

• 综述 •

拟肽类 3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶抑制剂的研究进展

石 玉, 张国宁, 朱 梅, 王玉成*

中国医学科学院 医药生物技术研究所, 北京 100050

摘 要: 冠状病毒是一类广泛存在、可感染人畜并引起严重急性慢性呼吸道系统疾病的病原体。3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶 (3CL 蛋白酶) 是一种位于冠状病毒非结构蛋白 nsp5 上的半胱氨酸蛋白酶, 被认为是广谱抗冠状病毒极具吸引力的靶标之一。拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂具有更高的靶向性、更广泛的抑制谱、更低的不良反应。总结了已上市的奈玛特韦、来瑞特韦、先诺特韦、阿泰特韦和处于临床试验阶段的拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂的研究进展。

关键词: 拟肽类 3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶抑制剂; 冠状病毒; 3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶; 奈玛特韦; 来瑞特韦; 先诺特韦; 阿泰特韦

中图分类号: R974 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)01-0215-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.01.036

Research progress on peptide 3-chymotrypsin-like protease inhibitors

SHI Yu, ZHANG Guoning, ZHU Mei, WANG Yucheng

Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

Abstract: Coronavirus is a type of pathogen that is widely present, can infect humans and animals, and cause serious acute and chronic respiratory system diseases. 3-Chymotrypsin like protease (3CL protease) is a cysteine protease located on the non-structural protein nsp5 of the coronavirus, and is considered one of the highly attractive targets for broad-spectrum anti coronavirus therapy. Peptide 3CL protease inhibitors have higher targeting, wider inhibition spectrum, and lower adverse reactions. This article summarizes the research progress of the marketed drugs such as nirmatrelvir, leritrelvir, simnotrelvir, atilotrelvir, and the peptide 3CL protease inhibitors currently in clinical trials.

Key words: peptide 3-chymotrypsin-like protease inhibitor; coronavirus; 3-chymotrypsin-like protease; nirmatrelvir; leritrelvir; simnotrelvir; atilotrelvir

冠状病毒是一类广泛存在、可感染人畜并引起严重急性慢性呼吸道系统疾病的病原体。人类冠状病毒是具有正链单链 RNA 基因组的包膜病毒。目前已报道了 7 种人类冠状病毒, 其中 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63 和 HCoV-HKU1 仅引起类似普通感的轻微呼吸道症状。相较于上述 4 种病毒, SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 传染性强, 致死率高, 对人类健康和公共卫生造成了严重威胁^[1-2]。

3-胰凝乳蛋白酶样蛋白酶[3CL 蛋白酶, 3CL^{pro},

也称为主蛋白酶 (M^{pro})]是一种位于冠状病毒非结构蛋白 nsp5 上的半胱氨酸蛋白酶, 以同型二聚体的形式存在, 包含大约 300 个氨基酸^[3], 是大多数 RNA 病毒共同具有的蛋白酶, 负责催化冠状病毒前体多蛋白水解为病毒功能蛋白^[4]。3CL 蛋白酶可以在 11 个保守位点切割冠状病毒多蛋白, 主要作用于病毒进入宿主细胞后的初始复制阶段, 在冠状病毒的复制周期中, 内吞进入细胞后, 利用细胞机制从病毒 RNA 中表达两个重叠的多蛋白 pp1a 和 pp1b, 这些多蛋白必须由两种蛋白酶 3CL 蛋白酶和木瓜蛋白

收稿日期: 2024-10-22

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (82204207)

作者简介: 石 玉 (1984—) 女, 天津人, 副研究员, 博士研究生, 从事抗肿瘤和抗病毒药物相关的新药研发。E-mail: berylshi@sina.com

*通信作者: 王玉成, 教授, 博士生导师, 从事新药设计及药物合成研究。E-mail: wangyucheng@imb.pumc.edu.cn

酶样蛋白酶加工,以释放复制所需的病毒蛋白^[5]。3CL 蛋白酶在冠状病毒中是高度保守的,通过计算机模拟发现 3 种冠状病毒 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 的 3CL 蛋白酶具有高度的结构相似性和保守性,相似性高达 96.1%^[6],并且没有发现具有相同底物特异性的人宿主细胞蛋白酶^[7]。鉴于 3CL 蛋白酶在病毒复制中的关键作用及其高度保守性,3CL 蛋白酶被认为是广谱抗冠状病毒极具吸引力的靶标之一^[8]。

根据 3CL 蛋白酶抑制剂的结构和结合模式的不同主要可分为两类,即非拟肽类和拟肽类。非拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂通过范德华力、氢键、疏水键等化学键与 3CL 蛋白酶活性口袋中的残基相互作用,具有弱的结合方式。拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂是通过将化学“弹头”型试剂连接到模拟天然底物的肽上。它们首先与酶结合,形成非共价复合物,使得弹头位于催化残基附近,然后亲电弹头与 3CL 蛋白酶的半胱氨酸(Cys145)的巯基发生共价结合,进而使 3CL 蛋白酶失活^[9]。常用的亲电弹头主要包括含有 Michael 受体类、醛类^[10]、不同类型的酮类、 α -酮酰胺^[11]、酯类和腈类等。与传统的小分子抑制剂相比,拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂具有更高的靶向性,可以更精确地抑制目标酶的活性;具有更广泛的抑制谱,可以同时抑制多种相关病毒的繁殖;具有更低的不良反应,由于多肽类抑制剂只与目标酶结合,不会影响其他细胞代谢过程,因此不良反应相对较低^[12]。目前,已有多个拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂如奈玛特韦、来瑞特韦、先诺特韦、阿泰特韦上市,还有几十个处于临床前或临床各阶段^[13]。本文总结了已上市和处于临床试验阶段的拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂的研究进展。

1 已上市的拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂

1.1 奈玛特韦(nirmatrelvir)

奈玛特韦是由辉瑞公司研发的一种拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂^[14],结构见图 1。其与利托那韦(ritonavir)联用组成口服药奈玛特韦片/利托那韦片(帕罗韦德,Paxlovid),2021 年 12 月分别获得欧洲药品管理局和美国食品药品监督管理局(FDA)的紧急使用授权,用于治疗 12 岁及以上的轻至中度新型冠状病毒感染患者。奈玛特韦作为 3CL 蛋白酶抑制剂能与冠状病毒的 3CL 蛋白酶有效地结合,可以干扰病毒复制和传播过程^[15]。利托那韦是一种经典的抗病毒药物增效剂,可通过对 CYP3A4 酶的

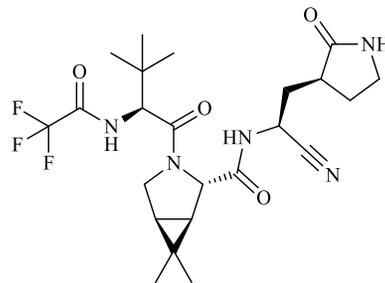


图 1 奈玛特韦的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of nirmatrelvir

强效抑制作用使奈玛特韦的代谢缓慢,可以长时间维持奈玛特韦的血药浓度,增加奈玛特韦的生物利用度和稳定性。试验证明奈玛特韦对几种病毒变体仍然有效,包括含有 3CL 蛋白酶单一突变的奥密克戎病毒^[16],并于 2022 年 2 月 12 日获得国家药品监督管理局的附条件批准引进,用于发病 5 d 内的轻型和普通型且伴有进展为重症高风险因素的成人新型冠状病毒感染患者。

奈玛特韦含有三氟乙酰基片段,相对于酮的形式,羰基旁边的 CF_3 基团在热力学上稳定了半酮的形式,使羰基容易被水亲核取代,并且可能存在一种独特而保守的 P1 位点可以识别 Gln 残基,有助于 3CL 蛋白酶抑制剂的活性^[17]。1 项 III 期临床试验显示,奈玛特韦与利托那韦联合使用后,能够显著缩短患者的症状持续时间和病毒清除时间,清除率明显高于接受安慰剂治疗的患者^[18]。另外,不良反应相对较少,主要包括恶心、腹泻和头痛等。在临床试验中,这些不良反应在接受奈玛特韦片/利托那韦片治疗的患者中的发生率与接受安慰剂治疗的患者相似。另一项 II/III 期临床试验显示,奈玛特韦与另一种抑制病毒复制药物法匹拉韦(favipiravir)联合使用,能够显著降低患者的病死率。这些临床试验结果表明,奈玛特韦是一种有效的抗病毒药物,可以用于治疗新型冠状病毒感染。此外,剂量和用药时间、安全性等方面还需要进一步研究,以确定最佳的治疗方案。有文献指出,奈玛特韦对某些 3CL 蛋白酶的变种有耐药的可能^[19]。

1.2 来瑞特韦(leritrelvir, RAY-1216)

多肽类 3CL 蛋白酶抑制剂来瑞特韦是一种口服新型的抗病毒药物,结构见图 2,由广东瑞诺文生物科技有限公司开发,作为新型冠状病毒感染特效药已经被批准上市^[20]。研究表明,来瑞特韦具有较强的抑制冠状病毒的活性,并且对多种冠状病毒具有广谱性的抑制作用,其在临床试验中表现出了

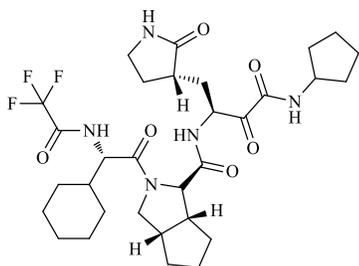


图 2 来瑞特韦的化学结构

Fig. 2 Chemical structure of leritrelvir

与奈玛特韦相似的抑制活性 ($EC_{50}=95$ nmol/L)。由于结构的改动, 来瑞特韦的半衰期是奈玛特韦的 3 倍, 因此不需要与肝酶抑制剂利托那韦联合使用, 提高了药物的口服利用度。通过计算机模拟、结构分析等多种手段, 探究了来瑞特韦与 3CL 蛋白酶的结合模式, 并对其作用机制进行了深入研究, 其结构与底物结构相似, 可以与 3CL 蛋白酶的底物结合区的苯丙氨酸 140 残基发生相互作用, 从而抑制 3CL 蛋白酶的活性。此外, 研究还发现, 来瑞特韦与 3CL 蛋白酶的结合位点具有多样性, 可以在不同的结合位点上与 3CL 蛋白酶相互作用, 从而实现了针对不同 3CL 蛋白酶亚型的抑制作用。通过 X 射线晶体学等技术对来瑞特韦与 3CL 蛋白酶的结合模式进行了深入研究, 发现来瑞特韦可以与 3CL 蛋白酶底物结合区中的苯丙氨酸残基相互作用, 从而实现抑制作用。

1.3 先诺特韦 (simnotrelvir, SIM-0417)

先诺特韦是我国首个具有知识产权的拟肽类共价 3CL 蛋白酶抑制剂, 结构见图 3, 于 2023 年 2 月中旬上市。与利托那韦联用组成先诺特韦片/利托那韦片组合包装 (仙诺欣[®]), 它由先声药业与中国科学院上海药物研究所、武汉病毒学研究所联合开发^[21]。先诺特韦与 3CL 蛋白酶作用机制主要包括以下几个方面: (1) 竞争性抑制: 先诺特韦的乙酰氨基酸酯基团可以与 3CL 蛋白酶的活性位点结合, 从而竞争性地抑制 3CL 蛋白酶的活性^[22]。(2) 协同作用: 先诺特韦可以与 3CL 蛋白酶的另一个结合位点相互作用, 从而增强其抑制作用。(3) 选择性: 先诺特韦对 3CL 蛋白酶的抑制作用比其他蛋白酶的选择性高, 从而减少了其对人体细胞的影响。先诺特韦与 3CL 蛋白酶的结合模式为冠状病毒的治疗提供了新思路。目前已有一些临床研究表明, 先诺特韦和利托那韦的联合应用可以有效地抑制病毒的复制和传播, 从而缩短患者的病程和减轻症状。

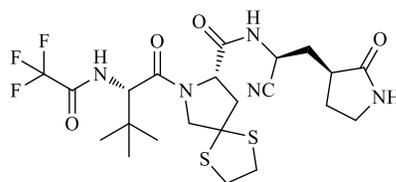


图 3 先诺特韦的化学结构

Fig. 3 Chemical structure of simnotrelvir

此外, 先诺特韦和利托那韦联合应用还可以减少病毒的耐药性, 从而提高治疗的有效性。

1.4 阿泰特韦 (atilotrelvir, GST-HG171)

阿泰特韦是福建广生中霖生物科技有限公司研发的一种新型、强效、广谱的口服小分子抑制剂, 靶向 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶, 结构见图 4。2023 年 11 月, 国家药品监督管理局批准了阿泰特韦片/利托那韦片组合包装 (泰中定[®]) 在我国上市。在体外和体内的临床前研究中, 它显示出比奈玛特韦更优越的抗病毒活性。Huang 等^[23]确定通过蛋白质结合调整的奈玛特韦的体外 50% 有效浓度 (EC_{50}) 分别为 840.25、190.07、560.17 ng/mL, 对野生型、omicron BA.4 和 omicron BA.5 变体 SARS-CoV-2, 阿泰特韦的相应值分别为 149.68、93.22、131.87 ng/mL。可见阿泰特韦的抗病毒作用是奈玛特韦的 2.0~5.6 倍。此外, 阿泰特韦表现出良好的药动学特征, 并在临床前研究和健康受试者进行了 I 期临床试验 (NCT 05668897)^[24]。当利托那韦与阿泰特韦一起服用时, 发现其显著增加健康受试者中阿泰特韦的血浆暴露。Lu 等^[25]在轻型/中型新型冠状病毒感染患者中开展了 1 项随机、双盲、安慰剂对照 II/III 期临床研究, 进一步探究了阿泰特韦片/利托那韦片对于新型冠状病毒感染治疗的有效性和安全性, 结果表明阿泰特韦联合利托那韦在感染新出现的 omicron XBB 和非 XBB 变异体的轻中度新型冠状病毒感染患者中的疗效和安全性良好, 提示了该药具有广谱抗新型冠状病毒感染的潜力。根据这项研究的结果, 阿泰特韦联合利托那韦已获得国家药品监督管理局有条件批准, 用于治疗轻中度新型冠状病毒感染成人患者。

2 尚处于临床或临床前的拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂

3CL 蛋白酶抑制剂就是可以抑制 3CL 蛋白酶活性的药物, 这些药物可以在新型冠状病毒进入人体后, 与 3CL 蛋白酶结合, 从而阻止病毒进行复制和传播。目前有许多拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂还在研究中, 其中部分已经进入了临床试验阶段。

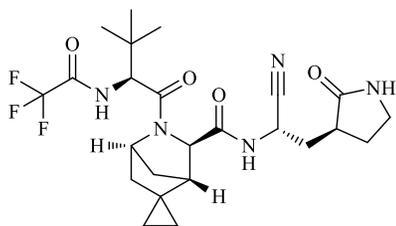


图 4 阿泰特韦的化学结构

Fig. 4 Chemical structure of atilofrelvir

2.1 GC-376

GC-376 是一种广谱抗病毒化合物，结构见图 5，目前处于临床前开发状态。最初是由美国 Anivive Lifesciences 公司开发为猫冠状病毒设计的，通常被用于评价其他潜在抑制剂的参考标准。GC-376 可以抑制新型冠状病毒的复制，且对小鼠没有明显的不良反应。GC-376 是一种具有酰化酰胺骨架的化合物，具有磺酸钠的结构^[26]，很容易转化为肽醛 GC-373 的前药，其结构与成熟的病毒蛋白质前体类似，能够与 3CL 蛋白酶结合，并抑制其活性^[27]。GC-376 主要通过 3CL 蛋白酶的活性口袋中的半胱氨酸残基形成共价键，从而抑制其活性^[19]。GC-376 已被证明对多种新型冠状病毒具有抗病毒活性，包括 SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2^[28]。GC-376 可以有效地抑制病毒的复制和感染，且对病毒的细胞毒性影响较小。其在 Vero E6 细胞中的 EC₅₀ 值为 0.7 μmol/L。此外，在双质粒体系中 GC-376 的 EC₅₀ 为 3.30 μmol/L，在实验室中表现出良好的药理特性和安全性^[29]。此外，GC-376 的药动学特性也得到了较好的研究，表明其在体内的代谢和排泄情况较稳定。以 GC-376 为母核结构，后期进一步开发出的化合物 GC-373 已经进行到细胞试验阶段，该分子无细胞毒性，对 3CL 蛋白酶的 IC₅₀ 值为 0.40 μmol/L。此外，Liu 等^[30]也在 GC-376 的结构上进行了改进，得到 EB 和 NK 系列，其中 coronastat (NK01-63) 的各项参数均优于 GC-376，并预测该化合物对各种冠状病毒均有较强的抑制作用。

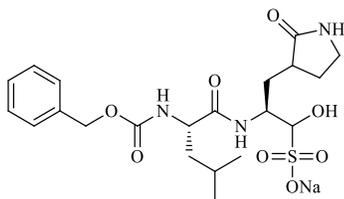


图 5 GC-376 的化学结构

Fig. 5 Chemical structure of GC-376

2.2 lufotrelvir (PF-07304814)

lufotrelvir 是辉瑞公司研发的通过静脉注射给药的多肽类 3CL 蛋白酶抑制剂，是第一个进入临床试验阶段的 3CL 酶抑制剂，目前已经进入临床 III 期，结构见图 6。Li 等^[31]研究表明，lufotrelvir 是一个具有磷酸酯结构的抑制剂，该抑制剂可以通过与 3CL 蛋白酶的活性中心结合，从而抑制其活性。目前，研究发现这个抑制剂对于 SARS-CoV、MERS-CoV 等多种人类感染的冠状病毒的 3CL 蛋白酶具有广谱抑制活性，与另一个酰胺抑制剂博赛泼维 (boceprevir) 相似。以细胞病变效应抑制检测实验评估其在细胞中的抗病毒活性，显示效果显著，lufotrelvir 在 Vero E6-enACE2 细胞中表现出了良好的 SARS-CoV-2 抑制活性，其 EC₅₀ 值为 0.23 μmol/L，在 Vero E6-EGFP 细胞中的 EC₅₀ 值为 0.7 μmol/L^[32]。然而 lufotrelvir 对不同主要蛋白酶的体外抑制效果存在差异，对 SARS-CoV、MERS-CoV 和 HCoV-NL63 的 3CL 蛋白酶活性的 IC₅₀ 值低于对 SARS-CoV-2 的 3CL 蛋白酶活性的 IC₅₀ 值。有可能是因为抑制剂与酶的结合亲和力差异造成 lufotrelvir 抑制效果不同或蛋白质稳定性的差异可能导致抑制差异。lufotrelvir 在临床试验中展示出了良好的安全性和有效性^[33]。在 1 项随机、双盲、安慰剂对照的临床试验中，研究人员将 lufotrelvir 与安慰剂进行比较，发现 lufotrelvir 可以显著减少患者住院时间和病情严重程度^[34]。同时，lufotrelvir 的安全性也得到了验证，未发现严重不良反应。

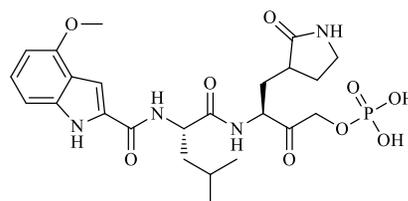


图 6 lufotrelvir 的化学结构

Fig. 6 Chemical structure of lufotrelvir

2.3 EDP-235

EDP-235 是由美国纽约州立大学水牛城分校的研究人员研发的一种口服新型冠状病毒 3CL 抑制剂，由 Enanta 公司进行开发，目前处于临床 II 期阶段，并且化学结构没有公开。研究人员利用计算机模拟技术筛选出具有抑制新型冠状病毒复制的小分子化合物，并通过体外实验和动物实验验证了 EDP-235 的抑制作用^[35]。研究人员在临床前研究中

发现, EDP-235 可以有效地抑制新型冠状病毒的复制, 且对其他冠状病毒和人类细胞没有明显的毒性。此外, EDP-235 还具有良好的药动学特性, 可以快速达到有效浓度, 并在体内持续时间较长。EDP-235 在体外实验中表现出对 SARS-CoV-2 病毒复制的抑制作用。相关研究发现, EDP-235 可以有效地抑制 SARS-CoV-2 的复制, IC_{50} 为 5.8 nmol/L。此外, EDP-235 还可以抑制其他冠状病毒的复制, 包括 SARS-CoV、MERS-CoV, 其 IC_{50} 分别为 1.9、70 nmol/L。EDP-235 对 Vero E6 细胞的细胞毒性 $CC_{50} > 10 \mu\text{mol/L}$, 表明其选择性强、毒性低^[36]。在小鼠和仓鼠模型药动学实验中, EDP-235 特性良好。研究人员发现, EDP-235 可快速达到有效浓度, 并在体内持续时间较长。此外, EDP-235 在小鼠和仓鼠模型中的药物代谢和排泄特性与人类相似, 表明其具有潜在的临床应用价值, 具有进一步研究开发的潜力。

2.4 bofutrelvir (FB-2001)

bofutrelvir 是前沿生物公司与中国科学院上海药物研究所、中国科学院武汉病毒研究所共同开发的一款雾化吸入用拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂, 结构见图 7, 目前进行临床 III 期试验研究, 在同领域开发进度较迅速^[37]。bofutrelvir 对 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶显示出良好的体外抑制活性 ($IC_{50} = 0.053 \mu\text{mol/L}$, $EC_{50} = 0.53 \mu\text{mol/L}$), 并且没有明显的细胞毒性 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol/L}$)^[38]。雾化吸入给药的 bofutrelvir 在临床前研究数据展示了良好的安全性, 其在呼吸道和肺部的药物暴露量显著, 雾化吸入采用局部给药方式, 进入血液的药物较少, 系统暴露量较小, 预期药物所致的全身不良反应小, 药物相互作用更少, 无需根据肝肾功能损害调整相应剂量, 该研究已申请 I 期临床试验, 进一步评估了其有效性和安全性 (NCT05415241)。此外, 注射用 bofutrelvir 的国际多中心临床试验 II/III 期试验目前正在加速推进。

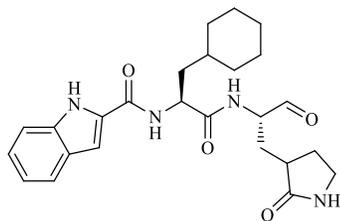


图 7 bofutrelvir 的化学结构

Fig. 7 Chemical structure of bofutrelvir

2.5 YH-6

YH-6 是由日本九州大学研发的, 结构见图 8, 作为 YH-53 候补的口服共价 3CL 蛋白酶抑制剂进行设计和开发^[39]。据称, 该药物可能对所有变异毒株均有效, 与目前使用的口服药相比, 可适用于更多患者。YH-6 具有 (*R*)-氯氟乙酰胺基 (CFA) 和 (*S*)-2-吡咯烷酮基团, 与对应的非对映体相比具有更强的活性。YH-6 的体内抗病毒活性有待进一步研究。CFA 抑制剂对 293T 和 Vero E6 细胞均表现出较低的细胞毒性 ($CC_{50} > 35 \mu\text{mol/L}$)。在感染 SARS-CoV、MERS-CoV 和 HCoV-OC43 的 293TAT 和 293T-DPP4 细胞中进一步测试了 YH-6 的抗病毒活性。YH-6 对 HCoV-OC43 的活性 (EC_{50} 分别为 1.7、3.2 nmol/L) 比 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 变异更有效, 这表明基于 CFA 的 3CL 蛋白酶抑制剂对 HCoV-OC43 具有广泛的效用^[40]。在小鼠中进行了药动学研究, 小鼠 ig YH-6 100 mg/kg, 1 h 后血药浓度为 $15.2 \mu\text{mol/L}$, 6 h 后降至 $0.40 \mu\text{mol/L}$ 。另一方面, YH-6 在血浆中与人血清白蛋白的结合较低。血浆中 YH-6 的未结合分数为 0.15。总的来说, 这些抑制活性和药动学数据表明 YH-6 具有进一步药物开发的潜力。

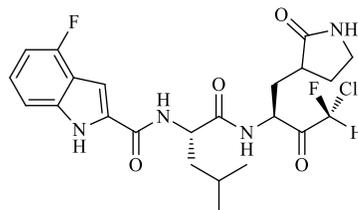


图 8 YH-6 的化学结构

Fig. 8 Chemical structure of YH-6

2.6 CMX990

CMX990 是由斯克里普斯研究所最早进行研发的一种新型的强效 3CL 蛋白酶抑制剂, 结构见图 9。该抑制剂带有新型的三氟甲氧基甲基酮弹头, 能够实现低纳摩尔级的抗病毒效力 ($IC_{50} = 23.4 \text{ nmol/L}$)。它是一种中性分子、具有良好的非 pH 值依赖性水溶性, 在 pH 1.2~7.4 的缓冲液中的溶解度为 1.4~1.5 mg/mL。在接近中性 pH 值的人工肠液存在下, 在进食状态模拟肠液中观察到较低的溶解度 (0.734 mg/mL, pH 5.0), 在禁食状态模拟肠液中观察到较高的值 ($> 2 \text{ mg/mL}$, pH 6.5), 同时具有良好的理化性质和药动学性质^[41]。与奈玛特韦相比, CMX990 具有明显差异化的效力 (在原代细胞

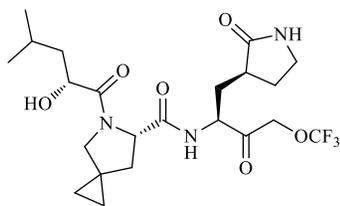


图 9 CMX990 的化学结构

Fig. 9 Chemical structure of CMX990

中的效力高出 1.5 倍)和人体体外清除率(微粒体清除率高出 4 倍,肝细胞清除率高出 10 倍),具有良好的体内外相关性。同时 CMX990 可以有效且可重复地抑制 8 种测试的 SARS-CoV-2 变体的复制,包括 α 、 δ 和 omicron 等。它还显示出对其他 β 冠状病毒(如 HCoV-OC43)和冠状病毒(如 HCoV-229E)的活性,因此可将 CMX990 指定为泛冠状病毒抑制剂。同时基于良好的临床前特征和预计 1、2 次/d 剂量的非增强口服治疗,CMX990 作为 SARS-CoV-2 的口服候选药物进入了 I 期临床试验。

2.7 pomotrelvir (PBI-0451)

pomotrelvir 是 Pardes Biosciences 公司于 2020 年 8 月研发的口服生物可利用的二肽类 3CL 蛋白酶可逆共价抑制剂,结构见图 10,现已由诺华公司进行临床 II 期研究。与奈玛特韦的机制类似,pomotrelvir 同样通过丁腈弹头催化半胱氨酸与之结合形成共价键,但 pomotrelvir 的非共价结合位点较少,所以抑制活性不如前者($IC_{50}=2.1 \mu\text{mol/L}$)^[42]。pomotrelvir 与 3CL 蛋白酶主要形成了 7 个氢键,其中有 5 个氢键是与 3CL 蛋白酶的骨架酰胺键的 O 或 N-H 形成的,这样的设计使得 pomotrelvir 具有很好的耐药屏障。Pardes Biosciences 公司对 pomotrelvir 做了突变验证,将高浓度 pomotrelvir 与病毒培养,进行传代,诱导突变,传到 27 代,出现了 3CL 蛋白酶相关的 6 个突变株,测试发现 pomotrelvir 对这些突变株依然具有很好的抑制活性,而奈玛特韦的抑制活性显著降低^[43]。首次人体 I 期试验(NCT05011812)研究了 pomotrelvir 在单次和多次递增剂量后的安全性、耐受性和药动学情况,并探索 pomotrelvir 的药物相互作用潜力。pomotrelvir 在 >20 倍的单次和 >14 倍的多次每日总剂量范围内普遍耐受性良好。在药物相互作用队列中,pomotrelvir 与利托那韦联合给药时,药动学没有受到实质性影响。在多个递增剂量队列中,中期数据显示,pomotrelvir 700 mg/次、2 次/d,达到并维持了药物代谢暴露,认为其有可能提供针对

SARS-CoV-2 和新出现的变体的有效抗病毒活性。

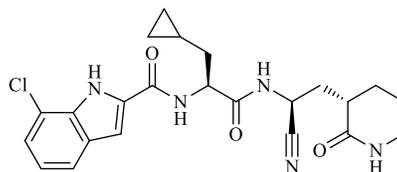


图 10 pomotrelvir 的化学结构

Fig. 10 Chemical structure of pomotrelvir

2.8 YH-53

YH-53 由日本盐野义制药公司于 2022 年 10 月初发现,目前尚处于临床前阶段,结构见图 11。YH-53 是一种具有独特苯并噻唑基酮的拟肽化合物。该抑制剂 P1 基团的羰基和酰胺基团与 SARS CoV-23CL 蛋白酶的残基 His163、Glu166 相互作用,而苯并噻唑更容易与 His41 形成氢键。其 P2 位置的酰胺与 Gln189 形成氢键,使得抑制剂与口袋结合更紧密。YH-53 对 SARS-CoV-1 和 SARS-CoV-2 3CL 蛋白酶的 K_i 值分别为 6.3、34.7 nmol/L,显著抑制 SARS-CoV-2 复制。研究显示,YH-53 能够在 $10 \mu\text{mol/L}$ 下完全阻断 Vero 细胞中的病毒增殖,并且在 CC_{50} 值 >100 $\mu\text{mol/L}$ 时未观察到 YH-53 的细胞毒性,是一种有效的抗 SARS-CoV-2 的抗病毒剂^[44]。对大鼠的灌胃生物利用度和药动学的体内外实验评估显示,当对大鼠静脉给予 YH-53 (0.1 mg/kg) 时,YH-53 血浆浓度-时间曲线下面积 ($AUC_{0-\infty}$) 为 $(19.7 \pm 8.2) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 。大鼠 ig 给予 0.5 mg/kg YH-53 后,其 $AUC_{0-\infty}$ 为 $(3.49 \pm 1.00) \text{ ng} \cdot \text{h/mL}$ 。iv 给药后 YH-53 的半衰期 ($t_{1/2}$) 为 $(2.97 \pm 1.02) \text{ h}$,而 ig 给药后 YH-53 的 $t_{1/2}$ 为 $(9.64 \pm 6.11) \text{ h}$,结果似乎不一致,对于 YH-53 iv 给药和 ig 给药之间 $t_{1/2}$ 值差异较大的机制尚需进一步研究。

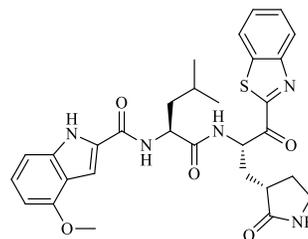


图 11 YH-53 的化学结构

Fig. 11 Chemical structure of YH-53

2.9 奥格特韦 (olgotrelvir, STI-1558)

奥格特韦是一种新型的口服前药,结构见图 12,从一系列化合物中优化而来,这些化合物旨在

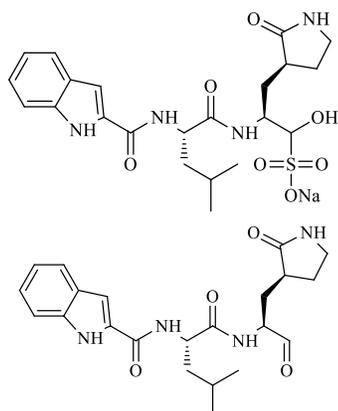


图 12 奥格特韦和母体奥格特韦醛 AC1115 的化学结构
Fig. 12 Chemical structures of olgotrelvir and its parent compound augertweidehyde AC1115

通过与 Cys145 共价结合来抑制 SARS-CoV 主蛋白酶。研究显示，奥格特韦是一种具有高生物利用度的口服前药，在血浆中转化为其活性形式奥格特韦醛。通过酶活性抑制测定和与 SARS-CoV-2 的组织蛋白酶 L 和主蛋白酶的共结晶结构分析，证实了奥格特韦和奥格特韦醛的双重作用机制。奥格特韦醛对测试的 SARS-CoV-2 变异株均显示出良好抗病毒活性。奥格特韦还通过抑制宿主组织蛋白酶 L 阻止刺突蛋白介导的假病毒进入宿主细胞。在 SARS-CoV-2 感染的 K18-hACE2 转基因小鼠模型中，奥格特韦显著降低了小鼠肺部的病毒载量，降低了因病毒感染引发的体质量减轻幅度，并减少了细胞因子的释放，改善了肺部损伤。奥格特韦对奈玛特韦耐药的主蛋白酶 E166 突变蛋白也显示出良好的抑制活性^[45]。根据现有研究结果可见，奥格特韦通过靶向抑制主蛋白酶和组织蛋白酶 L，显示出良好的抗病毒活性，并且血浆暴露量高、安全性好、药物相互作用少，是新一代双靶点新型冠状病毒感染口服抗病毒药物，可为新型冠状病毒感染患者特别是变异株感染、特殊人群患者等提供更优的选择。

3 结语

不论是 2003 年暴发的严重急性呼吸综合征冠状病毒、2012 年暴发的中东呼吸综合征冠状病毒，还是 2019 年底暴发的 SARS-CoV-2，都给人们生命健康、生产生活、经济发展和社会秩序带来了巨大挑战和严重影响。以后是否会出现新的冠状病毒疫情仍充满不确定性，只有开发出有效的广谱抗冠状病毒药物才能做到“心中不慌”。在各种抗冠状病毒药物开发靶点中，3CL 蛋白酶是不同冠状病毒在复

制和转录过程中的关键蛋白，已成为抗冠状病毒药物研究中一个极重要的研究靶点。其中靶向 3CL 蛋白酶的拟肽类抑制剂在抗冠状病毒中表现尤其突出。拟肽类 3CL 蛋白酶抑制剂以共价不可逆方式与蛋白结合，表现出较好的抑制病毒复制活性。但共价抑制剂通常会表现出潜在的脱靶问题和不良反应，而且拟肽类抑制剂还普遍存在易发生耐药突变、稳定性差、口服生物利用度低等问题。在冠状病毒抑制剂的开发中，探索能够同时靶向多种冠状病毒靶点的多靶点药物（包括对因治疗和对症治疗）是提升治疗效果的重要途径。此外，结合拟肽类和非肽类抑制剂，通过联合用药或分子杂合策略，发挥其协同作用，也是一种有效的方法。多角度开发具有更高安全性、更优效力和更佳药动学性质的抗冠状病毒药物是当前研究的关键策略。随着冠状病毒变种的不断出现，抗冠状病毒药物研究必将吸引科学家和政府更多的研究投入，相信靶向 3CL 蛋白酶的小分子肽类抑制剂会在广谱抗冠状病毒药物的开发中大放异彩。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

- [1] Zhu N, Zhang D, Wang W, *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(8):727-733.
- [2] Antimicrobial Resistance Collaborators. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic analysis [J]. *Lancet*, 2022, 399(10325): 629-655.
- [3] Bacha U, Barrila J, Velazquez-Campoy A, *et al.* Identification of novel inhibitors of the SARS coronavirus main protease 3CLpro [J]. *Biochemistry*, 2004, 43(17): 4906-4912.
- [4] Macchiagodena M, Pagliai M, Procacc identification of potential binders of the main protease 3CL^{pro} of the COVID-19 via structure-based ligand design and molecular modeling [J]. *Chem Phys Lett*, 2020, 750: 137489.
- [5] Drayman N, DeMarco J, Jones K, *et al.* Masitinib is a broad coronavirus 3CL inhibitor that blocks replication of SARS-CoV-2 [J]. *Science*, 2021, 373(6557): 931-936.
- [6] Godeau D, Petit A, Richard I, *et al.* Return-to-work, disabilities and occupational health in the age of COVID-19 [J]. *Scand J Work Environ Health*, 2021, 47(5): 408-409.
- [7] Ma L, Li Q, Xie Y, *et al.* Repurposing of HIV/HCV protease inhibitors against SARS-CoV-2 3CL^{pro} [J]. *Antiviral Res*, 2022, 207: 105419.

- [8] Iketani S, Forouhar F, Liu H, *et al.* Lead compounds for the development of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 2016.
- [9] Konwar M, Sarma D. Advances in developing small molecule SARS 3CL^{pro} inhibitors as potential remedy for corona virus infection [J]. *Tetrahedron*, 2021, 77: 131761.
- [10] Kore A, Shanmugasundaram M, Charles I, *et al.* Synthesis and application of 2'-fluoro-substituted cap analogs [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(19): 5295-5299.
- [11] 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]. *J Med Chem*, 2020, 63(9): 4562-4578.
- [12] Liu Y, Liang C, Xin L, *et al.* The development of coronavirus 3C-like protease (3CL^{pro}) inhibitors from 2010 to 2020 [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 206: 112711.
- [13] Wang L, Yu Z, Wang S, *et al.* Discovery of novel SARS-CoV-2 3CL protease covalent inhibitors using deep learning-based screen [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 244: 114803.
- [14] Heilmann E, Costacurta F, Moghadasi S, *et al.* SARS-CoV-2 3CL^{pro} mutations selected in a VSV-based system confer resistance to nirmatrelvir, ensitrelvir, and GC376 [J]. *Sci Transl Med*, 2023, 15(678): eabq7360.
- [15] Kronenberger T, Laufer S, Pillaiyar T. COVID-19 therapeutics small-molecule drug development targeting SARS-CoV-2 main protease [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28(6): 1-25.
- [16] Ramos-Guzmán C, Andjelkovic M, Zinovjev K, *et al.* The impact of SARS-CoV-2 3CL protease mutations on nirmatrelvir inhibitory efficiency. Computational insights into potential resistance mechanisms [J]. *Chem Sci*, 2023, 14(10): 2686-2697.
- [17] Sydnes, M, Hayashi Y, Sharma V, *et al.* Synthesis of glutamic acid and glutamine peptides possessing a trifluoromethyl ketone group as SARS-CoV 3CL protease inhibitors [J]. *Tetrahedron*, 2006, 62(36): 8601-8609.
- [18] Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, *et al.* Discovery of S-217622, a noncovalent oral SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor clinical candidate for treating COVID-19 [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(9): 6499-6512.
- [19] Iketani S, Mohri H, Culbertson B, *et al.* Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir [J]. *Nature*, 2023, 613(7944): 558-564.
- [20] Ramos-Guzmán C A, Andjelkovic M, Zinovjev K, *et al.* The impact of SARS-CoV-2 3CL protease mutations on nirmatrelvir inhibitory efficiency. Computational insights into potential resistance mechanisms [J]. *Chem Sci*, 2023, 14(10): 2686-2697.
- [21] Wang B, Li H, Cai M, *et al.* Antiviral efficacy of RAY1216 monotherapy and combination therapy with ritonavir in patients with COVID-19: A phase 2, single centre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *eClinicalMedicine*, 2023, 63: 102189.
- [22] Yang X M, Yang Y, Yao B F, *et al.* A first-in-human phase 1 study of simnotrelvir, a 3CL-like protease inhibitor for treatment of COVID-19, in healthy adult subjects [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2023, 191: 106598.
- [23] Huang C, Shuai H, Qiao J, *et al.* A new generation Mpro inhibitor with potent activity against SARS-CoV-2 omicron variants [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 128.
- [24] Zhang H, Zhou J, Chen H, *et al.* Phase I study, and dosing regimen selection for a pivotal COVID-19 trial of GST-HG171 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2024, 68(1): e01115-23.
- [25] Lu H, Zhang G, Mao J, *et al.* Efficacy and safety of GST-HG171 in adult patients with mild to moderate COVID-19: A randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2/3 trial [J]. *eClinicalMedicine*, 2024, 71: 102582.
- [26] Ma C, Sacco M, Hurst B, *et al.* Boceprevir, GC-376, and calpain inhibitors II, XII inhibit SARS-CoV-2 viral replication by targeting the viral main protease [J]. *bioRxiv*, 2020: 2020.04.20.051581.
- [27] Vuong W, Khan M, Fischer C, *et al.* Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4282.
- [28] Dampalla C, Rathnayake A, Perera K, *et al.* Structure-guided design of potent inhibitors of SARS-CoV-2 3CL protease: Structural, biochemical, and cell-based studies [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(24): 17846-17865.
- [29] Resnick S, Iketani S, Hong S, *et al.* Inhibitors of coronavirus 3CL proteases protect cells from protease-mediated cytotoxicity [J]. *J Virol*, 2021, 95(14): e0237420.
- [30] Liu H, Iketani S, Zask A, *et al.* Development of optimized drug-like small molecule inhibitors of the SARS-CoV-2 3CL protease for treatment of COVID-19 [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 1891.
- [31] Li J, Lin C, Zhou X, *et al.* Structural basis of main proteases of coronavirus bound to drug candidate PF-07304814 [J]. *J Mol Biol*, 2022, 434(16): 167706.
- [32] Vries M, Mohamed A, Prescott R, *et al.* A comparative analysis of SARS-CoV-2 antivirals characterizes 3CL^{pro} inhibitor PF-00835231 as a potential new treatment for COVID-19 [J]. *J Virol*, 2021, 95(7): e01819-20.
- [33] Boras B, Jones R, Anson B, *et al.* Preclinical characterization of an intravenous coronavirus 3CL

- protease inhibitor for the potential treatment of COVID19 [J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1): 6055.
- [34] Zhu T, Pawlak S, Toussi S, *et al.* Safety, tolerability, and pharmacokinetics of intravenous doses of PF-07304814, a phosphate prodrug protease inhibitor for the treatment of SARS-CoV-2, in healthy adult participants [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2022, 11(12): 1382-1393.
- [35] Rhodin M, Reyes A, Balakrishnan A, *et al.* The small molecule inhibitor of SARS-CoV-2 3CLpro EDP-235 prevents viral replication and transmission *in vivo* [J]. *Nat Commun*, 2024, 15: 6503.
- [36] Balakrishnan A, Reyes A, Shen R, *et al.* Molecular basis for antiviral action of EDP-235: A potent and selective SARS-CoV-2 3CLpro inhibitor for the treatment of Covid 19 [J]. *FASEB J*, 2022, 36: S1
- [37] Shang W, Dai W, Yao C, *et al.* *In vitro* and *in vivo* evaluation of the main protease inhibitor FB2001 against SARS-CoV-2 [J]. *Antiviral Res*, 2022, 208: 105450.
- [38] Dai W, Zhang B, Jiang X, *et al.* Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease [J]. *Science*, 2020, 368(6497): 1331-1335.
- [39] Konno S, Kobayashi K, Senda M, *et al.* 3CL protease inhibitors with an electrophilic arylketone moiety as anti-SARS-CoV-2 agents [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(4): 2926-2939.
- [40] Hirose Y, Shindo N, Mori M, *et al.* Discovery of Chlorofluoroacetamide-based covalent inhibitors for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 3CL protease [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(20): 13852-13865.
- [41] Dayan E, Wolff K, Riva L, *et al.* Discovery of CMX990: A potent SARS-CoV-2 3CL protease inhibitor bearing a novel warhead [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(4): 2369-2378.
- [42] Xia Z, Sacco M, Hu Y, *et al.* Rational design of hybrid SARS-CoV-2 main protease inhibitors guided by the superimposed cocrystal structures with the peptidomimetic inhibitors GC-376, telaprevir, and boceprevir [J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2021, 4(4): 1408-1421.
- [43] Borroto-Esoda K, Wilfret D, Tong X, *et al.* SARS-CoV-2 viral dynamics in a placebo-controlled phase 2 study of patients infected with the SARS-CoV-2 omicron variant and treated with pomotrelvir [J]. *Microbiol Spectr*, 2024, 12(2): e02980-23.
- [44] Konno S, Kobayashi K, Senda M, *et al.* 3CL Protease inhibitors with an electrophilic arylketone moiety as anti-SARS-CoV-2 agents [J]. *J Med Chem*, 2022, 65(4): 2926-2939.
- [45] Mao L, Shaabani N, Zhang X, *et al.* Olgotrelvir, a dual inhibitor of SARS-CoV-2 M^{pro} and cathepsin L, as a standalone antiviral oral intervention candidate for COVID-19 [J]. *Med*, 2024, 5(1): 42-61.e23.

【责任编辑 解学星】