



新型冠状病毒抗体和小分子抑制剂的研究现状*

武 昕 于汉杰 包晓娟 王雨姿 李 铮**

(西北大学生命科学学院功能糖组学实验室, 西安 710069)

摘要 世界卫生组织已宣布新型冠状病毒感染 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的爆发为全球大流行。中和抗体和小分子抑制剂在预防及治疗 COVID-19 中发挥重要作用。尽管已开发出了多种中和抗体以及疫苗, 但是随着病原体严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 的不断变异, 现有的抗体及疫苗面临巨大的挑战。小分子抑制剂主要通过干扰病毒与宿主的结合以及病毒自身的复制达到消灭病毒以及抑制病毒感染的作用, 并且对 SARS-CoV-2 突变株具有广谱抑制作用, 是当前研究的热点。近年来国内外学者对 SARS-CoV-2 的小分子抑制剂做了大量的研究工作, 本文根据中和抗体识别的抗原表位以及小分子抑制剂的作用机制分别对用于预防及治疗 COVID-19 的中和抗体和小分子抑制剂进行综述, 讨论其研究现状, 并展望小分子抑制剂的应用前景, 以期为该领域的进一步研究提供参考。

关键词 新型冠状病毒感染, 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2, 突变株, 中和抗体, 小分子抑制剂

中图分类号 Q5, Q7

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0093

由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 (COVID-19) 在全球范围内迅速传播, 已构成严重的全球公共卫生紧急情况^[1-2]。世界卫生组织于 2020 年 3 月宣布 SARS-CoV-2 感染为大流行。SARS-CoV-2 属于 β 冠状病毒, 其基因组由正链 RNA 组成, 约 30 000 个核苷酸, 包含 12 个开放阅读框 (open-reading frames, ORF), 编码 4 种结构蛋白和 22 种非结构蛋白 (non-structural proteins, Nsps)^[3]。目前, 疫苗和中和抗体依然是 COVID-19 重要的防治手段, 但是随着病毒变异株的出现, 抗体的中和活性面临巨大的挑战。最近的研究表明, 新型突变株如 B.1.1.529 变种能够逃逸通过疫苗或前期感染所获得的免疫保护能力, 从而导致更强的传播能力以及更高的感染率和重复感染可能^[4]。近年来研究发现, 小分子抑制剂能有效干预和阻断 SARS-CoV-2 的复制和传播。因此, 本文从小分子抑制剂的种类以及功能方面进行概述, 并讨论其在抗 SARS-CoV-2 感染方面的研究进展。

1 SARS-CoV-2 的结构

SARS-CoV-2 是一种包膜病毒, 包含 4 种结构蛋白, 即刺突蛋白 (spike, S)、膜蛋白 (membrane, M)、包膜蛋白 (envelope, E) 以及核衣壳蛋白 (nucleocapsid, N) (图 1a)^[5]。S 蛋白以三聚体形式存在于病毒粒子表面。单体 S 蛋白包含负责与宿主细胞受体结合的 S1 亚基以及负责病毒与细胞膜融合的 S2 亚基 (图 1b)^[6-7]。S1 亚基的 N 端结构域 (N-terminal domain, NTD) 负责与糖类结合, 受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 参与病毒与宿主细胞受体结合。S2 亚基的融合肽 (fusion peptide, FP) 在介导与宿主细胞膜融合中发挥作用, 七肽重复序列 1 (heptapeptide repeat sequence 1, HR1) 和七肽重复序列 2 (HR2)

* 陕西省重点研发计划 (2021ZDLSF01-04) 和陕西省自然科学基金基础研究计划 (2021JM-319) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 029-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

收稿日期: 2023-03-21, 接受日期: 2023-07-25

相互作用形成稳定的六螺旋束, 将病毒和宿主细胞紧密地结合, 使病毒附着到宿主细胞上, 跨膜结构域 (transmembrane domain, TM) 与细胞质结构域 (cytoplasm domain, CP) 一起促使S蛋白黏附在宿主细胞^[8-10]。M蛋白负责维持病毒粒子的形状^[11]。高度保守的E蛋白是一种亲水性跨膜蛋白, 富含缬

氨酸和亮氨酸残基, 在感染巨噬细胞的病毒颗粒出芽过程中发挥重要作用^[12]。E和M蛋白共同促进病毒进入宿主细胞, 并在宿主细胞内复制和组装^[10]。N蛋白与病毒RNA一起构成核衣壳, 其功能是维持基因组结构, 促进病毒组装、复制和与宿主细胞的相互作用^[13]。

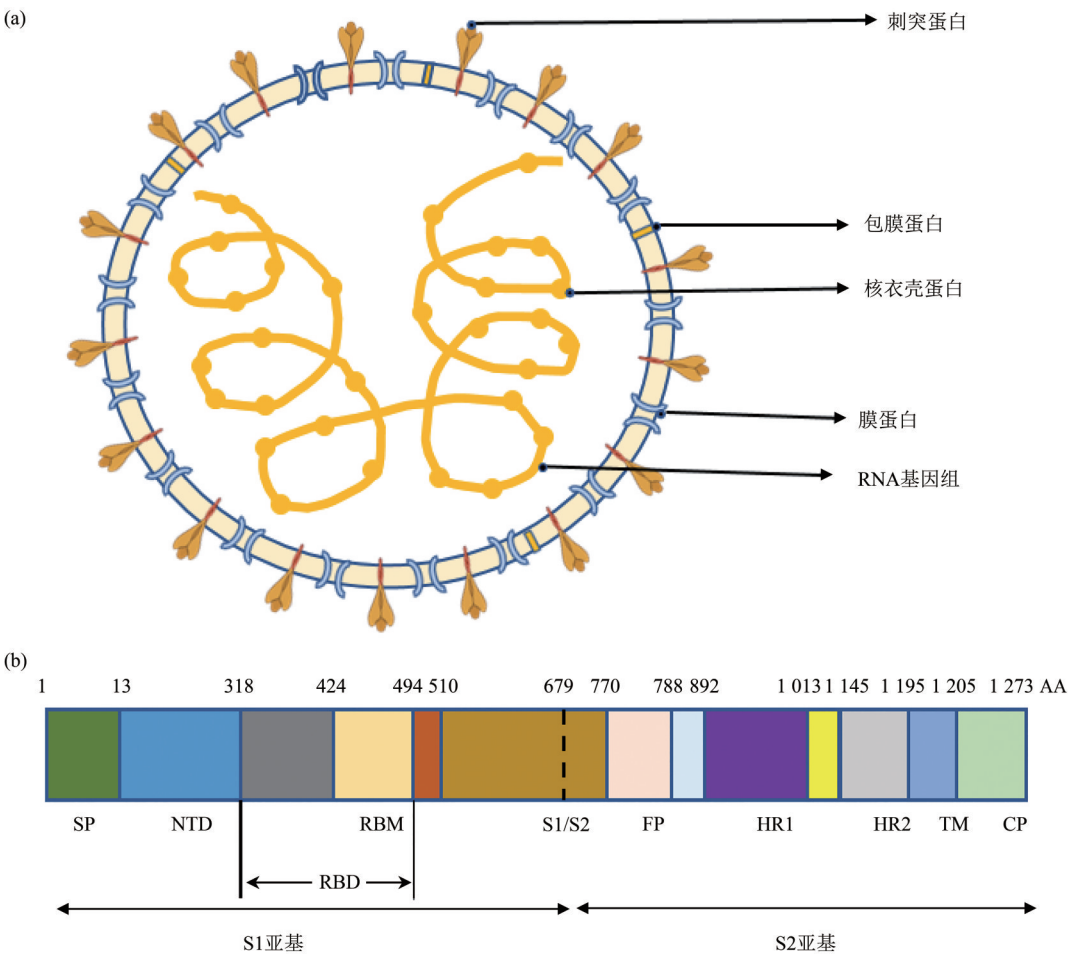


Fig. 1 Structural features of SARS-CoV-2^[5]

图1 SARS-CoV-2结构特征^[5]

(a) SARS-CoV-2的结构: 由刺突蛋白, 包膜蛋白, 核衣壳蛋白和膜蛋白4种蛋白质以及RNA基因组构成。(b) SARS-CoV-2 S蛋白的不同结构域。SP: 信号肽 (signal peptide); NTD: N端结构域; RBM: 受体结合基序 (receptor binding motif); RBD: 受体结合域; FP: 融合肽; HR1: 七肽重复序列1; HR2: 七肽重复序列2; TM: 跨膜结构域; CP: 细胞质结构域。

2 SARS-CoV-2与其宿主受体结合的分子机制

SARS-CoV-2入侵宿主细胞的过程可分为: 病毒与宿主细胞表面受体识别; 病毒外膜与宿主细胞膜融合; 病毒在细胞内装配与释放。针对病毒感染过程中的关键靶点开展药物筛选和疫苗研究, 是开

发中和抗体和设计小分子抑制剂的基础, 对于阻止 SARS-CoV-2传播有重大意义。

2.1 SARS-CoV-2与受体识别

血管紧张素转换酶 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) 是一种由上皮细胞表达的 1 型跨膜金属蛋白酶, 由一个胞外、跨膜和一个胞质结构域组成, 共含有 805 个氨基酸^[6]。ACE2 是体内

调节肾素血管紧张素系统的关键酶，也是第一个发现并确定的 SARS-CoV-2 功能受体。S 蛋白的 RBD 与宿主细胞表面 ACE2 受体的识别是病毒感染的第一步，也是最关键的一步。针对这一过程开发的小分子抑制剂相对较多，也是小分子抗病毒药物研究的热点。

2.2 病毒外膜与宿主细胞膜融合

病毒 S 蛋白与细胞 ACE2 受体结合后，细胞表面的跨膜丝氨酸蛋白酶 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2) 切割 S1/S2 连接处，并激活 S2 亚基。随后，病毒暴露出疏水氨基酸，并嵌入至宿主细胞膜中^[14]。延伸的 SARS-CoV-2 S 蛋白像拉链一样拉拢病毒和细胞，迫使病毒和细胞的膜融合 (图 2)^[5]。TMPRSS2 在此过程中发挥重要作用，因此 TMPRSS2 抑制剂可作为一种潜在的治疗药物^[15]。此外，S1 和 S2 亚基连接处的精氨酸残基可由宿主细胞内的弗林蛋白酶识别并剪切，这对于病毒有效进入人肺细胞至关重要^[16]。在 B.1.1.7 和 B.1.617.2 突变株中，弗林蛋白酶识别位点发生突变，使弗林蛋白酶更容易识别和剪切，提高病毒的传播能力。

2.3 病毒在细胞内装配与释放

病毒 RNA 进入细胞后，首先合成非结构蛋白，这些蛋白质能快速抑制宿主细胞 mRNA 的转录及翻译，减少细胞蛋白质的表达，导致无法合成并释放免疫系统预警信号蛋白-干扰素，从而抑制了细胞的预警系统。SARS-CoV-2 将宿主细胞长而薄的细胞内质网结构改变为双层膜囊泡的泡状结构，这可能为病毒 RNA 的复制和表达提供了一个安全环境，避免了先天免疫系统的识别^[17]。随后，病毒正链 RNA 与核糖体结合翻译成 RNA 聚合酶和其他蛋白质，并在内质网膜上形成复制与转录复合体。它们利用正链 RNA 复制出与模板等长的互补负链 RNA 并转录 4 种小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)，再以负链 RNA 为模板复制出等长的子代病毒基因组。4 种 sgRNA 翻译成 4 种结构蛋白，与病毒 RNA 组装成新的子代冠状病毒颗粒，最终通过细胞的高尔基复合体将病毒运输至细胞膜外。因此，针对此过程设计小分子抑制剂主要通过抑制 SARS-CoV-2 复制、转录所需要酶类的活性干扰病毒表达，进而达到阻止病毒增殖及释放的目的。

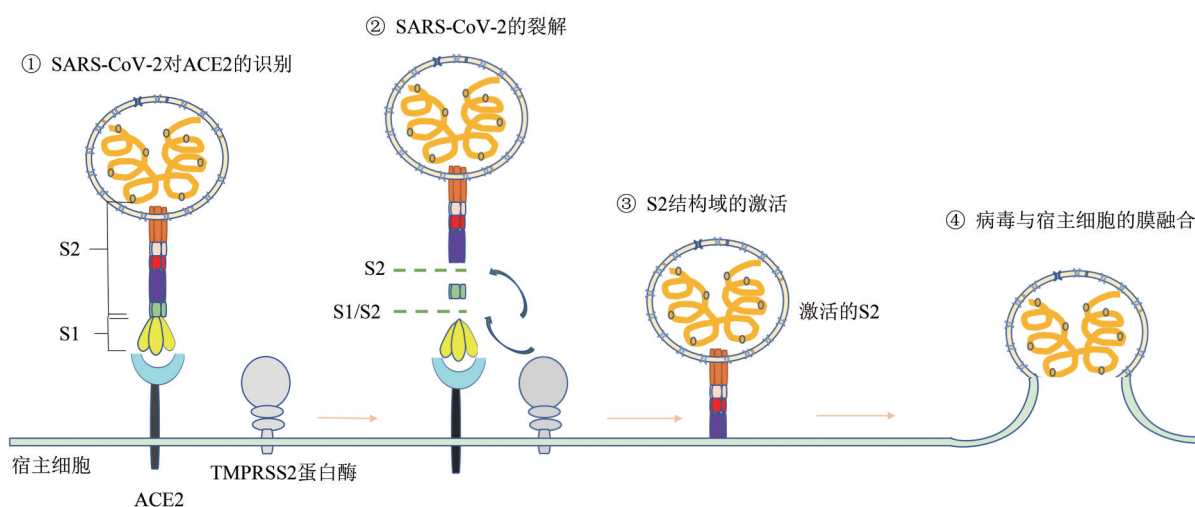


Fig. 2 The process of SARS-CoV-2 binding and membrane fusion with host cells^[5]

图2 SARS-CoV-2与宿主细胞结合及膜融合的过程^[5]

SARS-CoV-2与宿主细胞结合及膜融合过程：①SARS-CoV-2识别ACE2受体；②TMPRSS2酶切割S蛋白；③激活S2结构域；④活化的S2亚基介导病毒与细胞膜的融合。

3 中和抗体

病毒侵入人体后，体内浆细胞会产生病毒特异性抗体，其中只有部分抗体能识别病毒，并在其入

侵细胞前将其捕获，保护人体不受感染，发挥作用的抗体即中和抗体。中和抗体可以通过疫苗接种或感染主动诱导产生，也可以被动转移到人体中通过靶向病原体的结构来减轻或完全阻断病毒感染。中

和抗体具有预防与治疗的双重作用, 且特异性和安全性很好。但是人体内的中和抗体水平会随着时间的下降。研究显示, 奥密克戎 BA.4、BA.5 突变株可逃逸由 BA.1 诱导产生的中和抗体, 这表明通过群体免疫阻断 SARS-CoV-2 的传播是无法实现的^[4, 18]。SARS-CoV-2 中和抗体的作用机制主要包括: 中和抗体与其识别的抗原表位结合, 进而阻止病毒与受体的结合, 及中和抗体与病毒包膜表面抗原结合, 激活补体, 导致病毒溶解两种类型^[19]。SARS-CoV-2 中和抗体根据其识别的抗原表位大致可以分为: 与 S1 亚基 RBD 识别的中和抗体, 与 S1 亚基 NTD 识别的中和抗体, 靶向 N 蛋白的中和抗体以及作用于细胞表面受体蛋白的中和抗体。另外, 还有针对 S1 亚基的中和抗体, 其结合位点可能涉及多个蛋白质结构域, 且不排除还有未发现的结合位点, 需要研究者们进一步深入探究^[20]。

3.1 作用于 S 蛋白 RBD 的中和抗体

目前开发的针对 SARS-CoV-2 的单克隆抗体药物, 主要靶向 S 蛋白, S 蛋白相当于 SARS-CoV-2 进入细胞的钥匙, 当抗体药物与 S 蛋白的特定位点结合后, 就能阻断病毒进入人体细胞的通道。针对 RBD 的中和抗体是人体产生的最主要、种类最多、对病毒阻断活性最高的一类抗体^[21]。此类中和抗体可以与 S 蛋白的 RBD 区域结合, 阻断 RBD 与 ACE2 受体结合, 从而阻断病毒侵入人体细胞。

3.1.1 47D11 单克隆抗体

荷兰乌德勒支大学团队开发的 47D11 是首个报道的 SARS-CoV-2 单克隆抗体。47D11 能够交叉中和严重急性呼吸综合征病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 和 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD 上共同的保守序列, 而不与 ACE2 结合竞争, 从而抑制病毒感染^[22]。47D11 的中和效率不受 RBM 突变的影响, 因此有望以 47D11 抗体为核心联合用药, 对抗新型 SARS-CoV-2 变种^[23]。

3.1.2 埃特司韦单抗/巴尼韦单抗

君实生物与中国科学院微生物研究所共同开发的重组全人源单克隆中和抗体埃特司韦单抗 (Etesevimab), 通过特异性结合 SARS-CoV-2 S 蛋白 RBD, 有效阻断病毒与宿主细胞表面受体 ACE2 的结合。礼来公司的巴尼韦单抗 (Bamlanivimab) 也是以 S 蛋白为靶点的中和抗体, 埃特司韦单抗和巴尼韦单抗的双抗体联合用药疗法已获批用于治疗伴有进展为重度 COVID-19 和有住院风险的 12 岁及

以上轻中度 COVID-19 患者。该疗法显著降低 COVID-19 相关住院和死亡率, 且对一系列变体有维持作用^[24]。

3.1.3 替沙格韦单抗/西加韦单抗

已获批上市的肌肉注射药物恩适得 (Evusheld) 由替沙格韦单抗 (Tixagevimab) 和西加韦单抗 (Cilgavimab) 两种单克隆抗体组成, 可在两个不同位点攻击 SARS-CoV-2 S 蛋白, 是目前全球唯一可以用于 COVID-19 暴露前预防的中和抗体。替沙格韦单抗/西加韦单抗对 BA.2.12.1、BA.4 和 BA.5 变异株仍有中和活性, 但是对 BA.4.6、BA.4.7、BA.5.9、XBB、XBB.1.5、BQ.1 和 BQ.1.1 等新亚型变异毒株的中和活性明显降低^[25]。

3.1.4 安巴韦单抗/罗米司韦单抗

腾盛博药、清华大学和深圳市第三人民医院联合研发的安巴韦单抗/罗米司韦单抗获得国家药品监督管理局附条件批准, 用于治疗轻型和普通型且伴有进展为重型 (包括住院或死亡) 高风险因素的 COVID-19 患者^[26]。安巴韦单抗/罗米司韦两种人源单克隆抗体属于蛋白质大分子药物中 IgG1 亚型抗体药物, 靶向结合 S 蛋白 RBD 的不同部位。两种抗体在结合 SARS-CoV-2 的 RBD 表位上具有互补性, 因此发挥非竞争性协同中和 SARS-CoV-2 的能力, 有助于防止病毒进入人类细胞, 且对 B.1.617.2、AY.4.2 及 B.1.1.529 变种 BA.1、BA.2、BA.4、BA.5 展现出抑制效果^[27-28]。

3.1.5 XG005-CYLK

复旦大学科研人员从野生型毒株感染康复者血清中分离得到了一种具有高效广谱作用的 XG005 中和抗体, 其能与 SARS-CoV-2 S 蛋白上的 RBD 结合, 进而阻止病毒与人体细胞的 ACE2 受体结合^[29]。重要的是, XG005 对 SARS-CoV-2 原始毒株和 B.1.1.7、B.1.351、P.1、B.1.617.2、B.1.1.529、BA.1、BA.2、BA.3、BA.4/5、BA.5.2、BF.7 等各个变异毒株都具有超高的中和活性, 并通过工程化改造命名为 XG005-CYLK^[4, 25, 30-31]。目前研究人员已将其开发为单克隆抗体药物 ADV2301 (XG005M), 正在加速将其推向临床阶段。

3.1.6 SA55

科兴中维与昌平实验室利用高通量测序技术, 从约 13 000 种抗体库中挑选出的能高效结合多种不同冠状病毒的广谱中和抗体 SA55, 其能高效中和包括 XBB、XBB.1、XBB.1.5 在内的多种奥密克戎变异株^[4, 32-34]。2023 年 4 月 21 日, 国家药监局已批

准中和抗体 SA55 鼻喷雾剂用于预防 SARS-CoV-2 感染的临床试验申请。

3.1.7 精英抗体

南开大学研究团队利用单细胞测序技术,从接种疫苗后发生奥密克戎毒株突破感染的康复者体内分离得到了一批对 BF.7、BQ.1.1、BA.1、BA.2.12.1、BA.4/5 和 XBB 等变异株保持高亲和力和高效中和活性的精英抗体 (TH003、TH027、TH236、TH257、TH272、TH281)^[35]。研究人员通过冷冻电镜技术阐释了 6 个精英抗体的强效广谱中和机制为两种不同的结合模式,分别靶向 RBD 的外表面和 RBM 表面,具有良好的成药潜力^[36]。

3.2 作用于 S 蛋白 NTD 的中和抗体

此类中和抗体与 S 蛋白的 NTD 区域结合,比如 4A8 等,能有效中和 SARS-CoV-2^[37]。一项研究显示,人体细胞上的酪氨酸蛋白激酶受体 UFO (AXL) 与 NTD 区域特异性结合,可能是潜在的病毒感染细胞的受体,此项研究结论可以部分解释 NTD 中和抗体能够有效中和 SARS-CoV-2 的原理^[38-39]。

3.3 作用于 N 蛋白的中和抗体

中山大学附属第五医院和暨南大学合作团队利用基于临床康复者血液样本的全人源抗体筛选方法,从治愈出院的 COVID-19 恢复期患者血液中分离出与 N 蛋白具有较高结合亲和力的人源性单抗 nCoV396^[40]。研究人员利用 X 射线衍射方法揭示了 nCoV396 利用其轻链互补决定区 1 (complementary determining region 1, CDR1)、CDR3 和重链 CDR1、CDR2、CDR3,通过亲水和疏水相互作用识别 N 蛋白 NTD,抑制 N 蛋白诱导的补体过度激活,进而抑制 COVID-19 患者的肺部损伤^[40-42]。N 蛋白是冠状病毒中含量最丰富且具高度保守性的蛋白,这提示 nCoV396 也可以结合其他高致病性冠状病毒的 N 蛋白,具有潜在的广谱应用前景。

3.4 作用于细胞表面受体蛋白的中和抗体

中国科学院制备了一种靶向 ACE2 的广谱单克隆抗体 3E8,并通过冷冻电镜和突变研究揭示了 ACE2 上的 Gln24 是与 3E8 重链 CDR3 相互作用的关键氨基酸残基^[43]。研究发现,3E8 可以中和 SARS-CoV-2 及 SARS-CoV-2 突变体 D614G、B.1.1.7、B.1.351、B.1.617.1 和 P.1,而不会显著影响 ACE2 的生理活性,也不会对 ACE2 “敲入”小鼠造成严重毒性,且 3E8 在体外和 COVID-19 预防

性小鼠模型中也能阻断 SARS-CoV-2 的活体感染^[44]。

据研究报道,CD147 是人体细胞表面 I 型跨膜受体,也是 SARS-CoV-2 及其变异株的新型受体,同时也是细胞因子风暴的重要介质^[45]。空军军医大学陈志南教授团队和江苏太平洋美诺克生物药业有限公司联合研发了一种 CD147 人源化抗体-注射用美珀珠单抗 (Meplazumab),已完成 III 期临床试验,并获得临床应用批准。与其他大多数单抗以病毒 S 蛋白为靶点不同的是,美珀珠单抗以人体细胞表面的蛋白质为作用靶点,因此可以抵抗 SARS-CoV-2 变体,如 B.1.1.7、B.1.351、P.1、B.1.617.2、B.1.1.529 等^[46]。此外,美珀珠单抗还具有抑制细胞因子风暴以及通过抑制活化成纤维细胞积累而缓解由 SARS-CoV-2 引起的肺纤维化进程等疗效,能有效提高早期病毒转阴率,具有抗体用量少、医疗成本低、安全性好等优点,是目前适应症较全面的治疗药物^[47-48]。

4 小分子抑制剂

小分子抑制剂根据其作用方式可大致分为抑制病毒与宿主细胞结合、抑制病毒与宿主细胞膜融合、抑制病毒在宿主细胞内的表达以及抑制病毒糖基化合成这 4 大类。小分子抑制剂具有治疗效果好、广谱、安全性好、给药方式简单等优势,在 COVID-19 防治中发挥不可比拟的作用,也是当前研究的热点。

4.1 抑制病毒与宿主细胞结合

病毒与宿主细胞结合是 SARS-CoV-2 感染人体的第一步,阻断 S 蛋白与受体结合是小分子抑制剂的主要研发方向之一。

4.1.1 以 ACE2 为作用靶点

ACE2 是 SARS-CoV-2 感染细胞的功能性受体。抗疟药物磷酸氯喹和羟氯喹是潜在的抗病毒药物,磷酸氯喹可以抑制 ACE2 的末端磷酸化,羟氯喹可以提高病毒感染细胞过程中由于细胞内吞作用而形成的内体的 pH 值,从而抑制组织蛋白酶 L 的活性,使 SARS-CoV-2 无法感染细胞^[49]。因此,氯喹和羟氯喹能成为抗 SARS-CoV-2 感染的候选药物,目前正在国际 COVID-19 患者的临床试验中研究其疗效^[49]。ACE2 多肽类似物可以竞争性地结合病毒 S 蛋白,抑制病毒与宿主细胞结合。Han 等^[50]评估源自 ACE2 的化学合成肽的抗 SARS-CoV-2 的作用,确定了由甘氨酸连接的源自 ACE2 序列 22~44 和

351~357的P6肽具有较高的抗病毒活性^[51]。另外, 一种天然化合物佛手柑素通过抑制S蛋白介导的膜融合和抑制hACE2的表达, 干扰病毒生命周期的多个阶段, 具有广谱抗病毒活性和广阔的临床应用前景^[52]。ACE2作为一种多功能蛋白, 其分布广泛, 在COVID-19防治中受到全球关注, 因此, 以ACE2为作用靶点研发小分子抑制剂具有广泛的临床应用前景。

4.1.2 以S1-NTD为作用靶点

SARS-CoV-2的S1亚基负责病毒与受体细胞的结合。S1亚基可进一步分为两个不同的结构域: NTD和C端结构域(C-terminal domain, CTD)。CTD负责与宿主细胞蛋白的结合, 而NTD负责结合细胞表面的糖链^[53]。分子动力学模拟显示, NTD与细胞表面常见的GM1神经节苷脂分子有强烈的相互作用^[54]。这表明, SARS-CoV-2为双附着模式: 即CTD参与ACE2受体识别, NTD区域与细胞表面的神经节苷脂结合以稳定病毒黏附^[55]。由此可见, NTD在SARS-CoV-2与宿主结合过程中具有重要作用, 因此, 许多小分子抑制剂以此为作用靶点, 主要包括半乳糖凝集素3(galectin-3, Gal-3)抑制剂、唾液酸类似物和半乳糖基化糖蛋白等。

细胞因子风暴是引起2019冠状病毒疾病患者死亡的主要原因^[56-57]。Gal-3是一种动物凝集素, 具有强大的促炎作用, 能够诱导白介素-6(interleukin-6, IL-6)和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor alpha, TNF- α)的产生, 在细胞因子风暴中起着关键作用^[58]。Gal-3抑制剂通过降低体内IL-6和TNF- α 的水平, 抑制细胞因子风暴的产生, 降低患者死亡风险^[59]。另一方面, SARS-CoV-2 S1亚基的NTD具有一个与Gal-3结构和序列高度相似的口袋(pocket)样结构域^[11], 因此, Gal-3抑制剂通过竞争性地抑制NTD与GM1神经节苷脂的结合, 阻碍病毒的附着^[11]。目前, 研究报道较多的Gal-3抑制剂包括: GB1107^[55]、TD139^[60]、贝拉果胶(也称GR-MD-02)^[61]等, 其中TD139的安全性和耐受性良好, 已完成了治疗特发性肺纤维化的I期/IIa期试验^[62]。Gal-3抑制剂具有抑制细胞因子风暴以及阻碍NTD介导病毒附着的双重作用, 是一种非常有潜力的治疗药物^[57, 63]。

最新的研究发现, NTD中存在潜在的唾液酸结合位点, 此研究结果提示, 可以利用唾液酸化的糖蛋白、糖肽以及寡糖等唾液酸化糖复合物抑制

NTD与宿主细胞表面唾液酸糖链的结合, 阻碍SARS-CoV-2的黏附^[64-66]。这项研究的发现进一步强调了利用SARS-CoV-2 S蛋白NTD位点抑制病毒感染的重要性。

本课题科研团队深入分析了SARS-CoV-2的S1亚基和ACE2的糖型, 发现半乳糖化的糖基在S1亚基和ACE2中均占主导地位, 并且SARS-CoV-2不同突变株的S1亚基均对半乳糖基化糖链显示出较高的结合潜能。本课题组从牛奶中分离出的一类富含半乳糖基化修饰的糖蛋白显著抑制SARS-CoV-2 S1亚基与ACE2的结合, 并阻断SARS-CoV-2假病毒进入宿主细胞^[67]。这项研究为预防SARS-CoV-2感染提供一种潜在的蛋白质药物。

4.1.3 扁豆凝集素与S蛋白结合阻碍病毒进入宿主细胞

“糖-蛋白质”相互作用在SARS-CoV-2感染过程中发挥重要作用。研究发现, 识别寡甘露糖型N-聚糖以及N-聚糖末端的N-乙酰葡萄糖胺的扁豆凝集素(lens culinaris agglutinin, LCA)通过结合SARS-CoV-2 S蛋白N234, N165和N343糖基化位点上的糖链, 抑制糖链介导的病毒与宿主细胞结合, 阻断SARS-CoV-2感染^[68]。扁豆凝集素也对SARS-CoV-2变体有强烈的抑制作用, 这将为抗SARS-CoV-2药物的研发提供有价值的见解。

4.1.4 肝素与S蛋白结合抑制病毒感染

宿主细胞表面的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)作为S蛋白的协同受体促进病毒感染。肝素是一种天然存在的糖胺聚糖, 有较强的抗凝活性^[69], 结构与HSPG相似。S蛋白中带正电荷的氨基酸残基簇-肝素结合结构域(heparin-binding domains, HBDs)和肝素多糖链上带负电荷的硫酸盐基团介导S蛋白与肝素的结合^[70-72]。肝素可以通过3种作用方式抑制SARS-CoV-2感染: a. 竞争性的抑制HSPG与S蛋白HBD结构域的结合^[73]; b. 通过与S1/S2位点结合, 抑制弗林蛋白酶对S蛋白的切割^[74]; c. 抑制S蛋白构象由“闭合”向“开放”的转变^[75]。此结论提示, 可以合理利用肝素及肝素衍生物进行抗SARS-CoV-2小分子抑制剂的研发。

4.1.5 替考拉宁衍生物与S蛋白结合抑制病毒感染

替考拉宁是一种糖肽类抗生素, 广泛用于治疗革兰氏阳性菌引起的感染^[76]。最新的研究表明, 替考拉宁可抑制组织蛋白酶L对S蛋白的切割。替考拉宁衍生物通过与S蛋白的RBD结合, 中断

RBD与ACE2受体的相互作用,并且替考拉宁衍生物还可抑制B.1.617.2和B.1.1.529变异毒株S蛋白与受体的结合^[77]。替考拉宁衍生物不同的抗病毒机制可能使替考拉宁衍生物比亲代药物替考拉宁具有更强的抗病毒效果^[77-78]。此结论提示,替考拉宁及其衍生物具有抗菌与抗病毒的双重作用,在COVID-19防治中有潜在的应用价值。

4.1.6 奥密克戎融合抑制剂——白桦脂酸衍生物

白桦脂酸(betulinic acid, BA)是一种天然存在的五环三萜类化合物,对人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、流感病毒、SARS-CoV等具有良好的抗病毒作用^[79]。Liu等^[80]开发了一种先导化合物BA-4,研究显示,BA-4通过直接与S蛋白结合,以阻断SARS-CoV-2进入宿主细胞。值得注意的是,BA-4对SARS-CoV-2及其突变体(如B.1.617.2和B.1.1.529等)均有抑制活性。因此,BA-4代表了一种新型、有效的SARS-CoV-2融合抑制剂,可进一步开发成为治疗COVID-19的潜在候选药物。

4.1.7 对C型凝集素受体DC/L-SIGN的抑制

C型凝集素受体(C-type lectin receptors, CLR)是病原体识别受体(pathogen recognition receptors, PRR),能够识别通过内吞或吞噬获取的病原体,参与免疫反应的形成^[81-83]。研究发现,CLR特别是树突状细胞特异性细胞间黏附分子3结合非整合素分子(dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, DC-SIGN)和肝脏/淋巴结特异性细胞间黏附分子3结合非整合素分子(liver/lymph node-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin, L-SIGN)作为SARS-CoV-2 S蛋白的配体,参与病毒的侵入和感染^[84-88]。在COVID-19患者体内,促炎细胞因子(如IL-4、IL-6、IL-10和IL-13)诱导DC/L-SIGN的表达,有利于DC/L-SIGN与SARS-CoV-2 S蛋白的结合,进而加重病毒感染^[89]。Polyman26(PM26)是一种多价拟甘露糖苷,通过与DC-SIGN的糖识别域结合,竞争性抑制S蛋白与DC-SIGN的结合^[90-91]。因此,DC/L-SIGN和其他CLRs拮抗剂可应用于预防SARS-CoV-2感染或作为联合治疗药物。

4.2 抑制病毒与宿主细胞膜融合

病毒与宿主细胞膜融合是病毒感染宿主细胞的第二步,TMPRSS2、HR1和HR2在膜融合过程中发挥着不可替代的作用,一些小分子抑制剂以此为

作用靶点抑制病毒与宿主细胞膜融合,阻止病毒感染人体。

4.2.1 对TMPRSS2的抑制

TMPRSS2启动S蛋白是病毒入侵宿主细胞的重要条件。用于胰腺炎临床治疗的TMPRSS2抑制剂甲磺酸卡莫司他(Camostat mesylate)可以阻断SARS-CoV-2对肺细胞的感染^[14, 92-96]。另一种TMPRSS2抑制剂纳法莫司他(Nafamostat)也是广谱性蛋白酶抑制剂,可以减少或预防COVID-19相关的血栓并发症,抑制参与炎症级联和补体系统的蛋白酶。在SARS-CoV-2感染之前或感染早期阶段,通过纳法莫司他滴鼻治疗可以有效减少呼吸道上皮的感染,降低肺组织病毒载量和感染严重程度^[97]。据研究报道,TMPRSS2肽模拟物(N-0385)可以在较低的作用浓度($IC_{50}=1.9\text{ nmol/L}$)下有效抑制TMPRSS2蛋白水解活性,并阻止SARS-CoV-2及其突变株(包括德尔塔和奥密克戎)的感染,具有很高的抗病毒潜力^[98]。另外,由中国开拓医药研制的普克鲁胺(Proxalutamide)不仅可以通过下调ACE2和TMPRSS2的表达水平,阻止SARS-CoV-2入侵宿主细胞,还可以调节宿主免疫和炎症相关信号通路,阻止细胞因子风暴发生,目前已获批上市^[99]。这些研究拓展了对SARS-CoV-2的传播性和发病机制的认识,突出了以TMPRSS2为靶点的抑制药物对COVID-19预防或治疗的重要性。

4.2.2 对HR1和HR2结构域的抑制

SARS-CoV-2的S2亚基中有两个保守的重复氨基酸序列:HR1和HR2,两者相互作用形成六螺旋束参与细胞膜融合过程。以SARS-CoV-2 S蛋白C端七肽重复序列(HRC)结构域的1168~1203区域为模板设计的一种脂肽可以有效阻碍SARS-CoV-2 S蛋白介导的膜融合^[64-65]。另一种源自HRC结构域1169~1203区域的脂化肽(IPB02)可抑制SARS-CoV-2 S蛋白介导的膜融合和SARS-CoV-2假病毒的感染^[66]。这类脂肽制剂通过滴鼻的方式即可产生保护反应,并持续至少24 h,非常适用于卫生保健工作者、急救人员、免疫功能低下或有其他潜在疾病的高危人群的预防^[67-68]。

EK1为可以靶向HR1高度保守序列进而抑制冠状病毒介导膜融合的多肽类药物^[100]。研究人员利用聚乙二醇将胆固醇或棕榈酸结合到EK1的C端,不断优化后得到EK1C4,并发现EK1C4是对抗SARS-CoV-2 S蛋白介导膜融合和假病毒感染最

有效的融合抑制剂, IC_{50} 分别为 1.3 nmol/L 和 15.8 nmol/L, 作用效果相比原始 EK1 多肽有很大提高, 且靶向位点保守, 病毒不易产生耐药性, 具有广谱抗冠状病毒活性, 可能通过滴鼻的方式预防 SARS-CoV-2 感染^[101-102]。呋喃亚甲基罗丹宁是抗 HIV-1 的化合物, Pu 等^[103] 设计了一系列新的呋喃亚甲基罗丹宁类似物, 它们靶向 SARS-CoV-2 病毒外膜, 阻断包膜病毒六螺旋束的形成, 抑制细胞病毒感染, 并且灭活游离病毒粒子, 具有广谱抗病毒效果。另外, 据 Cao 等^[104] 报道, 从用于治疗肝炎的植物五味子中提取的当归酰戈米辛 O 和五味子乙素也对膜融合具有较强的抑制作用, 且对 SARS-CoV-2 的抗病毒活性比瑞德西韦 (Remdesivir) 更强。丹酚酸 C 和雌二醇也可以通过阻断六螺旋束的形成来阻断 S 蛋白介导的膜融合, 是潜在的抗 SARS-CoV-2 药物^[105-106]。由于 HR1 和 HR2 结构域高度保守, 因此靶向 HR1 和 HR2 的小分子抑制剂对 SARS-CoV-2 变种也具有潜在的抑制效果。

4.3 抑制病毒在宿主细胞内的表达

病毒进入宿主细胞后, 利用宿主细胞的表达系

统合成病毒的核酸和蛋白质, 因此抑制病毒进行复制和转录的关键蛋白酶可以阻碍病毒在宿主细胞内的表达, 进而达到抗病毒作用。

4.3.1 对Nsp3的抑制

Nsp3 是 SARS-CoV-2 编码的 16 种非结构蛋白中最大的一种, 也是病毒复制和转录复合物的关键组成部分, 在病毒生命周期中起着重要作用^[107]。Nsp3 的另一个重要作用是其作为蛋白酶的功能。Nsp3 中的木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro) 在 Nsp1-Nsp2、Nsp2-Nsp3 和 Nsp3-Nsp4 之间进行切割, 从病毒多肽中释放 Nsp1、Nsp2 和 Nsp3^[108-109]。除此之外, PLpro 还具有去泛素化活性, 切割 K48 连接的多泛素和泛素样修饰物 ISG15^[110]。研究者利用 MALDI-TOF DUB 评估 FDA 批准药物的抑制作用, 确认了 5 种化合物在体外抑制 PLpro 和 Nsp3: 硫鸟嘌呤、去甲二氢愈创木酸 (nordihydroguaiaretic acid, NDA)、双硫仑、金诺芬和替格鲁西布 (确认率 = 16.6%, 表 1)^[111-112]。

Table 1 Inhibition of Nsp3 by five FDA-approved drugs
表1 五种FDA批准药物对Nsp3的抑制

药物名称	IC_{50} ¹⁾	功效	参考文献
硫鸟嘌呤	4.54 μ mol/L和8.67 μ mol/L	抑制SARS-CoV和SARS-CoV-2复制	[107]
NDA	1.06 μ mol/L和1.62 μ mol/L	可抑制许多细胞靶点, 在传统医学中用于治疗各种疾病; 抑制SARS-CoV-2复制	[113]
双硫仑 (安塔布司)	0.69 μ mol/L和0.66 μ mol/L	已获得美国食品和药物管理局批准用于治疗酒精中毒; 抑制SARS-CoV-2复制	[114-115]
金诺芬	1 μ mol/L以内	用于治疗类风湿性关节炎; 抑制SARS-CoV-2复制	[116]
替格鲁西布	0.21 μ mol/L和1.48 μ mol/L	糖原合成酶激酶3抑制剂; 抑制SARS-CoV-2主蛋白酶; 抑制SARS-CoV-2复制	[117]

¹⁾ 在基于MALDI TOF的分析中, 每种药物分别抑制PLpro和Nsp3的 IC_{50} 。

虽然这些药物在低浓度下抑制 PLpro 和 Nsp3, 但与人体其他去泛素化酶交叉反应。因此, 研究者设计竞争性纳米体, 在底物结合位点与 PLpro 结合, 从而抑制该酶, 纳米体还可以用作传感器, 监测 Nsp3 在病毒感染不同阶段的亚细胞定位^[118]。如果这些纳米体具有显著的抗病毒作用, 它们可以作为基于蛋白质的抑制剂来预防 SARS-CoV-2 和其他相关病毒。

4.3.2 SARS-CoV-2主蛋白酶抑制剂

SARS-CoV-2 主蛋白酶 (main protease, M^{pro} , 也称 3CL^{pro}) 是在病毒自身编码中剪切和加工 RNA 的主要蛋白酶, 是抗 SARS-CoV-2 小分子抑制剂开发的重要靶点^[119-120]。一种广谱抑制剂拟肽 α 酮酰胺 (FB2001) 不受 S 蛋白突变的影响, 通过抑制

3CL^{pro} 的活性, 阻碍其对病毒多聚蛋白前体的切割, 阻断病毒复制, 抑制子代病毒生成^[121]。GC373 和 GC376 以半硫代缩醛的形式共价连接到催化位点的氨基酸残基 Cys145 上, 以纳摩尔浓度抑制 3CL^{pro} 且没有毒性, 进而阻断 SARS-CoV-2 在细胞中的复制, 是治疗 COVID-19 的潜在候选药物^[122]。另一种以 SARS-CoV-2 M^{pro} 为抑制靶点的抗病毒候选药物 SY110, 不仅对奥密克戎主要亚系 BA. 5, 而且对 SARS-CoV 和中东呼吸综合征冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 等其他高致病性人类冠状病毒也表现出强大的体外抗病毒活性^[123]。此外, 目前已获批用于临床治疗的奈玛特韦片/利托那韦片 (Paxlovid) 组合包装抗病毒药物也是以

SARS-CoV-2的3CL^{pro}为作用靶点。3CL^{pro}在人体内没有同源蛋白,因此其已成为具有潜力和代表性的抗SARS-CoV-2研究靶点。

4.3.3 SARS-CoV-2 RNA依赖的RNA聚合酶抑制剂

RNA依赖的RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)是冠状病毒生命周期中的关键酶,参与病毒3万个核苷酸的RNA基因组的复制和转录,是冠状病毒最具潜力的药物靶标之一^[124]。目前已获批用于治疗轻中度COVID-19患者的口服抗病毒小分子抑制剂:阿兹夫定(Azvudine)、瑞德西韦、法匹拉韦和莫诺拉韦/莫努匹韦,都是靶向RdRp的核苷类似物候选药物,它们作为底物与病毒RdRp结合,在新合成的RNA链中引入错误的核苷酸,中断病毒基因组的合成,从而达到抑制病毒的作用。其中,阿兹夫定是第一个国产的新冠口服药,莫诺拉韦是全球第一个批准上市的新冠口服药。2023年1月29日国家药监局附条件批准上市的氢溴酸氖瑞米德韦片(也称VV116),能够以三磷酸形式非共价结合到SARS-CoV-2 RdRp的活性中心,直接抑制RdRp的活性,阻断子代病毒的复制,从而实现抗病毒的作用。重要的是, VV116对包括奥密克戎在内的SARS-CoV-2原始株和突变株表现出显著的抗病毒作用,且无遗传毒性^[125]。因此,了解以RdRp为作用靶点的小分子抑制剂的抗病毒机制,对抗SARS-CoV-2药物的研发具有积极意义。

4.3.4 阻断p38 MAPK的信号传导抑制SARS-CoV-2复制

p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)的信号传递是SARS-CoV-2复制和炎症反应的关键途径^[126]。p38增殖蛋白激酶抑制剂(pamapimod, PAM)是p38 MAPK的选择性抑制剂,先前开发用于治疗类风湿性关节炎。吡格列酮(pioglitazone, Pio)属于噻唑烷二酮药物家族,用于降低2型糖尿病患者的血糖和糖化血红蛋白^[127]。Pio还抑制促炎细胞因子如IL-1b、IL-6和IL-8的分泌,并可增加脂多糖刺激的星形胶质细胞中抗炎细胞因子(例如IL-4和IL-10)的表达^[128]。PAM和Pio均具有抗SARS-CoV-2活性,且这两种药物的组合在抑制最初的SARS-CoV-2毒株以及B.1.617.2、奥密克戎亚型(BA.2、BA.5等)在内的新型变异株中表现出协同作用,还具有抗炎和抗纤维化活性,可减少新冠肺炎患者的严重程度和恢复时间^[129]。因此, PAM/

Pio是一种潜在的有效治疗方法,目前正在进行对住院COVID-19患者PAM和Pio联合治疗的临床试验。

4.4 抑制病毒蛋白糖基化

糖基化修饰是指在糖基转移酶的催化作用下,将糖链与蛋白质特定的氨基酸残基共价连接而形成的一种翻译后修饰。糖基化修饰根据其修饰的氨基酸残基主要分为N-糖基化和O-糖基化。糖基化不仅对蛋白质的折叠以及构象的稳定具有重要作用,而且广泛参与了肿瘤的发生发展以及病毒对宿主细胞的识别等众多生物学过程^[130-131]。研究发现, S蛋白具有22个N-糖基化位点和17个O-糖基化位点^[132-133]。S蛋白的糖基化有助于增加蛋白质的稳定性,掩盖蛋白的免疫原性表位,从而逃避宿主的免疫反应^[134]。因此,抑制病毒蛋白糖基化也是小分子抑制剂的作用方式之一。

4.4.1 病毒糖基化抑制剂

S蛋白的N-和O-聚糖在调节病毒进入细胞方面发挥重要作用,广泛影响宿主识别、渗透、结合和发病机制。利用CRISPR-Cas9和强效甘露糖苷酶I生物碱抑制剂Kifunensine抑制SARS-CoV-2假病毒的N-糖基化合成,显著减少了病毒进入宿主细胞^[135]。亚氨基糖是 α 葡萄糖苷酶I和II(N-聚糖生物合成中的两种关键酶)的抑制剂,通过减少宿主细胞N-糖基化途径以抑制SARS-CoV-2复制,据报道,西戈斯韦(Celgosivir)、栗树精胺具有这种活性^[15, 136]。另外,壳聚糖及其衍生的壳聚糖分子与S2亚基的相互作用干扰S2亚基介导的膜融合过程,进而减少病毒RNA进入宿主细胞^[137]。由于它们具有无害性、无毒性、非免疫原性的特点,因此壳聚糖和相关的壳聚糖分子作为药物,广泛用于不同的治疗应用中。

4.4.2 氨基糖苷类抗生素

氨基糖苷类抗生素也是翻译抑制剂和防御素释放剂,从 θ 防御素(称为逆转录环素)中产生具有抗HIV活性的功能肽作为免疫增强剂介导抗病毒活性,也可用作抗SARS-CoV-2药物^[72]。研究表明,几种氨基糖苷类抗生素(如卡那霉素和阿米卡星)以及多糖(如阿卡波糖)与S蛋白RBD发生相互作用,可作为抗病毒感染的候选药物^[138]。分子力学辅助的基于结构的虚拟筛选实验表明,利维霉素(氨基糖苷类抗生素之一)可以稳定ACE2的“闭合”构象,是潜在的ACE2抑制剂^[139]。伊维菌素(一种抗寄生虫大环内酯类药物)也显示出广谱

抗病毒活性, 体外试验也证明了其对 SARS-CoV-2 的抑制作用^[140]。氨基糖苷类抗生素作为临床上常用的抗生素, 但其对机体不可逆的生物毒性和耐药性限制了它的应用和推广, 寻找抗耐药及低毒性的氨基糖苷类抗生素用于抗 SARS-CoV-2 感染破在眉睫。

4.4.3 类黄酮苷

类黄酮苷是具有糖苷键的多酚类物质, 橙皮苷、芦丁和槲皮苷能够与 SARS-CoV-2 主蛋白酶、RNA 依赖性 RNA 聚合酶和 S 糖蛋白 RBD 等蛋白质发生相互作用^[141-142]。在 SARS-CoV-2 感染中, 可能会产生与全身并发症相关的重要内皮功能障碍^[143]。橙皮苷刺激内皮细胞产生一氧化氮, 同时改善内皮功能, 从而减少患者的炎症^[144]。芦丁和相关黄酮苷是血管保护剂, 有助于控制内皮功能障碍, 并具有潜在的抗病毒活性。以上表明, FDA 批准的类黄酮苷可能是治疗 COVID-19 多系统并发症患者的有效药物, 可被大量人群用于 COVID-19 暴露前后预防, 具有广阔的应用前景。

5 总结和展望

COVID-19 的大爆发对全球健康构成了严重的威胁, 迫切需要有效的预防和治疗药物。疫苗和中和抗体依然是重要的防治 SARS-CoV-2 的手段, 且特异性和安全性更好, 其抗病毒作用不容忽视。疫苗虽能够帮助人体产生中和抗体, 但疫苗的研发明显具有滞后性, 中和抗体的持续时间因个人体质和健康状况的不同有长有短, 且大多数中和抗体以 S 蛋白的受体结合域为中和位点, 随着病毒不断突变, 一些抗体对新型病毒变体的中和效力显著下降, 如新型变异株 B.1.1.529 变种能够逃逸通过疫

苗或前期感染所获得的免疫保护能力, 从而导致更强的传播能力以及更高的感染率和重复感染可能^[4]。然而小分子抑制剂具有广谱抗病毒活性, 作用方式多样, 给药方式简单, 成本相对于中和抗体等大分子药较低, 可以发挥预防初始感染、防止传播和降低 COVID-19 患者死亡率的重要作用 (表 2)。值得注意的是, VV116、PAM/Pio、BA-4、替考拉宁衍生物、白桦脂酸等小分子抑制剂对最初的 SARS-CoV-2 毒株和奥密克戎亚型在内的新型变异株均有抑制作用。因此, 小分子抑制剂目前已成为抗击 COVID-19 的研究热点。

抑制病毒与宿主细胞结合能在病毒感染的初级阶段发挥抑制作用。以 ACE2 受体和 S1 亚基的 NTD 为作用靶标, 抑制病毒与宿主细胞结合是小分子抑制剂主要的研发方向。磷酸氯喹抑制 ACE2 末端磷酸化, 或在体内代谢为氯喹的羟氯喹, 都是经过临床证明的候选药物^[49]。病毒与宿主细胞膜融合是病毒感染人体的重要环节。以 TMPRSS2 为作用靶点阻止病毒进入宿主细胞的甲磺酸卡莫司他目前处于 III 期临床试验阶段, 普克鲁胺已获批上市且 N-0385 拟肽也是很有希望的候选药物^[97-99]。小分子抑制剂针对病毒在宿主细胞内表达的作用靶点有 3CL^{pro}、PL^{pro}、RdRp 等, 其中奈玛特韦片/利托那韦片、莫诺拉韦、阿兹夫定、瑞德西韦、法匹拉韦和 VV116 等均已获批上市, 而 SY110 和 PAM/Pio 也是很有价值的候选药物^[123, 129]。植物化学物如黄酮类化合物具有安全性、易得性和较少的药理学副作用等优势, 可被大量人群用于 COVID-19 暴露前后预防^[141]。综上所述, 开发新的 COVID-19 小分子抑制剂以及合理利用现有的小分子抑制剂将为疫情防控提供巨大帮助。

Table 2 Small molecule inhibitors of SARS-CoV-2 infection
表2 抑制SARS-CoV-2感染的小分子抑制剂

作用方式	作用靶点	抑制剂名称	抑制原理	参考文献
抑制病毒与宿主细胞结合	ACE2	氯喹和羟氯喹	抑制ACE2末端磷酸化和提高内体pH值	[49]
		P6肽	竞争性结合病毒S蛋白	[50-51]
		佛手柑素	抑制hACE2的表达	[52]
	S1-NTD	Gal-3抑制剂 (GB1107、TD139、GR-MD-02等)	抑制细胞因子风暴以及阻碍NTD介导病毒附着的双重机制	[57, 63]
		唾液酸化糖复合物	抑制NTD与宿主细胞表面唾液酸糖链结合	[64, 66]
		半乳糖基化糖蛋白	竞争性抑制S1亚基与ACE2结合	[67]
		S蛋白表面特异性糖链 扁豆凝集素	抑制糖链介导的病毒与宿主细胞结合	[68]

续表2

作用方式	作用靶点	抑制剂名称	抑制原理	参考文献
抑制病毒与宿主细胞膜融合	HSPG	肝素	竞争性抑制HSPG与S蛋白HBD结构域的结合; 通过与S1/S2位点结合, 抑制弗林蛋白酶对S蛋白的切割; 抑制S蛋白构象由“闭合”向“开放”的转变	[69-75]
	S1/S2	替考拉宁	抑制组织蛋白酶L对S蛋白切割	[76-77]
	S1-RBD	替考拉宁衍生物	与S蛋白的RBD结合, 中断RBD与ACE2受体的相互作用	[77]
	S蛋白	BA	直接与S蛋白结合, 阻断SARS-CoV-2进入宿主细胞	[79-80]
	CLR	拟糖配体: Polyman26	抑制DC-SIGN与S蛋白的结合	[90-91]
	TMPRSS2	甲磺酸卡莫司他、纳法莫司他、N-0385、普克鲁胺	通过抑制TMPRSS2的活性阻止SARS-CoV-2进入宿主细胞	[92-99]
抑制病毒在宿主细胞内的表达	HR1和HR2	脂化肽 (IPB02)、EK1C4、 咪喃亚甲基罗丹宁类似物、 当归酰戈米辛O和五味子乙 素、丹酚酸C和雌二醇	通过阻断六螺旋束的形成进而抑制 SARS-CoV-2 S蛋白介导的膜融合	[66, 100-106]
	Nsp3	纳米体NbSL18	以纳摩尔亲和力和在底物结合位点与PLpro结合, 从而抑制该酶	[118]
	3CL ^{pro}	拟肽 α -酮酰胺 (FB2001)、 GC373和GC376、SY110、奈 玛特韦片/利托那韦片	通过抑制3CL ^{pro} 的活性, 阻碍其对病毒 多聚蛋白前体的切割, 阻断病毒复制, 抑制子代病毒生成	[121-123]
	RdRp	阿兹夫定、瑞德西韦、法匹 拉韦和莫诺拉韦/莫努匹韦、 VV116	作为底物与病毒RdRp结合, 在新合成 的RNA链中引入错误的核苷酸, 中断 病毒基因组的合成	[124-125]
抑制病毒蛋白糖基化	p38 MAPK	PAM/Pio	阻断p38 MAPK的信号传导、抑制 SARS-CoV-2复制和炎症反应	[126-129]
	N-糖基化抑制剂	CRISPR-Cas9、kifunensine、 亚氨基糖	抑制SARS-CoV-2 N-糖基化合成, 抑制 SARS-CoV-2复制	[135-136]
	氨基糖苷类抗生素	卡那霉素等	与S糖蛋白RBD发生相互作用	[138]
		利维多霉素	潜在的ACE2抑制剂	[139]
		伊维菌素	对SARS-CoV-2抑制	[140]
	类黄酮苷	橙皮苷、芦丁、槲皮苷	与SARS-CoV-2主蛋白酶、RNA依赖性 RNA聚合酶和S糖蛋白RBD等蛋白发生 相互作用, 改善内皮功能, 减少患者的 炎症	[141-143]

参 考 文 献

- [1] Zhou P, Yang X L, Wang X G, *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, **579**(7798): 270-273
- [2] Wu F, Zhao S, Yu B, *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, 2020, **579**(7798): 265-269
- [3] Wu S, Tian C, Liu P, *et al.* Effects of SARS-CoV-2 mutations on protein structures and intraviral protein-protein interactions. *J Med Virol*, 2021, **93**(4): 2132-2140
- [4] Cao Y, Yisimayi A, Jian F, *et al.* BA.2.12.1, BA.4 and BA.5 escape antibodies elicited by Omicron infection. *Nature*, 2022, **608**(7923): 593-602
- [5] Gupta D, Sharma P, Singh M, *et al.* Structural and functional insights into the spike protein mutations of emerging SARS-CoV-2 variants. *Cell Mol Life Sci*, 2021, **78**(24): 7967-7989
- [6] Shajahan A, Pepi L E, Rouhani D S, *et al.* Glycosylation of SARS-CoV-2: structural and functional insights. *Anal Bioanal Chem*, 2021, **413**(29): 7179-7193
- [7] Boyton R J, Altmann D M. Risk of SARS-CoV-2 reinfection after

- natural infection. *Lancet*, 2021, **397**(10280): 1161-1163
- [8] Tripathi M K, Nath A, Singh T P, *et al.* Evolving scenario of big data and Artificial Intelligence (AI) in drug discovery. *Mol Divers*, 2021, **25**(3): 1439-1460
- [9] Bosch B J, Martina B E, Van Der Zee R, *et al.* Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(22): 8455-8460
- [10] Tripathi M K, Singh P, Sharma S, *et al.* Identification of bioactive molecule from *Withania somnifera* (Ashwagandha) as SARS-CoV-2 main protease inhibitor. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, **39**(15): 5668-5681
- [11] Li F. Structure, function, and evolution of coronavirus spike proteins. *Annu Rev Virol*, 2016, **3**(1): 237-261
- [12] Salvatori G, Luberto L, Maffei M, *et al.* SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN: an optimal immunological target for vaccines. *J Transl Med*, 2020, **18**(1): 222
- [13] Zhu G, Zhu C, Zhu Y, *et al.* Minireview of progress in the structural study of SARS-CoV-2 proteins. *Curr Res Microb Sci*, 2020, **1**: 53-61
- [14] 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. *Cell*, 2020, **181**(2): 271-280 e278
- [15] Lardone R D, Garay Y C, Parodi P, *et al.* How glycobiology can help us treat and beat the COVID-19 pandemic. *J Biol Chem*, 2021, **296**: 100375
- [16] Benton D J, Wrobel A G, Xu P, *et al.* Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion. *Nature*, 2020, **588**(7837): 327-330
- [17] Harrison A G, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and pathogenesis. *Trends Immunol*, 2020, **41**(12): 1100-1115
- [18] Tuekprakhon A, Nutalai R, Djokaite-Guraliuc A, *et al.* Antibody escape of SARS-CoV-2 Omicron BA.4 and BA.5 from vaccine and BA.1 serum. *Cell*, 2022, **185**(14): 2422-2433.e2413
- [19] Deshpande A, Harris B D, Martinez-Sobrido L, *et al.* Epitope classification and RBD binding properties of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 variants of concern. *Front Immunol*, 2021, **12**: 691715
- [20] Yang M, Li J, Huang Z, *et al.* Structural basis of a human neutralizing antibody specific to the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain. *Microbiol Spectr*, 2021, **9**(2): e0135221
- [21] Yi C, Sun X, Lin Y, *et al.* Comprehensive mapping of binding hot spots of SARS-CoV-2 RBD-specific neutralizing antibodies for tracking immune escape variants. *Genome Med*, 2021, **13**(1): 164
- [22] Wang C, Li W, Drabek D, *et al.* A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2251
- [23] Fedry J, Hurdiss D L, Wang C, *et al.* Structural insights into the cross-neutralization of SARS-CoV and SARS-CoV-2 by the human monoclonal antibody 47D11. *Sci Adv*, 2021, **7**(23): eabf5632
- [24] Li D, Sempowski G D, Saunders K O, *et al.* SARS-CoV-2 neutralizing antibodies for COVID-19 prevention and treatment. *Annu Rev Med*, 2022, **73**: 1-16
- [25] Cao Y, Wang J, Jian F, *et al.* Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 2022, **602**(7898): 657-663
- [26] Hoy S M. Amubarvimab/romlusevimab: first approval. *Drugs*, 2022, **82**(12): 1327-1331
- [27] Lusvarghi S, Pollett S D, Neerukonda S N, *et al.* SARS-CoV-2 BA.1 variant is neutralized by vaccine booster-elicited serum but evades most convalescent serum and therapeutic antibodies. *Sci Transl Med*, 2022, **14**(645): eabn8543
- [28] Liu M, Li W, Lu H. Listing of the neutralizing antibodies amubarvimab and romlusevimab in China: hopes and impediments. *Drug Discov Ther*, 2022, **16**(4): 196-197
- [29] Wu J, Chen Z, Gao Y, *et al.* Fortuitous somatic mutations during antibody evolution endow broad neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variants. *Cell Rep*, 2023, **42**(5): 112503
- [30] Iketani S, Liu L, Guo Y, *et al.* Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages. *Nature*, 2022, **604**(7906): 553-556
- [31] Liu L, Iketani S, Guo Y, *et al.* Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*, 2022, **602**(7898): 676-681
- [32] Cao Y, Jian F, Wang J, *et al.* Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution. *Nature*, 2023, **614**(7948): 521-529
- [33] Cao Y, Song W, Wang L, *et al.* Characterization of the enhanced infectivity and antibody evasion of Omicron BA.2.75. *Cell Host Microbe*, 2022, **30**(11): 1527-1539.e1525
- [34] Cao Y, Jian F, Zhang Z, *et al.* Rational identification of potent and broad sarbecovirus-neutralizing antibody cocktails from SARS convalescents. *Cell Rep*, 2022, **41**(12): 111845
- [35] Guo Y, Zhang G, Yang Q, *et al.* Discovery and characterization of potent pan-variant SARS-CoV-2 neutralizing antibodies from individuals with Omicron breakthrough infection. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 3537
- [36] Huang M, Wu L, Zheng A, *et al.* Atlas of currently available human neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 and escape by Omicron sub-variants BA.1/BA.1.1/BA.2/BA.3. *Immunity*, 2022, **55**(8): 1501-1514.e1503
- [37] Chi X, Yan R, Zhang J, *et al.* A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the spike protein of SARS-CoV-2. *Science*, 2020, **369**(6504): 650-655
- [38] Wang S, Qiu Z, Hou Y, *et al.* AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res*, 2021, **31**(2): 126-140
- [39] Galindo-Hernández O, Vique-Sánchez J L. AXL inhibitors selected by molecular docking: option for reducing SARS-CoV-2 entry into cells. *Acta Pharm*, 2022, **72**(3): 329-343
- [40] Kang S, Yang M, He S, *et al.* A SARS-CoV-2 antibody curbs viral nucleocapsid protein-induced complement hyperactivation. *Nat*

- Commun, 2021, **12**(1): 2697
- [41] Gao T, Hu M, Zhang X, *et al.* Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates lung injury by MASP-2-mediated complement over-activation. medRxiv, 2020. doi: 10.1101/2020.03.29.20041962
- [42] Gao T, Zhu L, Liu H, *et al.* Highly pathogenic coronavirus N protein aggravates inflammation by MASP-2-mediated lectin complement pathway overactivation. Signal Transduct Target Ther, 2022, **7**(1): 318
- [43] Chen Y, Zhang Y N, Yan R, *et al.* ACE2-targeting monoclonal antibody as potent and broad-spectrum coronavirus blocker. Signal Transduct Target Ther, 2021, **6**(1): 315
- [44] Zhang Y N, Li X D, Zhang Z R, *et al.* A mouse model for SARS-CoV-2 infection by exogenous delivery of hACE2 using alphavirus replicon particles. Cell Res, 2020, **30**(11): 1046-1048
- [45] Wang K, Chen W, Zhang Z, *et al.* CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. Signal Transduct Target Ther, 2020, **5**(1): 283
- [46] Geng J, Chen L, Yuan Y, *et al.* CD147 antibody specifically and effectively inhibits infection and cytokine storm of SARS-CoV-2 and its variants delta, alpha, beta, and gamma. Signal Transduct Target Ther, 2021, **6**(1): 347
- [47] Bian H, Zheng Z H, Wei D, *et al.* Safety and efficacy of meplazumab in healthy volunteers and COVID-19 patients: a randomized phase 1 and an exploratory phase 2 trial. Signal Transduct Target Ther, 2021, **6**(1): 194
- [48] Wu J, Chen L, Qin C, *et al.* CD147 contributes to SARS-CoV-2-induced pulmonary fibrosis. Signal Transduct Target Ther, 2022, **7**(1): 382
- [49] Mckee D L, Sternberg A, Stange U, *et al.* Candidate drugs against SARS-CoV-2 and COVID-19. Pharmacol Res, 2020, **157**: 104859
- [50] Han D P, Penn-Nicholson A, Cho M W. Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor. Virology, 2006, **350**(1): 15-25
- [51] Jiang Y P, Zhao X X, Lv H Q, *et al.* Drug screening and development from the affinity of S protein of new coronavirus with ACE2. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, **40**(4): 715-723
- [52] Zhou M, Liu Y, Cao J, *et al.* Bergamottin, a bioactive component of bergamot, inhibits SARS-CoV-2 infection in golden Syrian hamsters. Antiviral Res, 2022, **204**: 105365
- [53] Wang Q, Zhang Y, Wu L, *et al.* Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. Cell, 2020, **181**(4): 894-904 e899
- [54] Ou X, Liu Y, Lei X, *et al.* Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV. Nat Commun, 2020, **11**(1): 1620
- [55] Ren Z, Liang W, Sheng J, *et al.* Gal-3 is a potential biomarker for spinal cord injury and Gal-3 deficiency attenuates neuroinflammation through ROS/TXNIP/NLRP3 signaling pathway. Biosci Rep, 2019, **39**(12): BSR20192368
- [56] Chen S S, Sun L W, Brickner H, *et al.* Downregulating galectin-3 inhibits proinflammatory cytokine production by human monocyte-derived dendritic cells via RNA interference. Cell Immunol, 2015, **294**(1): 44-53
- [57] Caniglia J L, Guda M R, Asuthkar S, *et al.* A potential role for Galectin-3 inhibitors in the treatment of COVID-19. PeerJ, 2020, **8**: e9392
- [58] Caniglia J L, Asuthkar S, Tsung A J, *et al.* Immunopathology of galectin-3: an increasingly promising target in COVID-19. F1000Res, 2020, **9**: 1078
- [59] Stegmayr J, Zetterberg F, Carlsson M C, *et al.* Extracellular and intracellular small-molecule galectin-3 inhibitors. Sci Rep, 2019, **9**(1): 2186
- [60] Hsieh T J, Lin H Y, Tu Z, *et al.* Dual thio-digalactoside-binding modes of human galectins as the structural basis for the design of potent and selective inhibitors. Sci Rep, 2016, **6**: 29457
- [61] Chalasani N, Abdelmalek M F, Garcia-Tsao G, *et al.* Effects of belataceptin, an inhibitor of galectin-3, in patients with nonalcoholic steatohepatitis with cirrhosis and portal hypertension. Gastroenterology, 2020, **158**(5): 1334-1345. e1335
- [62] Saito S, Alkhatib A, Kolls J K, *et al.* Pharmacotherapy and adjunctive treatment for idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). J Thorac Dis, 2019, **11**(Suppl 14): S1740-S1754
- [63] Behloul N, Baha S, Shi R, *et al.* Role of the GTNGTKR motif in the N-terminal receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. Virus Res, 2020, **286**: 198058
- [64] Tortorici M A, Walls A C, Lang Y, *et al.* Structural basis for human coronavirus attachment to sialic acid receptors. Nat Struct Mol Biol, 2019, **26**(6): 481-489
- [65] Robson B. Bioinformatics studies on a function of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein as the binding of host sialic acid glycans. Comput Biol Med, 2020, **122**: 103849
- [66] Unione L, Moure M J, Lenza M P, *et al.* The SARS-CoV-2 spike glycoprotein directly binds exogenous sialic acids: a NMR view. Angew Chem Int Ed Engl, 2022, **61**(18): e202201432
- [67] Yu H, Chen W, Shu J, *et al.* Bovine milk glycoproteins inhibit SARS-CoV-2 and influenza virus co-infection. bioRxiv, 2023. doi: 10.1101/2023.02.20.529234
- [68] Wang W, Li Q, Wu J, *et al.* Lentil lectin derived from Lens culinaris exhibit broad antiviral activities against SARS-CoV-2 variants. Emerg Microbes Infect, 2021, **10**(1): 1519-1529
- [69] Hippensteel J A, Lariviere W B, Colbert J F, *et al.* Heparin as a therapy for COVID-19: current evidence and future possibilities. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2020, **319**(2): L211-L217
- [70] Xu D, Esko J D. Demystifying heparan sulfate-protein interactions. Annu Rev Biochem, 2014, **83**: 129-157
- [71] Kim S Y, Jin W, Sood A, *et al.* Characterization of heparin and severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) spike glycoprotein binding interactions. Antiviral Res, 2020, **181**: 104873
- [72] Clausen T M, Sandoval D R, Spliid C B, *et al.* SARS-CoV-2 infection depends on cellular heparan sulfate and ACE2. Cell, 2020, **183**(4): 1043-1057. e1015
- [73] Watanabe Y, Allen J D, Wrapp D, *et al.* Site-specific glycan

- analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*, 2020, **369**(6501): 330-333
- [74] Mycroft-West C J, Su D, Pagani I, *et al.* Heparin inhibits cellular invasion by SARS-CoV-2: structural dependence of the interaction of the spike S1 receptor-binding domain with heparin. *Thromb Haemost*, 2020, **120**(12): 1700-1715
- [75] Paiardi G, Richter S, Oreste P, *et al.* The binding of heparin to spike glycoprotein inhibits SARS-CoV-2 infection by three mechanisms. *J Biol Chem*, 2022, **298**(2): 101507
- [76] Wood M J. The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin. *J Antimicrob Chemother*, 1996, **37**(2): 209-222
- [77] Ma L, Li Y, Shi T, *et al.* Teicoplanin derivatives block spike protein mediated viral entry as pan-SARS-CoV-2 inhibitors. *Biomed Pharmacother*, 2023, **158**: 114213
- [78] Zhou N, Pan T, Zhang J, *et al.* Glycopeptide antibiotics potently inhibit cathepsin L in the late endosome/lysosome and block the entry of ebola virus, middle east respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV), and severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV). *J Biol Chem*, 2016, **291**(17): 9218-9232
- [79] Wang J, Wei W, Zhang X, *et al.* Synthesis and biological evaluation of C-17-amino-substituted pyrazole-fused betulonic acid derivatives as novel agents for osteoarthritis treatment. *J Med Chem*, 2021, **64**(18): 13676-13692
- [80] Liu M, Wang J, Wan X, *et al.* Discovery and structural optimization of 3-O- β -Chacotriosyl betulonic acid saponins as potent fusion inhibitors of Omicron virus infections. *Bioorg Chem*, 2023, **131**: 106316
- [81] Thépaut M, Luczkowiak J, Vivès C, *et al.* DC/L-SIGN recognition of spike glycoprotein promotes SARS-CoV-2 trans-infection and can be inhibited by a glycomimetic antagonist. *PLoS Pathog*, 2021, **17**(5): e1009576
- [82] Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, **140**(6): 805-820
- [83] Geijtenbeek T B, Gringhuis S I. Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2009, **9**(7): 465-479
- [84] Van Vliet S J, Den Dunnen J, Gringhuis S I, *et al.* Innate signaling and regulation of dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol*, 2007, **19**(4): 435-440
- [85] Van Kooyk Y, Geijtenbeek T B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*, 2003, **3**(9): 697-709
- [86] Van Breedam W, Pöhlmann S, Favoreel H W, *et al.* Bitter-sweet symphony: glycan-lectin interactions in virus biology. *FEMS Microbiol Rev*, 2014, **38**(4): 598-632
- [87] Mnich M E, Van Dalen R, Van Sorge N M. C-type lectin receptors in host defense against bacterial pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, **10**: 309
- [88] De Jong M A, Vriend L E, Theelen B, *et al.* C-type lectin Langerin is a beta-glucan receptor on human Langerhans cells that recognizes opportunistic and pathogenic fungi. *Mol Immunol*, 2010, **47**(6): 1216-1225
- [89] Van Vliet S J, García-Vallejo J J, Van Kooyk Y. Dendritic cells and C-type lectin receptors: coupling innate to adaptive immune responses. *Immunol Cell Biol*, 2008, **86**(7): 580-587
- [90] Ordanini S, Varga N, Porkolab V, *et al.* Designing nanomolar antagonists of DC-SIGN-mediated HIV infection: ligand presentation using molecular rods. *Chem Commun (Camb)*, 2015, **51**(18): 3816-3819
- [91] Berzi A, Ordanini S, Joosten B, *et al.* Pseudo-mannosylated DC-SIGN ligands as immunomodulants. *Sci Rep*, 2016, **6**: 35373
- [92] Simmons G, Gosalia D N, Rennekamp A J, *et al.* Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**(33): 11876-11881
- [93] Nguyen H T, Zhang S, Wang Q, *et al.* Spike glycoprotein and host cell determinants of SARS-CoV-2 entry and cytopathic effects. *J Virol*, 2021, **95**(5): e02304-20
- [94] Kawase M, Shirato K, Van Der Hoek L, *et al.* Simultaneous treatment of human bronchial epithelial cells with serine and cysteine protease inhibitors prevents severe acute respiratory syndrome coronavirus entry. *J Virol*, 2012, **86**(12): 6537-6545
- [95] Iwata-Yoshikawa N, Okamura T, Shimizu Y, *et al.* TMPRSS2 contributes to virus spread and immunopathology in the airways of murine models after coronavirus infection. *J Virol*, 2019, **93**(6): e01815-18
- [96] Glowacka I, Bertram S, Müller M A, *et al.* Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol*, 2011, **85**(9): 4122-4134
- [97] Li K, Meyerholz D K, Bartlett J A, *et al.* The TMPRSS2 inhibitor nafamostat reduces SARS-CoV-2 pulmonary infection in mouse models of COVID-19. *mBio*, 2021, **12**(4): e0097021
- [98] Shapira T, Monreal I A, Dion S P, *et al.* A TMPRSS2 inhibitor acts as a pan-SARS-CoV-2 prophylactic and therapeutic. *Nature*, 2022, **605**(7909): 340-348
- [99] Hou X, Yan H, Wang A, *et al.* Inhibitory effects of GT0918 on acute lung injury and the molecular mechanisms of anti-inflammatory response. *bioRxiv*, 2022. doi: 10.1101/2022.06.29.498191
- [100] Xia S, Yan L, Xu W, *et al.* A pan-coronavirus fusion inhibitor targeting the HR1 domain of human coronavirus spike. *Sci Adv*, 2019, **5**(4): eaav4580
- [101] Xia S, Zhu Y, Liu M, *et al.* Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein. *Cell Mol Immunol*, 2020, **17**(7): 765-767
- [102] Xia S, Liu M, Wang C, *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2 (previously 2019-nCoV) infection by a highly potent pan-coronavirus fusion inhibitor targeting its spike protein that harbors a high capacity to mediate membrane fusion. *Cell Res*, 2020, **30**(4): 343-355
- [103] Pu J, He X, Xu W, *et al.* The analogs of furanyl methylidene rhodanine exhibit broad-spectrum inhibitory and inactivating activities against enveloped viruses, including SARS-CoV-2 and its variants. *Viruses*, 2022, **14**(3): 489

- [104] Cao J, Liu Y, Zhou M, *et al.* Screening of botanical drugs against SARS-CoV-2 entry reveals novel therapeutic agents to treat COVID-19. *Viruses*, 2022, **14**(2): 353
- [105] Yang C, Pan X, Xu X, *et al.* Salvianolic acid C potently inhibits SARS-CoV-2 infection by blocking the formation of six-helix bundle core of spike protein. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, **5**(1): 220
- [106] Yang C, Pan X, Huang Y, *et al.* Drug repurposing of itraconazole and estradiol benzoate against COVID-19 by blocking SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion. *Adv Ther (Weinh)*, 2021, **4**(5): 2000224
- [107] Armstrong L A, Lange S M, Dee Cesare V, *et al.* Biochemical characterization of protease activity of Nsp3 from SARS-CoV-2 and its inhibition by nanobodies. *PLoS One*, 2021, **16**(7): e0253364
- [108] Wu A, Peng Y, Huang B, *et al.* Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, **27**(3): 325-328
- [109] Barretto N, Jukneliene D, Ratia K, *et al.* The papain-like protease of severe acute respiratory syndrome coronavirus has deubiquitinating activity. *J Virol*, 2005, **79**(24): 15189-15198
- [110] Bailey-Elkin B A, Knaap R C M, Kikkert M, *et al.* Structure and function of viral deubiquitinating enzymes. *J Mol Biol*, 2017, **429**(22): 3441-3470
- [111] Swaim C D, Dwivedi V, Perng Y C, *et al.* 6-Thioguanine blocks SARS-CoV-2 replication by inhibition of PLpro protease activities. *iScience*, 2024, **24**(10): 103213
- [112] Báez-Santos Y M, St John S E, Mesecar A D. The SARS-coronavirus papain-like protease: structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Res*, 2015, **115**: 21-38
- [113] Manda G, Rojo A I, Martínez-Klimova E, *et al.* Nordihydroguaiaretic acid: from herbal medicine to clinical development for cancer and chronic diseases. *Front Pharmacol*, 2020, **11**: 151
- [114] Johansson B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. *Acta Psychiatr Scand Suppl*, 1992, **369**: 15-26
- [115] Jin Z, Du X, Xu Y, *et al.* Structure of M(pro) from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 2020, **582**(7811): 289-293
- [116] Rothan H A, Stone S, Natekar J, *et al.* The FDA-approved gold drug auranofin inhibits novel coronavirus (SARS-COV-2) replication and attenuates inflammation in human cells. *Virology*, 2020, **547**: 7-11
- [117] Roder C, Thomson M J. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs RD*, 2015, **15**(1): 13-20
- [118] Békés M, Van Der Heden Van Noort G J, Ekkebus R, *et al.* Recognition of Lys48-linked di-ubiquitin and deubiquitinating activities of the SARS coronavirus papain-like protease. *Mol Cell*, 2016, **62**(4): 572-585
- [119] Zhang L, Lin D, Sun X, *et al.* Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α -ketoamide inhibitors. *Science*, 2020, **368**(6489): 409-412
- [120] Hilgenfeld R. From SARS to MERS: crystallographic studies on coronaviral proteases enable antiviral drug design. *FEBS J*, 2014, **281**(18): 4085-4096
- [121] Zhang L, Lin D, Kusov Y, *et al.* α -Ketoamides as broad-spectrum inhibitors of coronavirus and enterovirus replication: structure-based design, synthesis, and activity assessment. *J Med Chem*, 2020, **63**(9): 4562-4578
- [122] Vuong W, Khan M B, Fischer C, *et al.* Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4282
- [123] Huang C, Shuai H, Qiao J, *et al.* A new generation M(pro) inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 Omicron variants. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, **8**(1): 128
- [124] Wang Q, Wu J, Wang H, *et al.* Structural basis for RNA replication by the SARS-CoV-2 polymerase. *Cell*, 2020, **182**(2): 417-428. e413
- [125] Cao Z, Gao W, Bao H, *et al.* VV116 versus Nirmatrelvir-Ritonavir for oral treatment of COVID-19. *N Engl J Med*, 2023, **388**(5): 406-417
- [126] Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2: SARS-CoV-2 receptor and regulator of the renin-angiotensin system: celebrating the 20th anniversary of the discovery of ACE2. *Circ Res*, 2020, **126**(10): 1456-1474
- [127] Lebovitz H E. Thiazolidinediones: the forgotten diabetes medications. *Curr Diab Rep*, 2019, **19**(12): 151
- [128] Qiu D, Li X N. Pioglitazone inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and chemokines in astrocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2015, **53**(9): 746-752
- [129] Setz C, Große M, Auth J, *et al.* Synergistic antiviral activity of Pamapimod and Pioglitazone against SARS-CoV-2 and its variants of concern. *Int J Mol Sci*, 2022, **23**(12): 6830
- [130] 程颖, 孙承文, 秦艳, 等. 基于 FFPE 组织切片的膀胱癌 N-连接糖链原位酶解及分析. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(10): 2001-2014
- Cheng Y, Sun C W, Qin Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(10): 2001-2014
- [131] 吉腾楷, 张继. GlyCosmos 门户网站在聚糖科学研究中的功能概述. *生物化学与生物物理进展*, 2022, **49**(12): 2463-2468
- Ji T Q, Zhang J. *Prog Biochem Biophys*, 2022, **49**(12): 2463-2468
- [132] Ramírez Hernández E, Hernández-Zimbrón L F, Martínez Zúñiga N, *et al.* The role of the SARS-CoV-2 S-protein glycosylation in the interaction of SARS-CoV-2/ACE2 and immunological responses. *Viral Immunol*, 2021, **34**(3): 165-173
- [133] Tian W, Li D, Zhang N, *et al.* O-glycosylation pattern of the SARS-CoV-2 spike protein reveals an "O-Follow-N" rule. *Cell Res*, 2021, **31**(10): 1123-1125
- [134] Shajahan A, Supekar N T, Gleinich A S, *et al.* Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, 2020, **30**(12): 981-988
- [135] Yang Q, Hughes T A, Kelkar A, *et al.* Inhibition of SARS-CoV-2

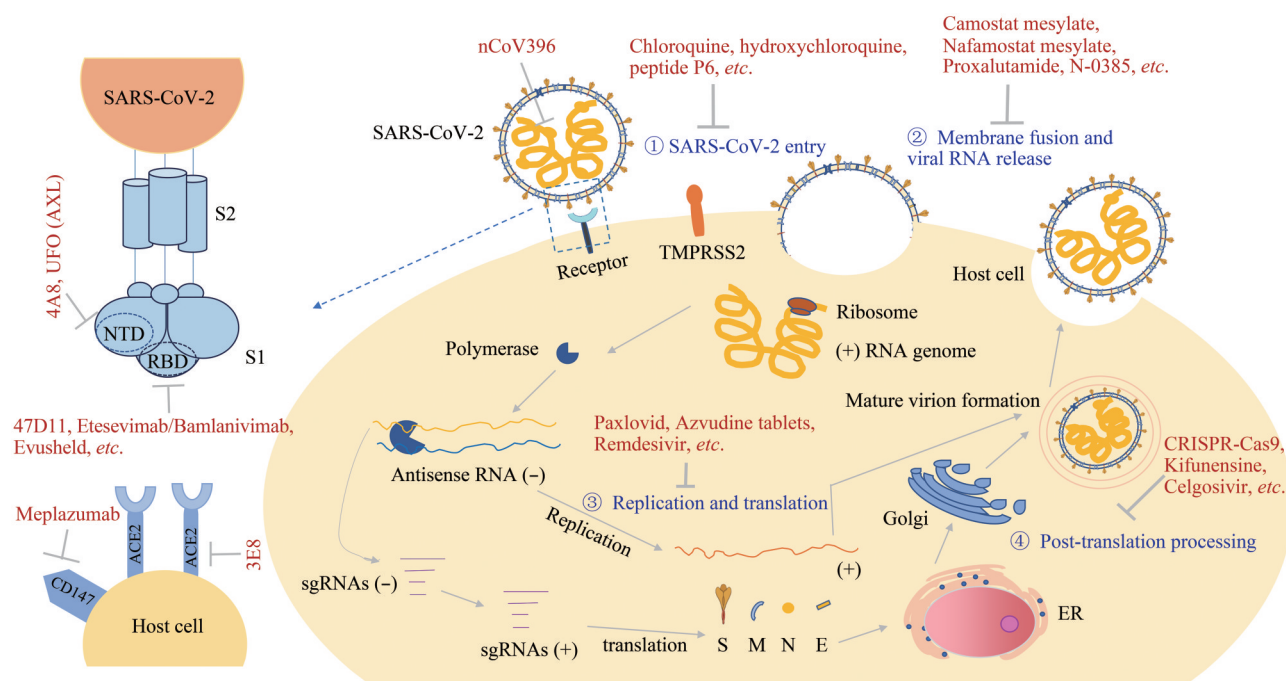
- viral entry upon blocking N- and O-glycan elaboration. *Elife*, 2020, **9**: e61552
- [136] Clarke E C, Nofchissey R A, Ye C, *et al.* The iminosugars celgosivir, castanospermine and UV-4 inhibit SARS-CoV-2 replication. *Glycobiology*, 2021, **31**(4): 378-384
- [137] Milewska A, Chi Y, Szczepanski A, *et al.* HTCC as a polymeric inhibitor of SARS-CoV-2 and MERS-CoV. *J Virol*, 2021, **95**(4): e01622-20
- [138] Prajapat M, Shekhar N, Sarma P, *et al.* Virtual screening and molecular dynamics study of approved drugs as inhibitors of spike protein S1 domain and ACE2 interaction in SARS-CoV-2. *J Mol Graph Model*, 2020, **101**: 107716
- [139] Teralı K, Baddal B, Gülcan H O. Prioritizing potential ACE2 inhibitors in the COVID-19 pandemic: insights from a molecular mechanics-assisted structure-based virtual screening experiment. *J Mol Graph Model*, 2020, **100**: 107697
- [140] Caly L, Druce J D, Catton M G, *et al.* The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 *in vitro*. *Antiviral Res*, 2020, **178**: 104787
- [141] Taguchi Y H, Turki T. A new advanced *in silico* drug discovery method for novel coronavirus (SARS-CoV-2) with tensor decomposition-based unsupervised feature extraction. *PLoS One*, 2020, **15**(9): e0238907
- [142] Kandeel M, Abdelrahman A H M, Oh-Hashi K, *et al.* Repurposing of FDA-approved antivirals, antibiotics, anthelmintics, antioxidants, and cell protectives against SARS-CoV-2 papain-like protease. *J Biomol Struct Dyn*, 2021, **39**(14): 5129-5136
- [143] Amraei R, Rahimi N. COVID-19, Renin-angiotensin system and endothelial dysfunction. *Cells*, 2020, **9**(7): 1652
- [144] Rizza S, Muniyappa R, Iantorno M, *et al.* Citrus polyphenol hesperidin stimulates production of nitric oxide in endothelial cells while improving endothelial function and reducing inflammatory markers in patients with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011, **96**(5): E782-E792

The Research Status of Novel Coronavirus Antibodies and Small Molecule Inhibitors*

WU Xin, YU Han-Jie, BAO Xiao-Juan, WANG Yu-Zi, LI Zheng**

(Laboratory for Functional Glycomics, College of Life Sciences, Northwest University, Xi'an 710069, China)

Graphical abstract



Abstract The World Health Organization has declared that the outbreak of coronavirus disease 2019 (COVID-19) is a global pandemic. As mutations occurred in the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), the global epidemic still needs further concern. Worryingly, the effectiveness and neutralizing activity of existing antibodies and vaccines against SARS-CoV-2 variants is declining. There is an urgent need to find an effective antiviral medication with broad-spectrum inhibitory effects on novel coronavirus mutant strains against the SARS-CoV-2 infection. Neutralizing antibodies play an important role in the prevention and treatment of COVID-19. The interaction of spike-receptor-binding domain (Spike-RBD) of SARS-CoV-2 and human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is the first and critical step of SARS-CoV-2 infection. Hence, the

* This work was supported by grants from Key Research and Development Program of Shaanxi Province (2021ZDLSF01-04) and The Natural Science Foundation of Shaanxi Province (2021JM-319).

** Corresponding author.

Tel: 86-29-88304104, E-mail: zhengli@nwu.edu.cn

Received: March 21, 2023 Accepted: July 25, 2023

SARS-CoV-2 Spike-RBD is a hot target for neutralizing antibodies development. Evusheld, the combination of Tixagevimab and Cilgavimab monoclonal antibodies (mAbs) targeting Spike-RBD exhibits neutralizing activity against BA.2.12.1, BA.4 and BA.5, which could be used as pre-exposure prophylaxis against SARS-CoV-2 infection. The nucleocapsid (N) protein is a conservative and high-abundance structural protein of SARS-CoV-2. The nCoV396 monoclonal antibody, isolated from the blood of convalescent COVID-19 patients against the N protein of SARS-CoV-2. This mAb not only showed neutralizing activity but also inhibits hyperactivation of complement and lung injury induced by N protein. The mAb 3E8 targeting ACE2 showed broadly neutralizing activity against SARS-CoV-2 and D614G, B.1.1.7, B.1.351, B.1.617.1 and P.1 variants *in vitro* and *in vivo*, but did not impact the biological activity of ACE2. Compared with neutralizing antibodies, small molecule inhibitors have several advantages, such as broad-spectrum inhibitory effect, low cost, and simple administration methods. Several small-molecule inhibitors disrupt viral binding by targeting the ACE2 and N-terminal domain (NTD) of SARS-CoV-2 spike protein. Known drugs such as chloroquine and hydroxychloroquine could also block the infection of SARS-CoV-2 by interacting with residue Lys353 in the peptidase domain of ACE2. The transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) inhibitors Camostat mesylate and Proxalutamide inhibit infection by blocking TMPRSS2 mediates viral membrane fusion. The main protease inhibitor Paxlovid and RNA-dependent RNA polymerase inhibitor Azvudine have been approved for treatment of COVID-19 patients. This review summarizes the current research status of neutralizing antibodies and small molecule inhibitors and prospects for their application. We expect to provide more valuable information for further studies in this field.

Key words COVID-19, SARS-CoV-2, mutant strain, neutralizing antibody, small molecule inhibitor

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0093