个属, 已知至少 7 种冠状病毒可感染人类^[1-2]。严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 主要通过飞沫传播, 感染者可能无症状或表现出发热、咳嗽、呼吸困难、乏力和嗅觉丧失等临床症状^[3], 重症患者可能发展为急性呼吸窘迫综合征、脓毒性休克、凝血功能障碍和多器官衰竭^[4]。截至 2024 年 7 月中旬, 全球确诊病例数已接近 8 亿, 导致逾 700 万人死亡^[5]。目前, 一些靶向 SARS-CoV-2 的抑制剂被批准上市, 其中包括主蛋白酶 (main protease, M^{pro}) 抑制剂奈玛特韦 (1)、先诺特韦 (2)、来瑞特韦 (3)、阿泰特韦 (4) 和恩塞特韦 (5),

贡献等同

接受日期: 2024-07-11

项目资助: 国家自然科学基金面上项目 (No. 82373727);

国家自然科学基金青年基金 (No. 22307067); 山东省实验

室项目 (No. SYS202205)

* 通信作者: 展鹏, 教授;

研究方向: 抗病毒、抗痛风及降尿酸创新药物研究;

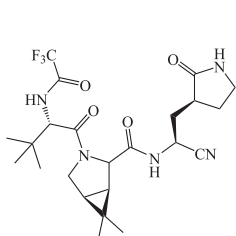
E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn

** 通信作者: 刘新泳, 教授;

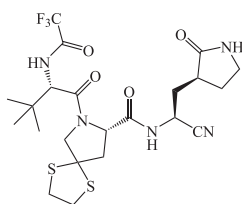
研究方向: 抗病毒、抗重大慢病药物研究;

E-mail: xinyongl@sdu.edu.cn

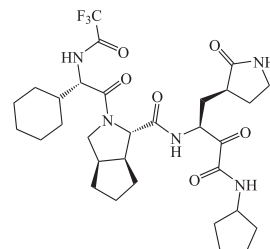
以及 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 抑制剂瑞德西韦 (6)、阿兹夫定 (7) 和莫那匹韦 (8) 等。



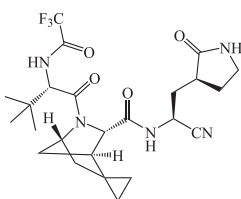
奈玛特韦 (1)



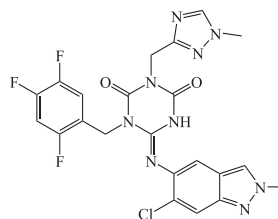
先诺特韦 (2)



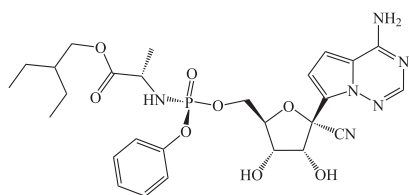
来瑞特韦 (3)



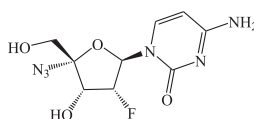
阿泰特韦 (4)



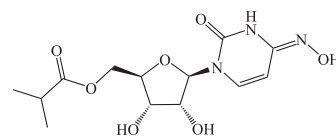
恩塞特韦 (5)



瑞德西韦 (6)



阿兹夫定 (7)



莫那匹韦 (8)

自新冠疫情发生以来, SARS-CoV-2 的持续突变引起了广泛关注。特别是 2021 年末出现的 Omicron 突变体, 相较于原始毒株, 其基因组发生了 30 多个突变, 这些变异不仅增强了病毒的传播性, 还显著提高了抗体抗性, 从而增强了其传染性和免疫逃逸能力^[5]。SARS-CoV-2 非结构蛋白的广泛突变提升了病毒适应环境的能力, 增加了感染率, 药物靶蛋白关键残基的突变还导致了耐药性的产生, 例如 SARS-CoV-2 RdRp 上的 S759A 和 V792I 等突变导致了病毒对瑞德西韦的耐药性^[6]。同样, SARS-CoV-2 M^{pro} S1 亚位点上的 E166V、F140L 和 S144A 等突变使病毒对奈玛特韦产生了耐药性^[7]。这些发现凸显了持续监测病毒变异和探究耐药性机制的重要性。

耐药突变不仅对全球公共卫生构成威胁, 还会导致医疗费用激增、治疗周期延长和巨大的经济损失等后果^[8]。尽管疫苗接种已在全球范围内广泛开

展, SARS-CoV-2 耐药株的出现仍削弱了通过疫苗建立的免疫屏障, 限制了临床治疗的有效性。因此, 开发具有抗耐药性的 SARS-CoV-2 抑制剂极为迫切。

SARS-CoV-2 M^{pro} 是病毒生命周期中不可或缺的蛋白水解酶, 在冠状病毒中高度保守, 且人体内缺乏同源蛋白酶, 因此成为抗 SARS-CoV-2 药物设计的理想靶标^[9-10]。鉴于此, 本文综述了 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂的现有抗耐药机制, 并探讨了抗耐药性 M^{pro} 抑制剂的设计策略。

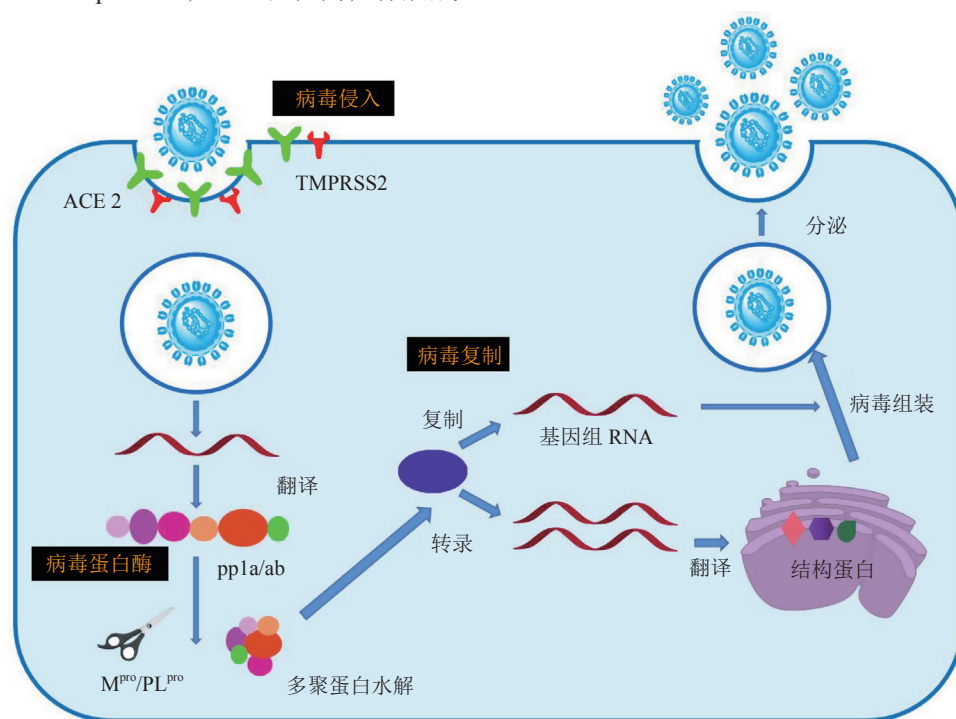
1 SARS-CoV-2 及主蛋白酶

SARS-CoV-2 是一种具有包膜的单正链 RNA 病毒, 属于冠状病毒属, 具有长度为 27.6~31 kb 的大型基因组。其基因组可编码多种非结构蛋白 (nonstructural protein, nsp) 及结构蛋白^[11]。结构蛋白包括核衣壳蛋白 (nucleocapsid protein, N)、膜蛋白 (membrane protein, M)、包膜蛋白 (envelope

protein, E) 和刺突蛋白 (spike protein, S)。

SARS-CoV-2 主要通过 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) 结合, 并通过与跨膜蛋白酶丝氨酸酶 2 (transmembrane protease serines-2, TMPRSS2) 的相互作用进入宿主细胞, 随后释放出其遗传物质 RNA 并附着在宿主细胞核糖体上, ORF1a 和 ORF1b 是基因组中关键的开放阅读框, 核糖体将二者翻译成两个多聚蛋白 (pp1a 和 pp1ab)。随后多聚蛋白经病毒自身的两个蛋白水解酶 M^{pro} 和木瓜样蛋白酶 (papain-like protease, PL^{pro}) 切割, 释放成

成熟的非结构蛋白 (nsp1~16)。这些 nsp 一部分参与病毒转录复制复合体 (replication and transcription complex, RTC) 的组装, 启动病毒复制^[11-12]。 M^{pro} 在这一过程中扮演着核心角色, 负责至少 11 个位点的切割, 对 SARS-CoV-2 的成熟和增殖发挥关键作用。RdRp 利用负链 RNA 作为模板合成新的正链 RNA, 进而合成亚基因组信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 这些 mRNA 翻译成病毒结构蛋白, 最终组装成为成熟的病毒颗粒, 并通过胞吐作用释放出细胞, 使病毒完成复制与传播^[11-12] (见图 1)。



ACE2: 血管紧张素转换酶 2; TMPRSS2: 跨膜蛋白酶丝氨酸酶 2

图 1 SARS-CoV-2 病毒的生命周期

Figure 1 SARS-CoV-2 life cycle

M^{pro} 是一种半胱氨酸蛋白酶, 由两个单体组成的同源二聚体, 每个单体包含 3 个结构域: N 端的 I 和 II 域由反平行 β -折叠构成; C 端的 III 域由 α -螺旋组成; II 与 III 域通过长环区相连^[13] (见图 2A)。 M^{pro} 具有独特的催化机制, 氨基酸残基 Cys145 和 His41 形成催化二联体, 不同于常见的 His-Asp(Glu)-Ser(Cys) 三联体, 其活性位点的第 3 个催化残基由水分子替代, 形成稳定的氧阴离子孔^[14]。

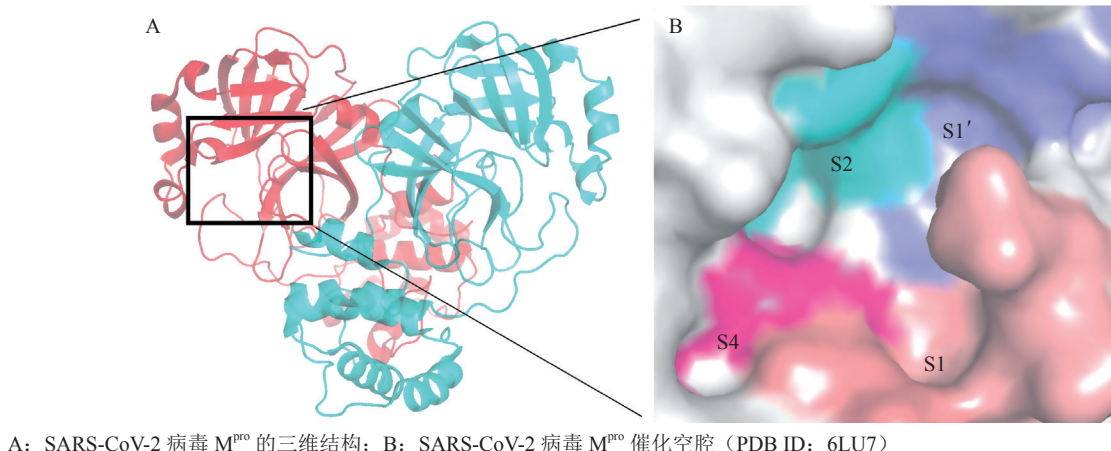
M^{pro} 能够特异性识别并切割非结构蛋白 nsp4~

nsp16 的 11 个位点, 释放功能蛋白, 这些蛋白对病毒基因组复制、转录、翻译后修饰及核酸合成至关重要。 M^{pro} 的底物特异性由活性位点的 S1、S2、S4 和 S1' 4 个空腔决定, 其中 S1 空腔对底物的 P1 部分具有最高的选择性, 偏好吡啶或内酰胺等氢键受体。S2 空腔则容纳体积较大的疏水残基, 而 S4 和 S1' 空腔较浅, 可分别容纳体积较小的残基^[15] (见图 2B)。

SARS-CoV-2 M^{pro} 的高分辨率三维结构由饶子

和团队于2020年1月解析,显示其与SARS-CoV M^{pro}有96%的同源性^[16],且M^{pro}在人体内无同源

蛋白酶,因此成为广谱抗CoVs药物设计的热点靶标。



A: SARS-CoV-2 病毒 M^{pro} 的三维结构; B: SARS-CoV-2 病毒 M^{pro} 催化空腔 (PDB ID: 6LU7)

图2 SARS-CoV-2 病毒 M^{pro} 的三维结构及催化空腔

Figure 2 The three-dimensional structure and catalytic cavity of Mpro from SARS-CoV-2

2 SARS-CoV-2 M^{pro} 耐药机制

随着药物的广泛使用,病毒通常会产生突变导致耐药性的出现。主要体现在病毒蛋白单个或多个氨基酸的改变,降低了靶蛋白与抗病毒药物的结合亲和力。2023年,Kiso等^[17]发现SARS-CoV-2 M^{pro}上M49L和E166A突变是导致上市药物恩塞特韦产生耐药性的原因。同年,Duan等^[7]利用病毒学、生物化学以及结构生物学研究等多学科交叉手段首次揭示了SARS-CoV-2可以利用两种截然不同的进化途径对奈玛特韦产生耐药(见图3A)。第一种进化途径涉及M^{pro}催化位点的S1与S4亚位点,包括S1亚位点上的E166V、F140L和S144A突变,以及S4位点上的L167F和A193P突变。这些突变可显著降低奈玛特韦与M^{pro}的结合能力,削弱其对M^{pro}的抑制能力。其中,E166V可以严重干扰其与S1亚位点的结合,使病毒耐药水平增加超过200倍。但由于奈玛特韦与M^{pro}的天然底物在结合模式上高度契合,这种变异方式会导致M^{pro}活性下降,进而影响病毒的复制效率。因此SARS-CoV-2又进化出第二种变异形式,即涉及M^{pro}的S2与S4'位点,包括S2位点上的L50F与S4'位点上的T21I突变。这些突变虽不影响奈玛特韦与M^{pro}的结合,但可以通过改善与底物的相互作用和减少药物对M^{pro}活性的影响来弥补第一种进化途径中酶活性的下降。与

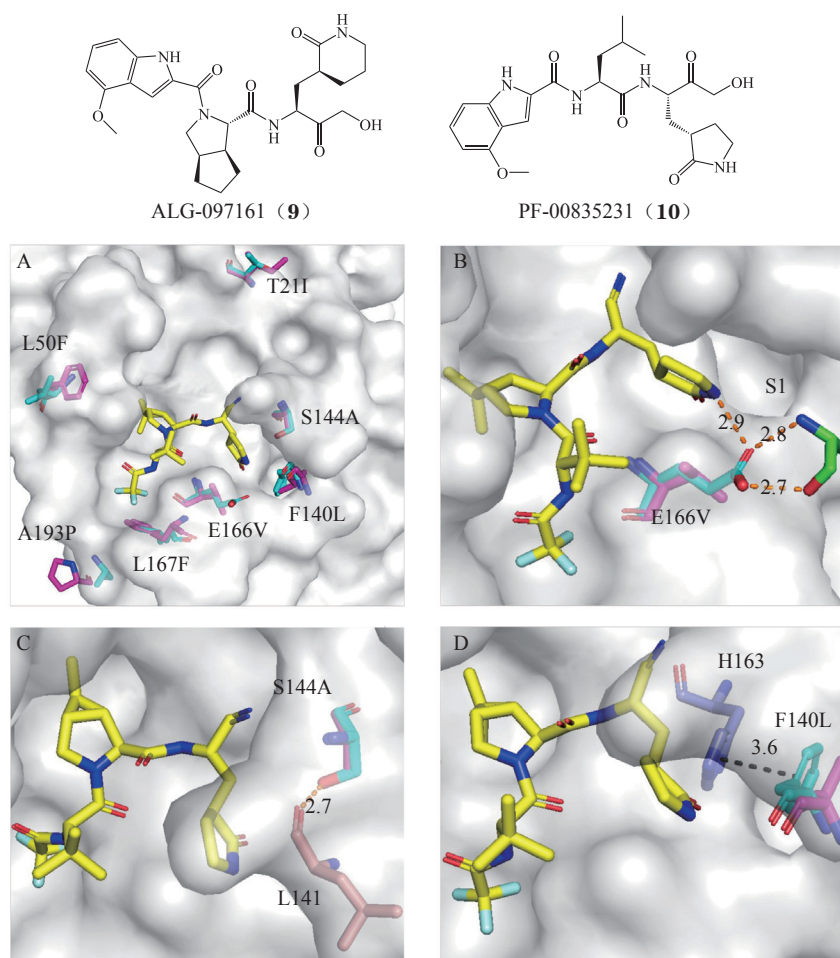
此同时,SARS-CoV-2可形成T21I/E166V或L50F/E166V双突变株,在削弱药物的抑制能力的同时保持自身的复制和传播能力。此外,该团队还发现SARS-CoV-2也可通过上述变异机制对恩塞特韦产生耐药,因此这种耐药机制很可能在目前临床应用M^{pro}抑制剂中普遍存在。

Jochmans等^[18]通过分析ALG-097161(9)与突变株M^{pro}的对接模式,发现氨基酸残基的突变减少了酶和抑制剂之间的相互作用,综合Duan等^[7]的研究,表明多数氨基酸残基的突变可以影响结合口袋的稳定性,进一步影响酶活性。M^{pro}的Glu166在化合物结合中发挥关键作用,通常与抑制剂形成多重氢键,多数情况下,其与内酰胺部分相互作用是抑制剂发挥效力的重要因素。E166A导致抑制剂与内酰胺部分的氢键直接丧失,在奈玛特韦、恩塞特韦和PF-00835231(10)中都存在此现象。此外,Glu166还与另一个单体形成额外的氢键以维持S1亚位点的构象,突变会导致S1亚位点稳定性降低(见图3B)。S144A的突变直接导致原Ser144侧链羟基与Leu141主链羰基间的氢键丧失,且同样影响了S1亚位点的稳定性,使得奈玛特韦和底物与M^{pro}的结合水平降低,导致了耐药性产生和M^{pro}活性下降(见图3C)。对于F140L突变,Phe140庞大的芳香侧链被一个体积较小的亮氨酸取代,破坏了其与His163

之间的 π - π 堆积作用, 降低了奈玛特韦与 S1 亚位点的结合力 (见图 3D)。同时, π - π 堆积的消失也使 Leu141-Asn142 这两个参与 S1 亚位点形成的残基主链远离化合物。A193P 使 Pro167-Thr169 的主链和长环区之间的氢键丧失, 降低了 S4 位点的稳定性与 M^{pro} 的活性。L167F 改变了结合口袋的大小, 导致酶和抑制剂间的范德华力降低。Thr21 突变为具有更大疏水侧链的异亮氨酸, 使酶与底物间的相互作用增强, 进一步提升酶的活性。L50F 则可能是改变了 Gln189 的侧链构象, 因此间接影响了 Gln189 与水分子氢键的相互作用。突变后残基的苯丙氨酸侧链体积较大, 显著增加了 Phe50 和 Gln189 之间的疏水作用, 进一

步稳定了 Gln189 主链构象并使 S2 口袋更加紧凑, 促进 M^{pro} 与底物之间形成疏水作用, 提高了 M^{pro} 的活性。

云南大学柳树群课题组采用分子动力学模拟和结合自由能计算等方法^[19], 探究了 SARS-CoV-2 M^{pro} 上 P132H 和 P132H-A173V 突变对奈玛特韦抑制活性的影响。相较于野生型毒株, P132H 突变增强了化合物与 M^{pro} 的非共价结合亲和力, 但同时减缓了共价键形成的整体速率, 这种突变可能会提高 M^{pro} 对奈玛特韦的敏感性; 而 P132H-A173V 双突变则在降低其与 M^{pro} 的非共价结合亲和力的同时加速了共价键的形成速率, 这可能会增强 SARS-CoV-2 对奈玛特韦的耐药性。



注: 黄色为奈玛特韦, 青色为突变前的残基, 粉紫色为突变后的残基, 浅粉色为 Leu141, 紫色为 His163, 绿色为单体 B 中的 Ser1, 橘色为氢键, 黑色为 π - π 堆积作用

A: 奈玛特韦与各突变残基示意图 (PDB ID: 7VH8/8H6N/8H7W/8H82/8H4Y/8H57/8H5F); B: E166V 突变造成奈玛特韦耐药的原因示意图 (PDB ID: 7VH8/8H82); C: S144A 突变造成奈玛特韦耐药的原因示意图 (PDB ID: 7VH8/8H7W); D: F140L 突变造成奈玛特韦耐药的原因示意图 (PDB ID: 7VH8/8H4Y)

图 3 E166V、T21I 和 L50F 突变在奈玛特韦耐药中具有不同的作用示意图

Figure 3 Different roles of E166V, T21I, and L50F mutations in the development of resistance to Nirmatrelvir

3 克服 SARS-CoV-2 M^{pro} 耐药性的抗病毒药物设计策略

耐药突变可能通过引入立体化学障碍与减少药物-靶标相互作用, 削弱药物的结合亲和力和抑制效力。在药物设计中, 增强蛋白质-配体相互作用和降低突变位点的影响是提升抗耐药性的关键策略。这包括多位点占据、靶向主链氢键、开发新的结合位点(如变构位点)、共价结合、底物包膜等策略, 以及提高抑制剂分子的位置适应性和构象灵活性, 以优化药物在结合口袋中的定位或引入构象限制。

此外, 多靶点药物设计和靶向蛋白水解机制也是应对病毒耐药性的有效手段。本文详细阐述了这些策略的基本原理, 并举例说明了它们在抗 SARS-CoV-2 M^{pro} 耐药性中的应用, 同时对未来的抗耐药性策略进行了展望。

3.1 改善候选药物与靶标之间的相互作用

酶的活性通常依赖于一些关键且高度保守的氨基酸残基, 这些残基对维持其生物功能至关重要。针对这些保守残基设计抑制剂是规避耐药性的有效策略。此外, 强化配体与蛋白质之间的相互作用, 可以提高药物结合的稳定性, 从而克服耐药性。为此, 可以通过优化配体的结合位点、实施多位点占据策略、探索新的结合位点, 以及利用“慢解离”共价结合等手段, 增强与目标蛋白的相互作用。这些方法有助于开发出能够有效抵抗耐药性的候选药物。

3.1.1 形成主链氢键 为应对交叉耐药性问题, 普渡大学的 Ghosh 等^[20] 提出了“Backbone Bonding Concept”策略, 即通过增强小分子与靶蛋白骨架原子间的氢键来提高药物的亲和力。蛋白酶需保持其活性位点构象稳定来维持其功能, 与耐药性相关的氨基酸残基在活性位点中不易发生突变。这些残基的保守性使它们成为抑制剂设计的理想靶标。此外, 由氨基酸主链构成的氢键网络对维持蛋白酶的结构和功能至关重要, 且不易受侧链突变的影响, 为抑制剂与蛋白酶间的结合提供了低自由能, 有助于抵抗由氨基酸突变引起的耐药性。

在 2023 年, Pardes Biosciences 与 Vanderbilt 大学联合开发了 SARS-CoV-2 M^{pro} 的拟肽类共价抑制剂 Pomotrelvir (**11**), 该抑制剂已进入 II 期临床^[21]。

化合物 **11** 通过氰基与 M^{pro} 的 Cys145 形成可逆的 C-S 共价键, 并与 M^{pro} 形成了 7 个氢键, 其中 5 个氢键是与 M^{pro} 氨基酸主链形成, 确保了其在 M^{pro} 结合口袋中的稳定结合(见图 4)。基于强氢键网络, 化合物 **11** 展现出对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的高抑制活性($IC_{50}=24\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}=10\sim 29\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

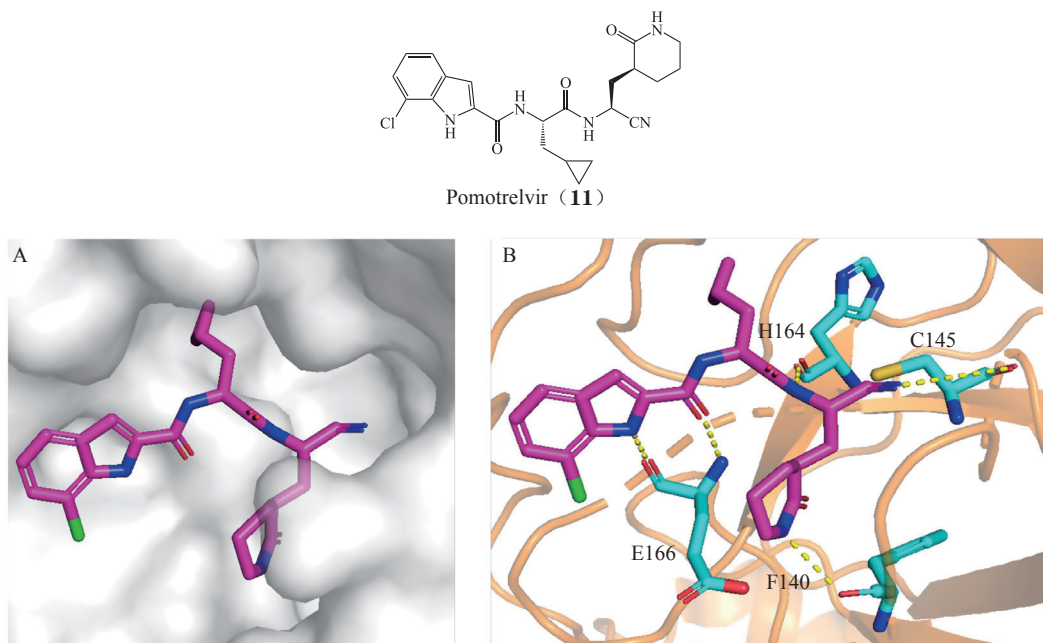
为评估耐药性影响, Pardes 公司对 12 个 M^{pro} 突变株进行了化合物 **11** 抑制实验, 发现化合物 **11** 对 T21I 和 L50F 突变仍保持高效抑制(EC_{50} 分别为 14 和 $33\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 仅比野生株略有下降。然而针对 S144A、E166A 和 L167F 单突变株, 化合物 **11** 的抗病毒有所降低(EC_{50} 分别为 0.092、0.11 和 $0.056\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且多突变株 L50F+E166A 和 L50F+E166A+L167F 表现出更高的耐药性, 化合物 **11** 的抗病毒活性显著下降(EC_{50} 分别为 0.41 和 $1.4\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3.1.2 “最大限度占据位点”策略 根据经典药物设计原则, 高活性抑制剂需充分占据结合口袋并与周围氨基酸形成多重有效作用。在类免疫缺陷病毒 1 型(human immunodeficiency virus 1, HIV-1)逆转录酶抑制剂的设计中, 一种有效策略是设计能同时作用于多个结合位点的化合物, 以维持对单突变株的抑制效力^[22]。

GC-14 (**12**) 是笔者所在课题组前期发现的先导化合物, 化合物 **12** 与 M^{pro} 的共晶结构揭示了 S1 腔尚有未利用空间(见图 5), 因此引入了吡啉衍生物以增强与 His163 的氢键作用, 并与周围残基形成新的作用力。通过多种药物化学策略联用, 包括阻断代谢位点、引入 F 原子、成盐及优势片段组装, 最终获得了化合物 GC-78 (**13**)^[23-24]。

化合物 **13** 在 M^{pro} 抑制活性上表现优异 [$IC_{50}=(0.2\pm 0.05)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 分子模拟显示, 新引入的甲氧基与 Asn142 形成额外氢键, 对甲氧基苯胺替换原有基团后更好地占据了 S4 空腔并与 Gln192 形成新氢键, 这是活性提升的关键。为提高水溶性, 合成了化合物 **13** 的盐酸盐, 化合物 **13** 和其盐酸盐的 EC_{50} 分别为 (0.62 ± 0.01) 和 $(0.40\pm 0.06)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 较先导化合物 **12** 活性提高了约 3 倍, 与奈玛特韦相当 [$EC_{50}=(0.38\pm 0.04)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]。化合物 **13** 的盐酸盐对 SARS-CoV-2 变异株(阿尔法、德尔

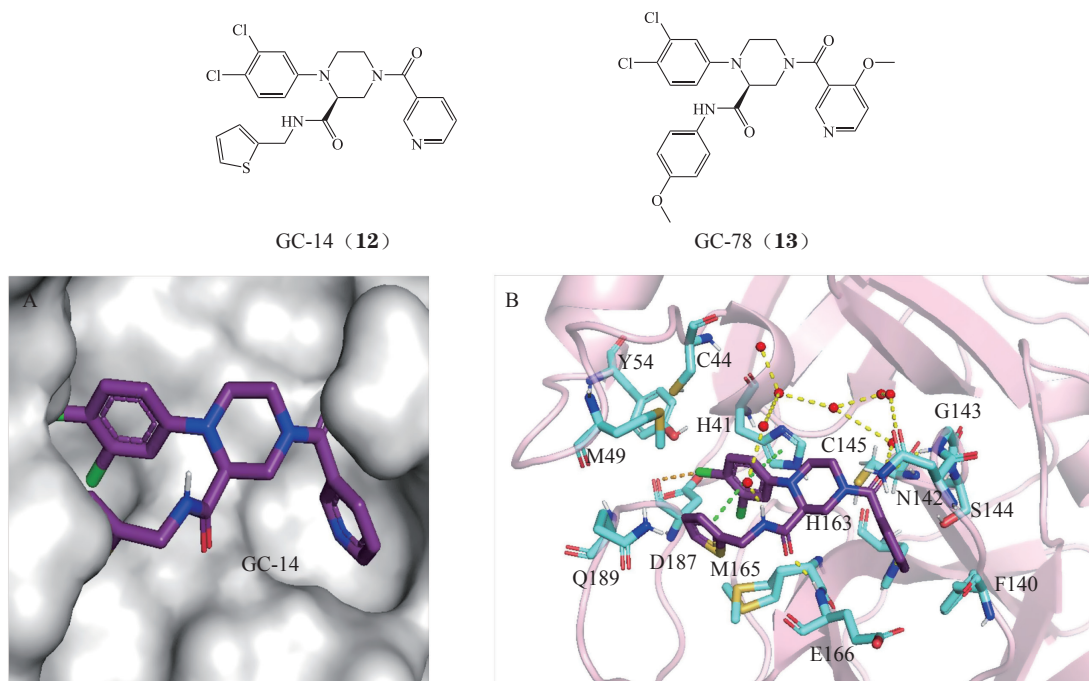
塔、奥密克戎) 显示出与野生株 ($EC_{50}=0.18 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 相当的抑制作用 ($EC_{50}=0.21 \sim 0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。



注: 粉紫色为化合物 **11**, 灰色为 M^{pro} , 黄色虚线为化合物 **11** 与 M^{pro} 氨基酸残基主链间形成的氢键
A: 化合物 **11** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **11** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构 (PDB ID: 8TBE)

图 4 化合物 **11** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构

Figure 4 X-ray structure of the complex of **11** and SARS-CoV-2 M^{pro}



注: 紫色为化合物 **12**, 黄色虚线为氢键作用, 绿色虚线表示 π - π 堆积作用
A: 化合物 **12** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **12** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构 (PDB ID: 8ACL)

图 5 化合物 **12** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构

Figure 5 X-ray structure of the complex of **12** and SARS-CoV-2 M^{pro}

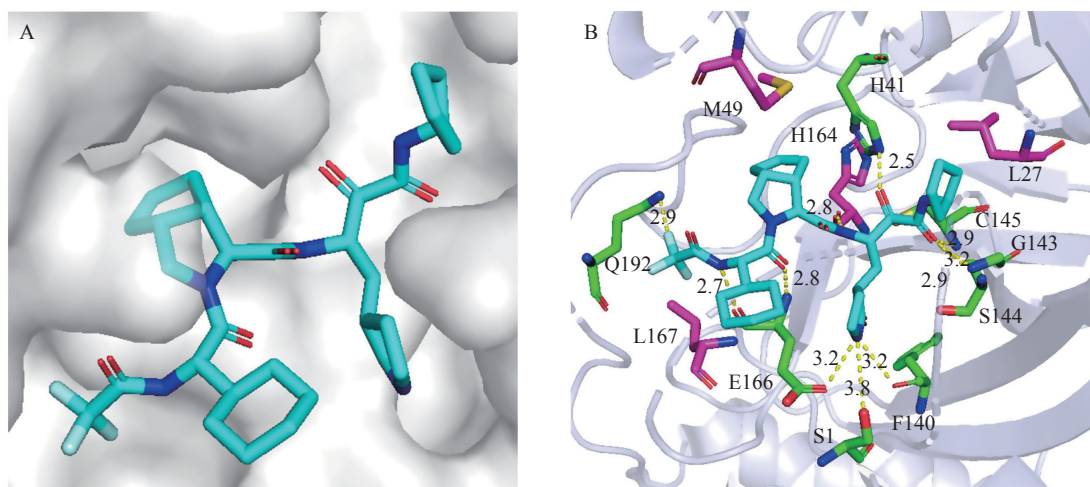
3.1.3 基于“慢解离”共价结合的药物设计策略 在药物设计领域,“慢解离”共价抑制剂因其在靶标上的持久作用往往显示出对抗耐药性的优势。这些抑制剂首先通过非共价相互作用与靶蛋白结合,然后由共价弹头与氨基酸残基形成稳定的共价键,从而延长其在靶标上的停留时间,有助于克服耐药性问题。

2023 年基于上市药物奈玛特韦,研发的靶向 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共价抑制剂(来瑞特韦)于中国上市^[25]。该药物保留了奈玛特韦中 P1、P4 的优势片段,并对 P1'、P2、P3 位点进行创新性修饰,以增强其特异性、亲和力和药代动力学特性。P1 位点的 γ -内酰胺和 P4 位点的三氟乙酰胺基团均与 Leu167 形成氢键,提高药物稳定性并改善药代动力学特性。

来瑞特韦在 P1' 位点采用环戊基取代的 α -酮酰胺弹头,与 Cys145 共价结合,增强了对 M^{pro} 的亲

和力。P2 位点的环戊基嵌入 S2 口袋,与疏水氨基酸残基形成疏水作用,增强结合能力。P3 位点的环己基延伸出活性位点,保持灵活性,可能有助于改善药代动力学特性和生物利用度(见图 6)。

动力学分析显示,对 SARS-CoV-2 M^{pro} 的 K_i 值为 $8.4 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,解离速率较奈玛特韦慢 12 倍,靶点停留时间大于 104 min,表明其为“慢解离”共价抑制剂。差示扫描荧光法表明,来瑞特韦与 M^{pro} 形成更稳定的复合物,并在耐药性测试中,对 L50F/E166V 和 E166V/L167F 双突变株表现出良好活性,EC₅₀ 分别为 (233 ± 4) 和 $(327 \pm 21) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$,反映了其稳定性和长效性,有助于减少耐药性。此外,来瑞特韦的药代动力学特性优于奈玛特韦,无需与利托那韦等联用,缓解了药物相互作用和安全性问题。



注:青色为化合物 **3**,灰色为 M^{pro},黄色虚线表示氢键,粉紫色表示与抑制剂形成疏水作用的残基
A: 化合物 **3** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **3** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构(PDB ID: 8IGN)

图 6 化合物 **3** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构

Figure 6 X-ray structure of the complex of **3** and SARS-CoV-2 M^{pro}

3.2 减少化合物与结合位点的空间位阻

在耐药株中,氨基酸突变常削弱药物与靶点的相互作用。通过调整结合口袋内的取代基以减少与突变位点的冲突,同时保留关键活性片段并增强分子的柔性,化合物能更好地适应结合位点的突变。这种策略有助于在靶蛋白发生突变的情况下维持药物的疗效。

3.2.1 “底物包膜”假说 研究显示,不同底物与蛋

白酶结合时,分子构象和占据区域高度一致,这一区域被称为“底物包膜”。King 等^[26]通过分析 HIV-1 蛋白酶与底物及抑制剂的共晶结构,定义了“底物包膜”和“抑制剂包膜”,发现蛋白酶耐药性突变位点通常位于抑制剂超出“底物包膜”的区域,这些位点的突变能够特异性干扰抑制剂与蛋白酶的结合,同时继续正常裂解底物。

基于这一发现,研究者提出,设计分子轮廓与

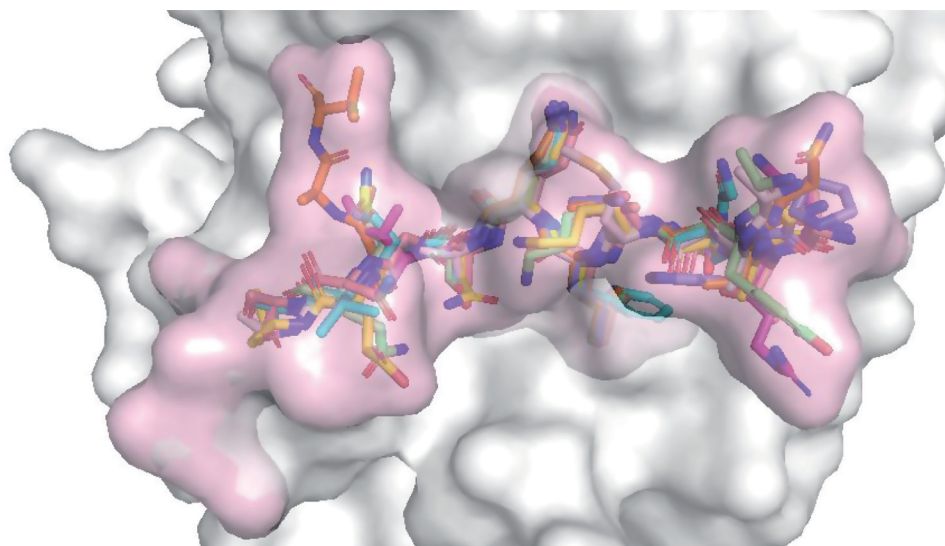
底物相似且不突出“底物包膜”的抑制剂, 仅与底物识别必需的氨基酸残基相互作用, 可以降低蛋白酶突变对药物效果的影响, 从而增强抗耐药性^[27]。

2023 年, Shaqra 等^[28]通过分析 SARS-CoV-2 M^{pro} 与天然底物的共晶结构, 明确了 M^{pro} 的底物包膜 (见图 7)。研究发现, 底物与 M^{pro} 活性位点残基的特异性相互作用及水分子间的保守氢键网络决定了底物的结构特异性。该团队还评估了包括奈玛特韦在内的 4 种 M^{pro} 抑制剂与底物包膜的适配性, 发现这些抑制剂均突出了“底物包膜”, 并与 Asn142、Gln189、Met49 和 Met165 等“膜”外氨基酸残基作用, 这些残基可采取灵活多变的构象与不同抑制剂结合。

在 P1 位点, 抑制剂的内酰胺环和其他环状基团突出底物包膜并与 Asn142 和 Glu166 相互作用;

P2 位点, 抑制剂沿着残基 Asp187-Gln192 和 Gln189 的可变区域突出底物包膜; P3 位点, 抑制剂与 Met165 形成广泛作用。由于这些残基的变化可能影响抑制剂的结合而不干扰与底物的相互作用, 团队推测 SARS-CoV-2 M^{pro} 可能通过这些位点突变产生耐药性, 此猜想随后得到证实。尽管 Glu166 与底物产生保守作用力, 但也能发生耐药性突变, 设计 M^{pro} 抑制剂时需考虑此因素; His163 在底物包膜内与 P1 处的谷氨酰胺形成高保守氢键, 保守的 Leu27 位于 P1' 口袋中; 而 Gln189 虽可发生耐药性突变, 但被 Asp187 和 Gln192 这两个高度保守的残基所环绕, 因此也较为保守。

尽管耐药性的产生受多种因素影响, 但利用病毒的保守生物特征, 将抑制剂限制在“底物包膜”内, 是限制突变和延长药物有效性的一个有效策略。



注: 灰色为 M^{pro}, 粉色为包膜区域

图 7 “底物包膜”示意图 (PDB ID: 7MB4 / 7MB5 / 7MB6 / 7MB7 / 7MB8 / 7MB9)
Figure 7 "Substrate Envelope" (PDB codes : 7MB4/7MB5/7MB6/7MB7/7MB8/7MB9)

3.2.2 直接减少与突变位点的相互作用 M^{pro} 的 E166A 和 L50F/E166A 突变导致 SARS-CoV-2 对多种抑制剂产生广谱耐药性。例如, E166V 显著降低了奈玛特韦和恩塞特韦等抑制剂与 S1 亚位点的结合力, 使耐药性分别提高了 300 倍和 78 倍^[7,29]。在 M^{pro} 抑制剂的设计中, 避免与这些易发生耐药突变的氨基酸残基相互作用, 有望增强药物的抗耐药性。

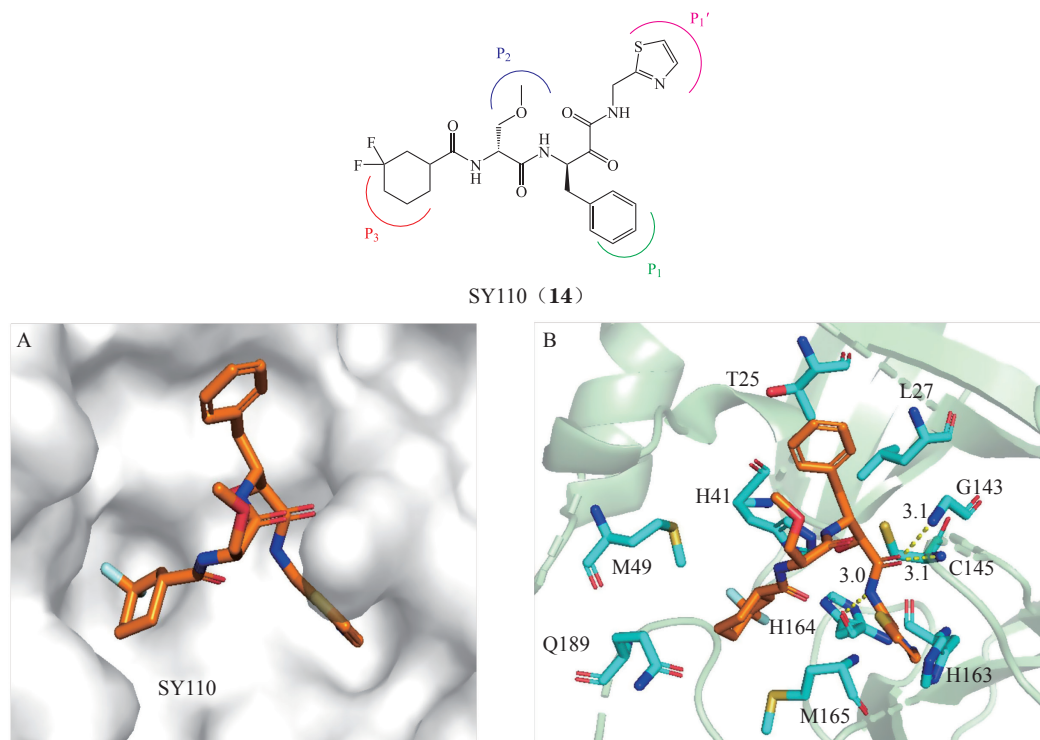
四川大学杨胜勇课题组发现了一种高活性、

高选择性的 M^{pro} 抑制剂 SY110 (**14**)^[30]。化合物 **14** 与奥密克戎变异株 M^{pro} 的结合模式独特, 其 α -酮酰胺部分与 Cys145 形成可逆共价键, 并与 His41、Cys145、Gly143 形成氢键。P1' 噻唑环与 His163 形成氢键, P1 苄基与 Thr25 和 Leu27 形成疏水作用, P2 的甲氧基指向溶剂区域, 而 P3 的二氟环己基占据 S2 口袋并与 Met49、Met165、Gln189 形成疏水作用 (见图 8)。化合物 **14** 在噻

唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) 法测试中未显示出细胞毒性 ($CC_{50} > 500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 且不与 Glu166 形成氢键, 可能具有针对 Glu166 突变的抗耐药性。

该团队通过荧光共振能量转移法评估了化合物 **14** 对 14 种 M^{pro} 突变株的活性。与奈玛特韦相比,

化合物 **14** 对 E166N 和 E166V 突变株的抑制活性显著提高 (IC_{50} 分别为 0.256 和 $0.784 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 且对奥密克戎 BA.5 毒株的抗病毒活性 ($EC_{50} = 1.264 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 是奈玛特韦 ($EC_{50} = 5.051 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 4 倍。此外, 化合物 **14** 还展现出良好的药代动力学特性和口服生物利用度。



注: 橙色为化合物 **14**, 灰色为 M^{pro} , 黄色虚线为氢键

A: 化合物 **14** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **14** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构 (PDB ID: 8HHU)

图 8 化合物 **14** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构

Figure 8 X-ray structure of the complex of **14** and SARS-CoV-2 M^{pro}

3.3 M^{pro} 与组织蛋白酶 L 双靶点药物设计策略

病毒通过依赖宿主细胞的信号通路和蛋白完成生命周期。研究发现, 许多拟肽类共价抑制剂易与宿主细胞的半胱氨酸和丝氨酸蛋白酶共价作用^[31]。SARS-CoV-2 主要通过宿主细胞的 TMPRSS2 和组织蛋白酶 L (cathepsin L, CatL) 激活其 S 蛋白, CatL 在酸性内吞体或溶酶体中裂解 S 蛋白, 是病毒入侵的关键步骤^[32]。同时靶向 SARS-CoV-2 M^{pro} 和 CatL 的双靶点抑制剂, 不仅能阻断病毒进入宿主细胞, 还能抑制病毒多聚蛋白的水解, 具有双重作用机制, 且能减少对单一靶点药物的依赖, 降低病毒突变和耐药性的影响。开发同时靶向病毒和宿主细胞的抑

制剂, 有助于减少药物剂量, 提高疗效, 减少不良反应^[33]。

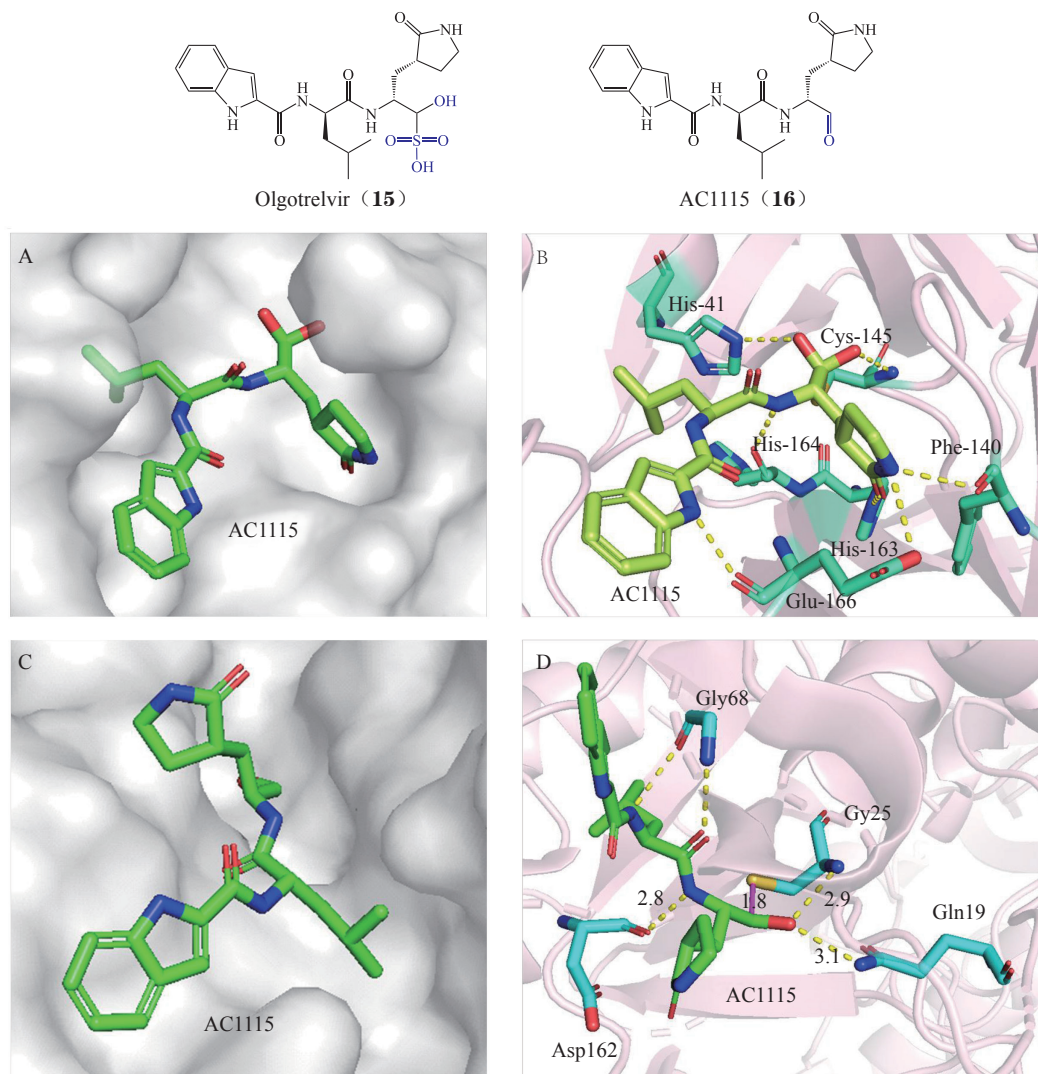
Olgotrelvir (**15**) 是一种口服前药, 可转化为活性形式 AC1115 (**16**), 具有高生物利用度。Mao 等^[34]在 2024 年通过抑酶活性测定和共晶解析证实了化合物 **15** 和化合物 **16** 的双重作用机制, 即能同时靶向 SARS-CoV-2 M^{pro} 和人 CatL, 对耐奈玛特韦的 M^{pro} Glu166 突变株有效, IC_{50} 分别为 2.44 和 $14.27 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, I 期临床研究显示良好安全性和抗病毒活性。

化合物 **16** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} (见图 9A、9B) 和人 CatL (见图 9C、9D) 的共晶结构显示,

醛基弹头与 M^{pro} 的 Cys145 及 CatL 的 Cys25 形成共价键, 并与 M^{pro} 和 CatL 形成多种疏水性和亲水性作用。化合物 **16** 的内酰胺占据 M^{pro} 的 S1 位点, 与 Glu166、His163 和 Leu141 形成氢键, 亮氨酸侧链适配 S2 口袋, 吡啶环与 M^{pro} 的柔性区域相互作用。在人 CatL 中, 醛基弹头的氧原子与 Cys25 和 Gln19 形成氢键, 构成水桥等多重作用。

Costanzi 等^[35] 发现了拟肽类抑制剂 MG-132 (**17**), 其醛基弹头与 M^{pro} 的 Cys145 形成共价键,

占据由 Gly143、Ser144 和 Cys145 主链酰胺基构成的“氧阴离子孔”, 并与 Gly143 和 Cys145 形成氢键(见图 10)。化合物 **17** 对 CatL 的抑制作用极强 ($IC_{50}=0.15 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$), 对 M^{pro} 也有抑制效果 ($IC_{50}=3.8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。通过构效关系分析发现, M^{pro} 在 P2 位置偏好亮氨酸, 而 CatL 则偏好芳香族残基。因此, P2 位置的亮氨酸侧链是调节化合物 **17** 对 CatL 和 M^{pro} 选择性的关键, 同时考虑用其他可逆共价弹头如 α -酮衍生物或腈替代醛基, 以优化其选择性。

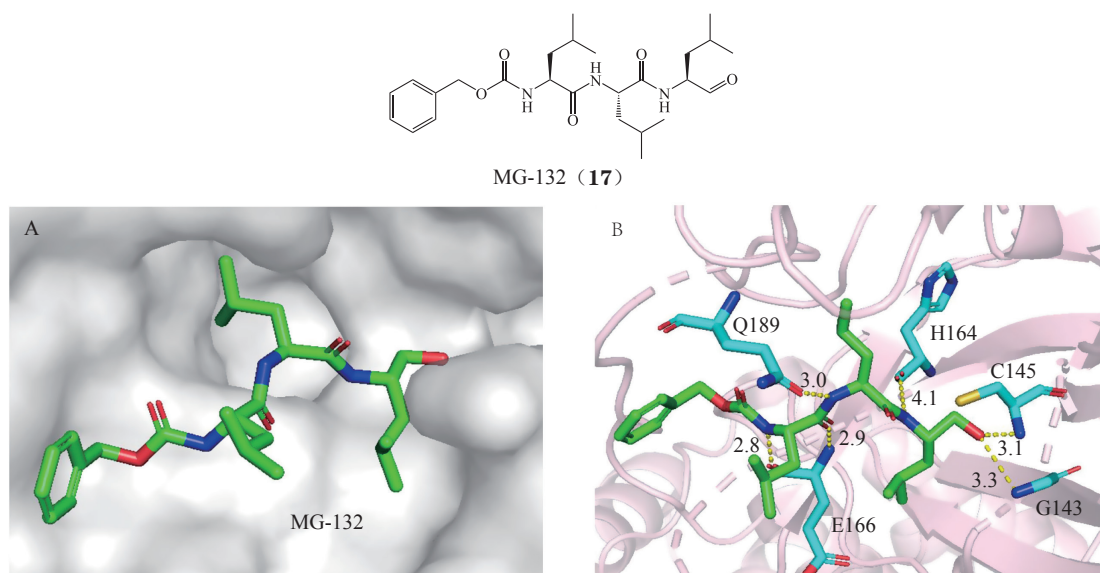


注: 绿色为化合物 **16**, 灰色为 M^{pro} , 黄色虚线表示氢键相互作用, 灰色为 CatL, 粉紫色实线表示化合物 **16** 与 Cys25 侧链硫原子的共价键作用

A: 化合物 **16** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **16** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构 (PDB ID: 8UAB); C: 化合物 **16** 与 CatL 的底物结合口袋示意图; D: 化合物 **16** 与 CatL 的共晶结构 (PDB ID: 8UAC)

图 9 化合物 **16** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 和人 CatL 的共晶结构

Figure 9 X-ray structure of compound **16** with SARS-CoV-2 M^{pro} and human cathepsin L



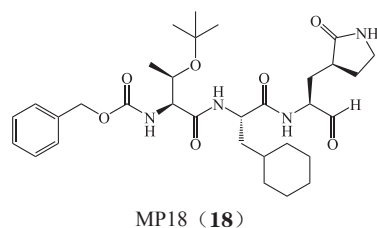
注: 绿色为化合物 **17**, 灰色为 M^{pro} , 黄线表示氢键相互作用

A: 化合物 **17** 与 M^{pro} 的底物结合口袋示意图; B: 化合物 **17** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构 (PDB ID: 7CUU)

图 10 化合物 **17** 与 SARS-CoV-2 M^{pro} 的共晶结构

Figure 10 X-ray structure of the complex of **17** and SARS-CoV-2 M^{pro}

MPI8 (**18**) 是一种以醛基为弹头的拟肽类抑制剂^[33], 对 M^{pro} 显示出强抑制作用 [$IC_{50} = (105 \pm 22) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$], 并对 CatL 具有高选择性 [$IC_{50} = (1.2 \pm 1.0) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$], 这降低了对宿主细胞造成潜在毒性的风险。



3.4 蛋白降解靶向嵌合体

靶向蛋白降解 (targeted protein degradation, TPD) 是药物开发的新兴领域, 通过细胞自身的蛋白质降解机制, 特异性地消除与疾病相关的蛋白质。TPD 技术, 尤其是蛋白降解靶向嵌合体 (proteolytic targeting chimera, PROTAC), 已在肝炎、流感和冠状病毒等抗病毒治疗中展现潜力^[36-38]。PROTAC 利用泛素-蛋白酶体系统 (ubiquitination-protease system, UPS), 通过结合目标蛋白和 E3 泛素连接酶, 促使目标蛋白泛素化并被特异性降解。VHL 和 CRBN 是两种被广泛应用的 E3 连接酶, 针对它们

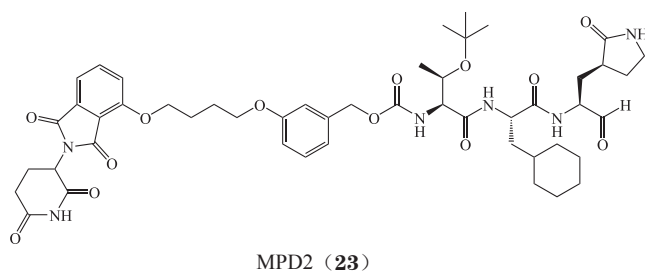
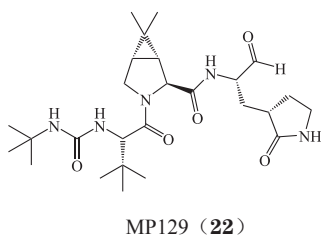
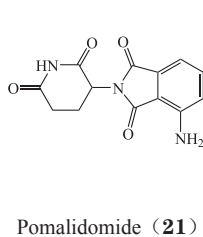
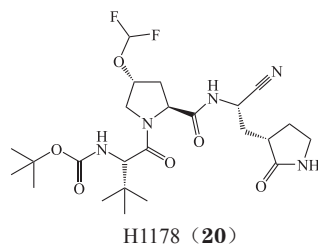
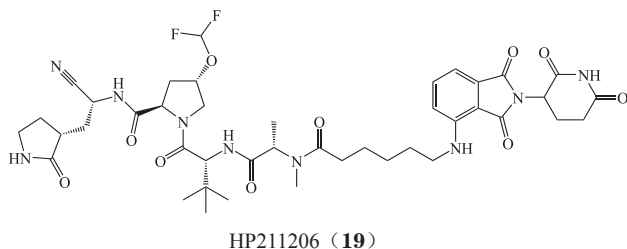
开发的多种配体, 使 PROTAC 在克服病毒耐药性方面具有显著意义^[36,39]。

Sang 等^[40] 设计了一种双功能小分子降解剂 HP211206 (**19**), 通过将 SARS-CoV-2 M^{pro} 高活性抑制剂 H117 (**20**) 与 E3 连接酶 CRBN 配体泊马度胺 (pomalidomide, **21**) 偶联。化合物 **19** 的 IC_{50} 为 $(181.9 \pm 8.6) \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 对 SARS-CoV-2 M^{pro} 具有强抑制作用, 且在 $100 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对 HEK 293T 细胞无毒性。在转染 SARS-CoV-2 M^{pro} 质粒的 HEK 293T 细胞中, 化合物 **19** 在 48 h 内有效诱导了 SARS-CoV-2 M^{pro} 的剂量依赖性降解, 半数最大降解浓度 (half-maximal degradation concentration, DC_{50}) 为 $621 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。此外, 化合物 **19** 还能有效降解 M^{pro} 的耐药突变株 E166V 和 E166A, 显示了其在克服耐药性方面的潜力。

Alugubelli 团队基于 SARS-CoV-2 M^{pro} 抑制剂 **18** 和 MPI29 (**22**)^[41], 以及 CRBN 配体 **21**, 合成了 MPD1~10 系列 PROTAC 分子。在 HEK 293T 细胞系中, 经蛋白免疫印迹法测试, 研究者证实了 MPD2 (**23**) 能快速且有效降低 M^{pro} 蛋白水平, DC_{50} 为 $296 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 且细胞毒性较小 ($CC_{50} = 120 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。浓度为 $3 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的化合物 **23** 与 M^{pro}

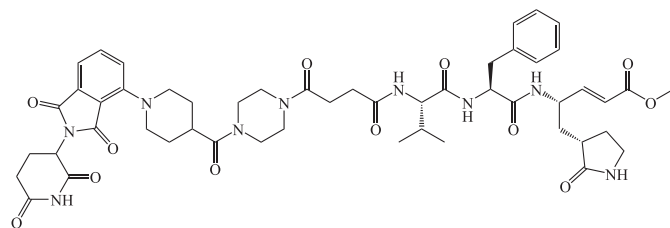
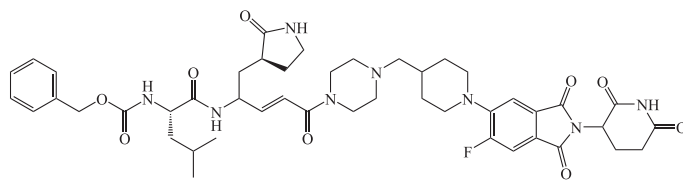
共同孵育 6 h 即显著降解 M^{pro} , 12 h 达到最大降解。随后, 该研究团队证明化合物 **23** 通过泛素-蛋白酶体

系统降解。此外, 化合物 **23** 具有显著体外抗 SARS-CoV-2 活性, EC_{50} 为 $492 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。



2024 年, Grifagni 团队基于 SARS-CoV-2 M^{pro} 与 GC-376 的构效关系^[42], 设计了两种拟肽类 PROTAC 分子。 M^{pro} 配体利用 (*S*)- γ -内酰胺环和氨基酸侧链分别占据 M^{pro} 的 S1 和 S2 亚位点, 并通过丙烯酸甲酯与 Cys145 形成共价键。合成的化合物

PROTAC 1 [**24**, $IC_{50} = (21.2 \pm 5.8) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$] 和化合物 PROTAC 2 (**25**, $IC_{50} > 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 通过哌嗪与哌啶“linker”将 M^{pro} 配体与泊马度胺偶联。蛋白免疫印迹法显示化合物 **24** 能有效降低 M^{pro} 表达, 具有细胞水平抗病毒活性, 且细胞毒性低。



3.5 靶向变构位点的药物设计

除了上述已应用于抗 SARS-CoV-2 耐药性的策略外, 还有靶向变构位点以及增强分子的构象灵活性与位置适应性等经典的抗耐药性策略值得借鉴。

生物大分子的变构特性对于多种生物过程的调控至关重要, 如酶催化、基因表达等。变构抑制剂通过结合酶的非活性位点, 导致酶构象变化和失活, 从而阻止底物结合, 实现非竞争性抑制。药物设计需考虑加强与保守氨基酸残基的相互作用, 变构配体可避免交叉耐药性, 通常具有高选择性和低毒性, 并可调节物理化学性质以增强效果^[9, 43]。因此, 变构抑制剂对抗耐药突变具有潜力, 并已在流感病毒抗耐药性药物设计中得以应用^[44-46]。

3.6 增强分子的构象灵活性与位置适应性

根据“锁钥模型”假说, 药物与靶点的结构互补性是提高特异性和亲和力的关键^[47]。在抗 SARS-CoV-2 的药物设计中, 一个关键的策略是提高药物分子与病毒靶点的结构互补性, 以增强特异性和亲和力。然而, 结构高度保守的药物分子虽能精确靶向目标蛋白, 但难以应对靶点耐药性突变。理论上, 若药物分子结构能适应病毒结构变化并保持关键相互作用, 可降低耐药风险, 因此药物的构象灵活性和位置适应性也是对抗耐药性的关键一点。研究者在进行抗病毒药物设计时, 应保留化合物与靶标保守区域的相互作用, 同时在可变区域引入灵活结构以提高适应性。具有这些特性的抑制剂能有效适应靶标变化, 对耐药毒株保持抑制活性^[48-49]。

4 结语与展望

SARS-CoV-2 M^{pro} 作为抗新冠药物研发的关键靶点, 其抑制剂开发取得显著进展, 已有多种药物获批上市。然而, 病毒的快速变异引发的耐药性问题, 不仅削弱了药物疗效, 更对全球公共卫生安全构成新的威胁。因此, 研发安全可靠、广谱抗耐药的新型 M^{pro} 抑制剂仍是迫切的临床需求。

SARS-CoV-2 的耐药性主要由病毒基因结构的变异引起, 不仅降低了药物与 M^{pro} 的结合能力, 还增强了病毒活性。但随着结构生物学、生物信息学和计算机科学的发展, 对提高药物抗耐药性的方法已变得更加明晰。通过对目前已成功应用的抗耐药药物化学策略进行总结, 为改善 M^{pro} 抑制剂的抗耐药能力提供了借鉴。

研究发现, 靶向 M^{pro} 的相对保守区域, 通过增强与主链原子的氢键作用, 可以有效降低耐药性突变的风险; 同时, 在结合位点增加额外的相互作用, 如多位点占据和共价结合, 可以弥补化合物与 M^{pro} 亲和力的损失; 此外, 采用合适的生物活性构象, 降低结合能量, 也是应对耐药突变的有效策略; 变构位点的发现和变构抑制剂的设计, 为抑制酶活性提供了新思路; “慢解离”共价抑制剂和多靶点药物的开发, 进一步降低了耐药性的发生; 而以 PROTAC 技术为代表的新型蛋白降解策略, 通过高效降解难成药及易突变的靶标, 为抗病毒治疗开辟了新途径。

展望未来, 针对 PROTAC 技术, 除开发更多新型易成药的 E3 连接酶配体外, 也应关注发展迅猛的自噬-溶酶体靶向降解 (autophagy-tethering compound, ATTEC)、溶酶体靶向嵌合体 (lysosome-targeting chimaera, LYTAC) 等降解技术; 另外, 结构生物学技术的应用, 将会提供更高分辨率的蛋白-抑制剂复合物结构, 指导更精确的药物设计; 计算化学和人工智能算法的集成, 将加速潜在候选药物的筛选。药物组合疗法的开发, 将最大程度减少耐药性的发展。国际社会的合作, 将有利于更快地识别耐药性问题, 评估新药效果, 并制定治疗指南。

在冠状病毒持续演化和跨物种传播的背景下, 开发广谱抗病毒药物, 不仅用于应对 SARS-CoV-2, 也能有效对抗其他潜在的新发冠状病毒。通过这些策略, 将会开发出更为有效的、具有抗耐药性的广谱抗病毒药物。这不仅是科学的胜利, 更是人类智慧和团结的象征, 为全球公共卫生安全筑起坚固的防线, 照亮人类走向健康的未来道路。

【参考文献】

- [1] Kesheh M M, Hosseini P, Soltani S, *et al.* An overview on the seven pathogenic human coronaviruses[J/OL]. *Rev Med Virol*, 2022, 32(2): e2282[2024-07-11]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rmv.2282>.

- [2] Mei M, Tan X. Current strategies of antiviral drug discovery for COVID-19[J/OL]. *Front Mol Biosci*, 2021, 8: 671263[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8155633/>. DOI: 10.3389/fmolb.2021.671263.
- [3] Stein S R, Ramelli S C, Grazioli A, *et al.* SARS-CoV-2 infection and persistence in the human body and brain at autopsy[J]. *Nature*, 2022, 612(7941): 758–763.
- [4] Hui D S C, Zumla A. Advances in the epidemiology, clinical features, diagnosis, clinical management and prevention of coronavirus disease 2019[J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2022, 28(3): 166–173.
- [5] Menni C, Valdes A M, 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/OL]. *Lancet*, 2022, 399: 1618–1624[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8989396/>. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)00327-0.
- [6] Stevens L J, Pruijssers A J, Lee H W, *et al.* Mutations in the SARS-CoV-2 RNA-dependent RNA polymerase confer resistance to remdesivir by distinct mechanisms[J/OL]. *Sci Transl Med*, 2022, 14(656): eabo0718[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9097878/>. DOI:10.1126/scitranslmed.abo0718.
- [7] Duan Y, Zhou H, Liu X, *et al.* Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir[J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 376–382.
- [8] Matthew A N, Leidner F, Lockbaum G J, *et al.* Drug design strategies to avoid resistance in direct-acting antivirals and beyond[J]. *Chem Rev*, 2021, 121(6): 3238–3270.
- [9] Ullrich S, Nitsche C. The SARS-CoV-2 main protease as drug target[J/OL]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30(17): 127377[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7331567/>. DOI:10.1016/j.bmcl.2020.127377.
- [10] Arya R, Kumari S, Pandey B, *et al.* Structural insights into SARS-CoV-2 proteins[J/OL]. *J Mol Biol*, 2021, 433(2): 166725[2024-07-11]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-2836\(20\)30642-2](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022-2836(20)30642-2). DOI:10.1016/j.jmb.2020.11.024.
- [11] Song L, Gao S, Ye B, *et al.* Medicinal chemistry strategies towards the development of non-covalent SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitors[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(1): 87–109.
- [12] 朱峻良, 戴权, 朱韧, 等. 新型冠状病毒感染治疗药物研究进展[J]. *药科学进展*, 2023, 47(7): 19–531.
- [13] La Monica G, Bono A, Lauria A, *et al.* Targeting SARS-CoV-2 main protease for treatment of COVID-19: covalent inhibitors structure-activity relationship insights and evolution perspectives[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(19): 12500–12534.
- [14] Zhou X, Zhong F, Lin C, *et al.* Structure of SARS-CoV-2 main protease in the apo state[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(4): 656–659.
- [15] Xiong M, Su H, Zhao W, *et al.* What coronavirus 3C-like protease tells us: from structure, substrate selectivity, to inhibitor design[J]. *Med Res Rev*, 2021, 41(4): 1965–1998.
- [16] 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(7811): 289–293.
- [17] Kiso M, Yamayoshi S, Iida S, *et al.* *In vitro* and *in vivo* characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir[J/OL]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4231[2024-07-11]. <https://www.nature.com/articles/s41467-023-40018-1>. DOI:10.1038/s41467-023-40018-1.
- [18] Jochmans D, Liu C, Donckers K, *et al.* The substitutions L50F, E166A, and L167F in SARS-CoV-2 3CL^{pro} are selected by a protease inhibitor *in vitro* and confer resistance to nirmatrelvir[J/OL]. *mBio*, 2023, 14(1): e0281522[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9973015/>. DOI:10.1128/mbio.02815-22.
- [19] Xia Y L, Du W W, Li Y P, *et al.* Computational insights into SARS-CoV-2 main protease mutations and nirmatrelvir efficacy: the effects of P132H and P132H-A173V[J]. *J Chem Inf Model*, 2024, 64(13): 5207–5218.
- [20] Ghosh A K, Anderson D D, Weber I T, *et al.* Enhancing protein backbone binding—a fruitful concept for combating drug-resistant HIV[J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2012, 51(8): 1778–1802.
- [21] Tong X, Keung W, Arnold L D, *et al.* Evaluation of *in vitro* antiviral activity of SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor pomotrelvir and cross-resistance to nirmatrelvir resistance substitutions[J/OL]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2023, 67(11): e0084023[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10649086/>. DOI: 10.1128/aac.00840-23.
- [22] Mao C, Sudbeck E A, Venkatachalam T K, *et al.* Structure-based drug design of non-nucleoside inhibitors for wild-type and drug-resistant HIV reverse transcriptase [J]. *Biochem Pharmacol*, 2000, 60(9): 1251–1265.

- [23] Gao S, Song L, Sylvester K, *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of trisubstituted piperazine derivatives as noncovalent severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 main protease inhibitors with improved antiviral activity and favorable druggability[J]. *J Med Chem*, 2023, 66(23): 16426–16440.
- [24] 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(19): 13343–13364.
- [25] Chen X, Huang X, Ma Q, *et al.* Preclinical evaluation of the SARS-CoV-2 M^{pro} inhibitor RAY1216 shows improved pharmacokinetics compared with nirmatrelvir[J]. *Nat Microbiol*, 2024, 9(4): 1075–1088.
- [26] King N M, Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika E A, *et al.* Combating susceptibility to drug resistance: lessons from HIV-1 protease[J]. *Chem Biol*, 2004, 11(10): 1333–1338.
- [27] Yilmaz N K, Swanson R, Schiffer C A. Improving viral protease inhibitors to counter drug resistance[J]. *Trends Microbiol*, 2016, 24(7): 547–557.
- [28] Shaqra A M, Zvornicanin S N, Huang Q Y J, *et al.* Defining the substrate envelope of SARS-CoV-2 main protease to predict and avoid drug resistance[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 3556[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9211792/>. DOI:10.1038/s41467-022-31210-w.
- [29] Moghadasi S A, Biswas R G, Harki D A, *et al.* Rapid resistance profiling of SARS-CoV-2 protease inhibitors[J]. *Antimicrob Resist*, 2023, 1: 9[2024-07-11]. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00009-0>.
- [30] Huang C, Shuai H, Qiao J, *et al.* A new generation M^{pro} inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 omicron variants[J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 128[2024-07-11]. <https://www.nature.com/articles/s41392-023-01392-w>. DOI:10.1038/s41392-023-01392-w.
- [31] Citarella A, Scala A, Piperno A, *et al.* SARS-CoV-2 M^{pro}: a potential target for peptidomimetics and small-molecule inhibitors[J/OL]. *Biomolecules*, 2021, 11(4): 607[2024-07-11]. <https://www.mdpi.com/2218-273X/11/4/607>. DOI:10.3390/biom11040607.
- [32] 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.
- [33] Ma X R, Alugubelli Y R, Ma Y, *et al.* MPI8 is potent against SARS-CoV-2 by inhibiting dually and selectively the SARS-CoV-2 main protease and the host cathepsin L[J/OL]. *ChemMedChem*, 2022, 17(1): e202100456[2024-07-11]. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202100456>.
- [34] Mao L, Shaabani N, Zhang X, *et al.* Oligotrelvir, a dual inhibitor of SARS-CoV-2 M^{pro} and cathepsin L, as a standalone antiviral oral intervention candidate for COVID-19[J/OL]. *Med*, 2024, 5(1): 42–61.
- [35] Costanzi E, Kuzikov M, Esposito F, *et al.* Structural and biochemical analysis of the dual inhibition of MG-132 against SARS-CoV-2 main protease (M^{pro}/3CL^{pro}) and human cathepsin-L[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(21): 11779[2024-07-11]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/21/11779>. DOI:10.3390/ijms222111779.
- [36] Wispelaere M D, Du G, Donovan K A, *et al.* Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations[J/OL]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3468[2024-07-11]. <https://www.nature.com/articles/s41467-019-11429-w>. DOI:10.1038/s41467-019-11429-w.
- [37] Zhao J, Wang J, Pang X, *et al.* An anti-influenza A virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA[J/OL]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 2079[2024-07-11]. <https://www.nature.com/articles/s41467-022-29690-x>. DOI:10.1038/s41467-022-29690-x.
- [38] Desantis J, Mercorelli B, Celegato M, *et al.* Indomethacin-based PROTACs as pan-coronavirus antiviral agents[J/OL]. *Eur J Med Chem*, 2021, 226: 113814[2024-07-11]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8416298/>. DOI:10.1016/j.ejmech.2021.113814.
- [39] Békés M, Langley D R, Crews C M. PROTAC targeted protein degraders: the past is prologue[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21(3): 181–200.
- [40] Sang X, Wang J, Zhou J, *et al.* A chemical strategy for the degradation of the main protease of SARS-CoV-2 in cells[J]. *J Am Chem Soc*, 2023, 145(50): 27248–27253.
- [41] Alugubelli Y R, Xiao J, Khatua K, *et al.* Discovery of first-in-Class PROTAC degraders of SARS-CoV-2 main protease[J]. *J Med Chem*, 2024, 67(8): 6495–6507.
- [42] Grifagni D, Lenci E, De Santis A, *et al.* Development of a GC-376 based peptidomimetic PROTAC as a degrader of 3-chymotrypsin-like protease of SARS-CoV-2[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2024, 15(2): 250–257.

- [43] Grover A K. Use of allosteric targets in the discovery of safer drugs[J]. *Med Princ Pract*, 2013, 22(5): 418–426.
- [44] Schoepfer J, Jahnke W, Berellini G, *et al.* Discovery of asciminib (ABL001), an allosteric inhibitor of the tyrosine kinase activity of BCR-ABL1[J]. *J Med Chem*, 2018, 61(18): 8120–8135.
- [45] Qiang W, Antelope O, Zabriskie M S, *et al.* Mechanisms of resistance to the BCR-ABL1 allosteric inhibitor asciminib[J]. *Leukemia*, 2017, 31(12): 2844–2847.
- [46] Wylie A A, Schoepfer J, Jahnke W, *et al.* The allosteric inhibitor ABL001 enables dual targeting of BCR-ABL1[J]. *Nature*, 2017, 543(7647): 733–737.
- [47] Ohtaka H, Freire E. Adaptive inhibitors of the HIV-1 protease[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2005, 88(2): 193–208.
- [48] Das K, Sarafianos S G, Clark A D J, *et al.* Crystal structures of clinically relevant Lys103Asn/Tyr181Cys double mutant HIV-1 reverse transcriptase in complexes with ATP and non-nucleoside inhibitor HBY 097[J]. *J Mol Biol*, 2007, 365(1): 77–89.
- [49] Li G, Hilgenfeld R, Whitley R, *et al.* Therapeutic strategies for COVID-19: progress and lessons learned[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(6): 449–475.



【本期栏目主编】展鹏：山东大学药学院教授，博士生导师，入选国家高层次青年人才、山东大学杰出中青年学者、基金委创新群体项目骨干；主持科技部重点研发计划、国家自然科学基金面上项目、国际（地区）合作、山东省重大科技创新工程等 10 余项课题。长期从事抗病毒及重大慢病药物研发，共同研发的三类候选药物已转化（获临床试验批件 2 项）。成果以第一或通讯作者发表在 *Chem Soc Rev*, *The Innovation*, *Advanced Science*, *J Med Chem* (39 篇), *Acta Pharm Sin B*, *Elife*, *Drug Resist Updat*, *Med Res Rev*, *J Med Virol* 等期刊, H 指数为 49；申请及授权专利 34 项；主编中英文专著 3 部，参编专著及教材 10 余部。担任药物化学 Top 期刊 *J Med Chem* 编委, *Acta Pharm Sin B*, *Curr Med Chem* 等 10 余个期刊的（青年）编委；在 *Eur J Med Chem*, *Drug Discov Today* 等客座主持专刊 10 余次。获中国药学会青年药物化学奖、日本学术振兴会特别研究员奖学金、全国百篇优博论文提名、山东高校优秀科研成果奖等。连续入选全球前 2% 科学家榜单（斯坦福大学）及“全球顶尖前 10 万科学家”榜单；入选全国药学专家学术影响力百强（全球学者库）。



【专家介绍】刘新泳：山东大学特聘教授，博士生导师，泰山学者，山东省医学领军人才，享受国务院特殊津贴。长期从事抗病毒和抗痛风创新药物的研发，先后承担多项国家级重大、重点和面上课题 10 余项。在 *J Med Chem*, *Chem Soc Rev*, *Elife*, *Signal Transduct Target Ther*, *Med Res Rev* 等权威期刊累计发表 SCI 论文 400 余篇；获国家发明专利 70 余项；主编《基于靶标的抗艾滋病药物研究》《*Antiviral Drug Discovery and Development*》《抗艾滋病药物研究》《实验室有机化合物制备与分离技术》等专著，参编 *Advances in Metallodrugs* 等多部国际专著；曾荣获国家科技进步二等奖 1 项（第三，2015），山东省科技进步一等奖 1 项（第二，2012），山东省教育厅科技进步三等奖 2 项，山东省高等学校优秀科研成果奖一等奖 2 项、二等奖 1 项（第一，2010、2016、2005）；曾获 2001 山东省青年科技奖、2010 年山东省医学领军人才，2011 年获享受国务院政府特殊津贴、2012 年获全国优秀百篇论文提名奖指导教师；2021 年获山东省优秀科技工作者称号。论文多次被 *Coordin Chem Rev*, *J Am Chem Soc*, *Nat Rev Rheumatol*, *Chem Commun*, *Org Lett* 等化学及生命科学领域权威期刊引用。2014—2023 年连续入选 Elsevier “中国高被引学者”。