

· 新冠肺炎防控与诊治 ·

冠状病毒小分子抑制剂研究进展

姚争光^{1,2}, 王志斌², 夏春年¹, 庄春林² (1. 浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014; 2. 海军军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 冠状病毒感染严重威胁着人类健康, 目前尚无特异性治疗药物或疫苗。近年来, 针对 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 这 3 种高致病性冠状病毒的配体 S 蛋白、RdRp、PL^{pro} 和 3CL^{pro} 等靶点, 国内外研究者已经开发了多种小分子抑制剂。综述这些冠状病毒的特点、作用靶点、小分子抑制剂及其构效关系。

[关键词] 冠状病毒; 严重急性呼吸系统综合征冠状病毒; 中东呼吸综合征冠状病毒; 新型冠状病毒; 靶点; 抑制剂

[中图分类号] R373 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2020)05-0385-13

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202005020

Research progress on small molecule inhibitors of coronaviruses

YAO Zhengguang^{1,2}, WANG Zhibin², XIA Chunnian¹, ZHUANG Chunlin² (1. School of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 2. School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] Coronavirus infection seriously threatens human health. There is no specific medication or vaccine so far. In recent years, domestic and foreign researchers have developed a variety of small-molecule inhibitors against the ligand S protein, RdRp, PL^{pro} and 3CL^{pro} of three highly pathogenic coronavirus, SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2. This article reviews the characteristics of these coronaviruses, action targets, small molecule inhibitors, and structure-activity relationships.

[Key words] coronavirus; SARS-CoV; MERS-CoV; SARS-CoV-2; targets; inhibitors

冠状病毒 (coronavirus, CoVs), 在电子显微镜下呈“冠状”或冠状形态, 因而命名为冠状病毒, 可感染人类并容易引起急/慢性呼吸道系统疾病^[1]。冠状病毒科分为 α 、 β 、 γ 和 δ 4 个属^[2], 已知感染人的冠状病毒共有 7 种, 分别是 HCoV-229E、HCoV-OC43、HCoV-NL63、HCoV-HKU1、SARS-CoV、MERS-CoV 和 SARS-CoV-2, 其中, 前 4 种病毒致病性较低, 一般仅引起类似普通感冒的轻度感染, 后 3 种对人类健康产生严重威胁, 具有较高的致死率, 分别是 2003 年出现的冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV) 感染的严重急性呼吸道综合征、2012 年在中东地区出现高致病性冠状病毒 (Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV) 感染的中东呼吸综合征和 2019 年出现的一种新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 感染引起的肺炎 (Corona Virus Disease

2019, COVID-19)^[3]。

1 冠状病毒及其药物靶点

冠状病毒是一种包膜病毒, 具有直径为 120~160 nm 的圆形或椭圆形病毒体^[4]。冠状病毒粒子外包裹着脂肪膜, 膜表面有 3 种糖蛋白, 分别是刺突糖蛋白 (spike glycoprotein, S 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白) 和小膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)。其中, S 蛋白是在病毒体表面上形成配体的 I 型糖蛋白, 介导与宿主受体的连接, 由 S1 和 S2 两个亚基组成; M 蛋白是一种前蛋白, 主要参与病毒的装配过程; E 蛋白是一种高度疏水的蛋白, 可促进病毒的组装和释放。病毒的基因组 RNA 与核衣壳蛋白 (nucleocapsid, N 蛋白) 在病毒膜内复合形成螺旋衣壳 (图 1A)。

冠状病毒 RNA 基因组是不分段的单股正链 RNA, 大小为 26~32 kb, 是 RNA 病毒中基因组最大的病毒^[5]。冠状病毒的基因顺序一致, 为 5'-复制酶-S-E-M-N-3', 其中, RNA 5'端为被封端, 具有甲基化的帽状结构, 3'端被聚腺苷酸化, 具有 poly(A) 尾巴, 具有传染性。从 5'端开始, 基因组长度的 2/3 (长度: 20~22 kb) 区域由两个重叠的开放阅读框

[基金项目] 中国科协青年人才托举工程(2017QNRC061)

[作者简介] 姚争光, 硕士研究生, Email: yaozhengguangyes@163.com

[通讯作者] 庄春林, 副教授, 研究方向: 药物设计, Tel: (021) 81871258, Email: zclnathan@163.com

(open reading frame)1a 和 1b 组成, 共同起着病毒 RNA 聚合酶 (Pol) 的作用, 编码翻译成两个多肽, pp1a 和 pp1ab^[6]。这些多聚蛋白酶包括: 类木瓜样蛋白酶 (papain-like protease, PL^{pro})、3C 胰凝乳蛋白酶样蛋白酶 (3C chymotrypsin like protease, 3CL^{pro}, 也称为主蛋白酶, M^{pro})、RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 和解旋酶 (helcase, Hel) 等^[7]。对于所有冠状病毒, 结构蛋白编码在 3' 端, 占基因组的 1/3, 按 S-E-M-N 顺序排列 (图 1B)。

冠状病毒通过 S 蛋白附着在特定的细胞受体上, S1 亚基和同源受体之间的特异性相互作用会触发 S2 亚基的构象变化, 导致病毒包膜和细胞膜融合, 并释放核衣壳进入细胞质; 病毒在组织蛋白酶介导下与细胞表面受体结合以内体途径或细胞

表面非内体途径进入宿主细胞, 低 pH 和 pH 依赖性的半胱氨酸蛋白酶、组织蛋白酶可以促进冠状病毒通过内体途径进入宿主细胞^[8]。病毒进入细胞后, 正链 RNA 翻译产生负链 RNA 聚合酶前体蛋白, 通过蛋白质水解过程产生 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp); 在 RNA 聚合酶的作用下, 生成全长的反义负链模板。从负链亚基因组模板中合成亚基因组 mRNAs; 亚基因组 mRNAs 的翻译会产生病毒结构蛋白, 在内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 中进行病毒膜蛋白装配, 并形成小泡运出。在内质网高尔基体中间体 (ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC) 中被衣壳蛋白包裹的正链 RNA 与膜蛋白识别, 小泡内卷, 包住 RNA。病毒通过高尔基体 (golgi apparatus, GA) 释放囊泡, 囊泡与质膜融合释放病毒, 病毒继续感染其他细胞 (图 2)。

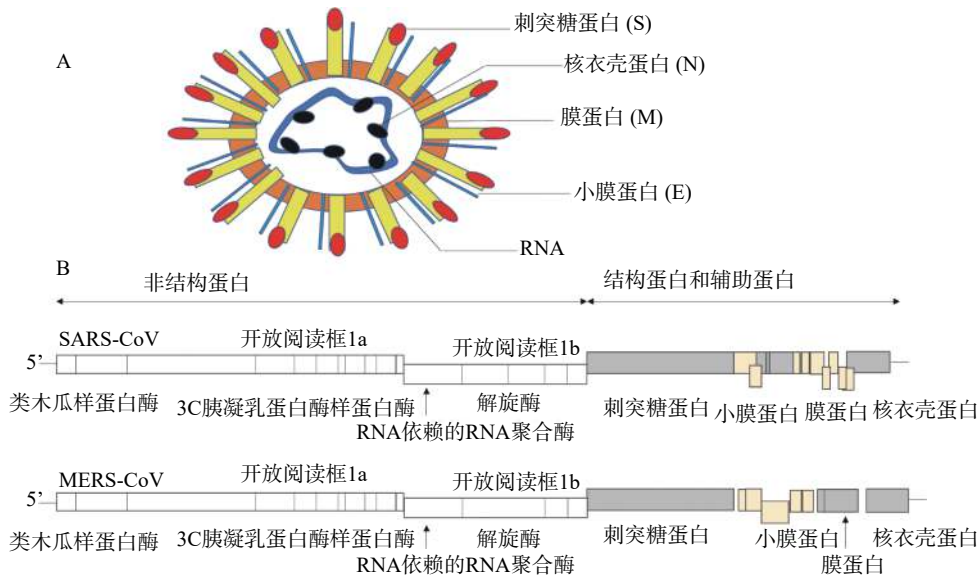


图 1 冠状病毒的结构 (A) 和 SARS-CoV、MERS-CoV 的基因结构 (B)

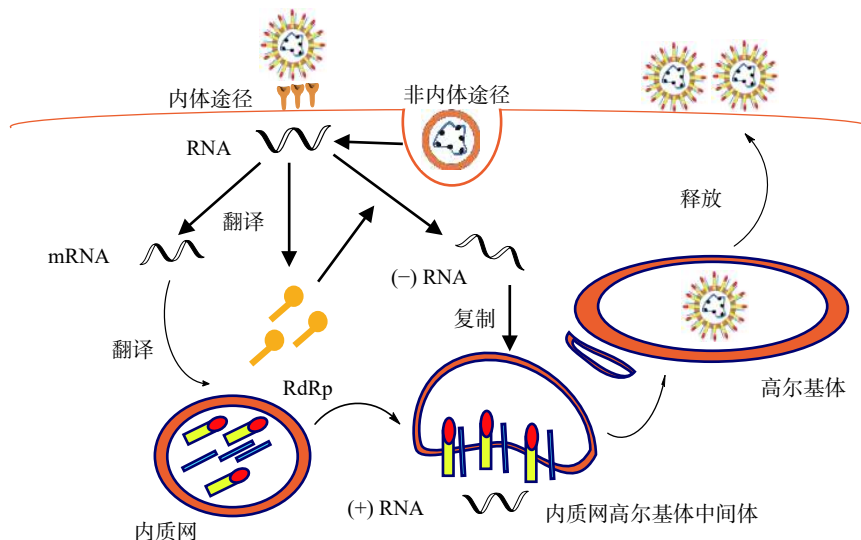


图 2 冠状病毒的生命周期

冠状病毒 RNA 在复制过程中,因纠正其错误复制的酶活性较低,很容易出现病毒错误复制,导致病毒变异株的出现。

冠状病毒的生命周期是一个复杂、连续、多步的过程,病毒配体 S 蛋白、与病毒转录复制相关的 RdRp、PL^{pro} 和 3CL^{pro} 等多种蛋白质和酶发挥关键作用,是治疗冠状病毒感染疾病的关键药物靶标,以它们为靶点,国内外研究者发现了一系列的小分子抑制剂^[9-22],现分述如下。

2 冠状病毒小分子抑制剂

2.1 SARS-CoV 小分子抑制剂

2.1.1 肽类小分子抑制剂

2003年, Hilgenfeld 等报道了人冠状病毒 (229E 株)3CL^{pro}(HCoV 229E 3CL^{pro}) 和猪传染性胃肠炎病毒 (transmissible gastroenteritis virus, TGEV) 3CL^{pro} 的晶体结构,为抗冠状病毒药物研究提供了重要的结构生物学基础。Hilgenfeld 等以此同源模建了 SARS-CoV 3CL^{pro} 的三维结构,通过分子对接发现多肽类似物 **1**(AG7088, rupintrivir, 图 3) 可能对 SARS-CoV 3CL^{pro} 具有良好的抑制活性^[11]。该化合物原是一种鼻病毒 3C^{pro} 抑制剂,用于治疗普通感冒,但口服生物利用度低,需鼻腔给药,临床研究已终止^[12]。

2005年, Mesecar 等确定 AG7088 与 SARS 3CL^{pro} 结合的晶体结构,为后续结构优化和构效关系研究提供了重要的结构生物学基础。根据 AG7088 与 SARS-3CL^{pro} 的结构模式, AG7088 可划分为 P1~P4 四个区域。以此为模板对 P2 位点进行改造,合成了一系列多肽类小分子抑制剂。用荧光共振能量转移法 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 酶水平活性研究表明,含有 2-甲基丙烯基基团的化合物 **2**($K_{inact}=0.045/\text{min}$, $t_{1/2}=15 \text{ min}$, 图 3) 活性优于含有苯基基团的化合物 **3**($K_{inact}=0.014/\text{min}$, $t_{1/2}=49 \text{ min}$), 提示 P2 位点对应 SARS 3CL^{pro} 的空腔可以容纳较小侧链残基^[13]。以此为模板对 P4 位点再进行改造,又合成了一系列多肽类小分子抑制剂。化合物 **4** 的 IC₅₀ 值为 200 μmol/L, 但抗病毒活性丧失; 随后,以化合物 **4**(图 3) 为先导,在 P4 位点优化获得的化合物 **5**[IC₅₀=10 μmol/L, IC₅₀(antiviral)=100 μmol/L] 比化合物 **4**[IC₅₀=200 μmol/L, IC₅₀(antiviral): 未测] 对 SARS 3CL^{pro} 抑制活性和抗病毒活性更好。该化合物 P4 位点从原有的 5-甲基异恶唑-3-基团变成 1-[(叔丁氧羰基)氨基]-2-羟基乙烷-1-基团,易与 SARS 3CL^{pro} 的谷氨酸 (166) 残基形成更多的氢键相互作用,有利于提高活性^[14]。

2004年, Vederas 等合成了一系列在 α 位带有邻苯二甲酰肼基团的酮-谷氨酰胺类似物,并测试

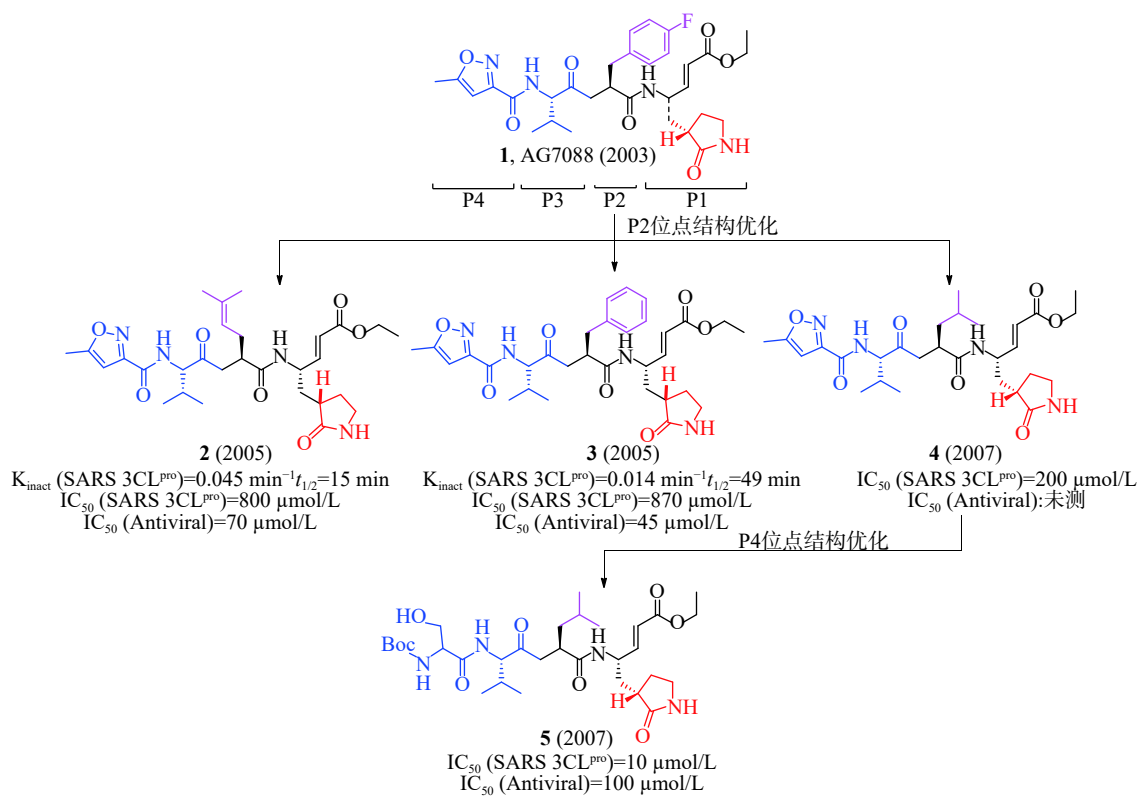


图 3 化合物 1-5 的化学结构和优化设计

其抑制抗 SARS-CoV 3CL^{pro} 的活性。在酶水平系统构效关系表明: 将三肽 (Ac-Val-Thr-Leu) 附着在谷氨酰胺上可产生更好的抑制剂 **6** ($IC_{50}=0.60 \mu\text{mol/L}$, 图 4)^[15]。2005 年, Wong 等以 **1** 为先导化合物, 对其 P1~P4 位点优化设计, 合成了一系列衍生物, 其中, 化合物 **7** (图 4) 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的 IC_{50} 值为 $1 \mu\text{mol/L}$ 、 K_i (inhibition constant) 值为 $0.52 \mu\text{mol/L}$, 在感染了 SARS-CoV 的 Vero E6 细胞中测得的 EC_{50} 值为 $0.11 \mu\text{mol/L}$ 和 CC_{50} 值 $>200 \mu\text{mol/L}$, 选择性指数 (SI, selectivity index, CC_{50}/EC_{50}) >1818 ^[16]。

2006 年, Hsu 等发现了化合物 **8** ($K_i=53 \text{ nmol/L}$, 图 4), 在 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞 EC_{50} 值为 $0.6 \mu\text{mol/L}$ 。通过解析化合物 **8** 与 SARS 3CL^{pro} 结合的晶体结构, 化合物 **8** P1 位点醛基的羰基基团与 SARS 3CL^{pro} 的 Cys145 共价结合形成 C-S 共价键、与 SARS 3CL^{pro} 的 Gly143 和 Cys145 形成两个 N-H 氢键、P1 位点五元环内酰胺基团与 SARS 3CL^{pro} 的 His163、Phe140、Glu166 形成 3 个氢键, P2 和 P3 位点的 N-H 键分别与 Gln189 和 Glu166 的羰基氧原子形成氢键、P3 位点的羰基氧原子与 SARS 3CL^{pro} 的 Glu166 的 N-H 键形成氢键, 这些

共价键作用和氢键作用使化合物 **8** 和 SARS 3CL^{pro} 紧密结合^[17]。

此外, 国内外还报道了一系列多肽或多肽类似物作为 SARS-CoV 3CL^{pro} 抑制剂。2008 年, Rao 等解析了 SARS-CoV 3CL^{pro} 的突变体 H41A 晶体结构, 发现了化合物 **9** ($K_i=3.3 \mu\text{mol/L}$, 图 5) 在酶水平上对 SARS-CoV 3CL^{pro} 具有抑制作用, 可以作为 SARS-CoV 3CL^{pro} 小分子抑制剂^[18]。2013 年, Hua 等通过基于片段的药物设计策略设计合成了一系列 3CL^{pro} 抑制剂, 当 P1 位置为谷氨酰胺, P2 位置为亮氨酸, P3 位置为萘丙氨酸残基时, 化合物 **10** (图 5) 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的 IC_{50} 值为 $0.23 \mu\text{mol/L}$ ^[19]。2015 年, Simmons 等筛选含有 2100 个化合物库, 发现了化合物 **11** (k11777, 图 5) 在酶水平 ($IC_{50}=0.68 \text{ nmol/L}$) 对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的活性最好, 对其优化将哌嗪环上的甲基换成乙基时, 在酶水平化合物 **12** (图 5) 的 IC_{50} 值为 0.04 nmol/L ^[20]。2011 年, Akaji 等报道了丝氨酸衍生物 **13** (图 5) 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的抑制活性较好, IC_{50} 值为 $30 \mu\text{mol/L}$ ^[21], 进一步优化获得的苯异丝氨酸衍生物 **14** ($IC_{50}=43 \mu\text{mol/L}$, 图 5) 比化合物 **13** ($IC_{50}=30 \mu\text{mol/L}$) 的活性低^[22]。

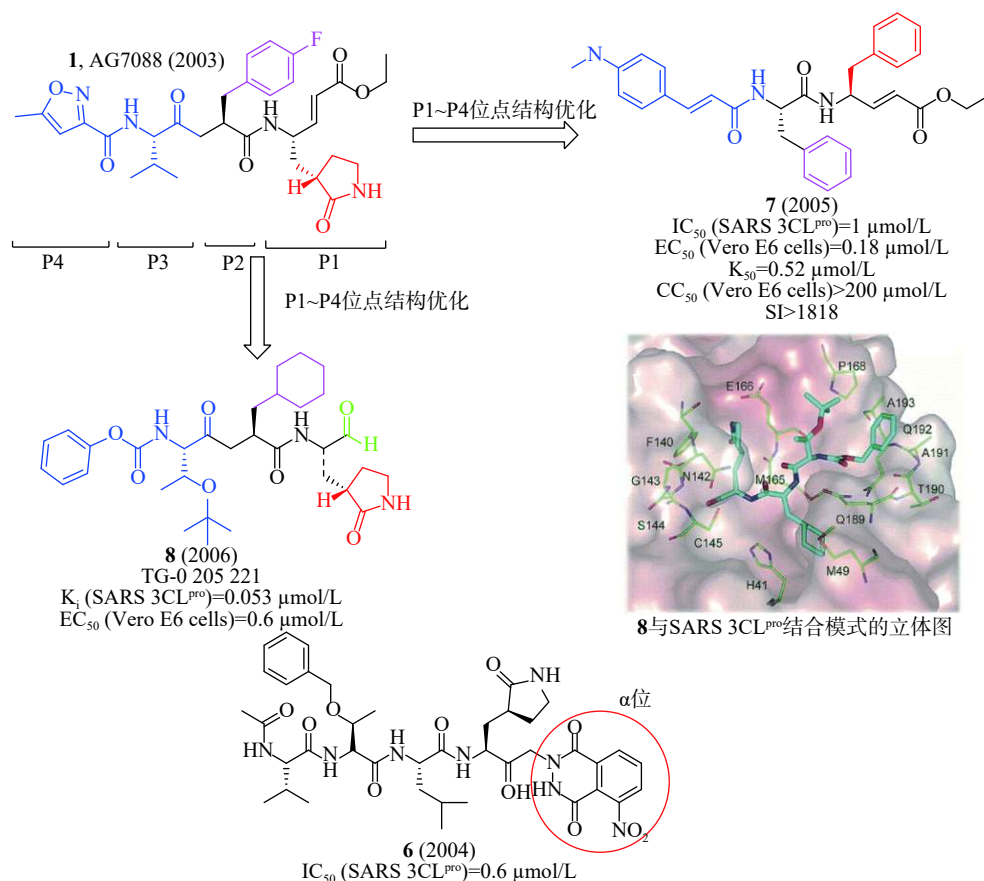


图 4 化合物 6~8 的化学结构和化合物 8 的结合模式图

2.1.2 非肽类小分子抑制剂

(1) 天然产物

2006年,蒋华良等首次报道一种天然化合物**15**(槲皮素-3- β -半乳糖苷,图6)具有SARS-CoV 3CL^{pro}抑制活性(IC_{50} =42.79 μ mol/L)。在分子对接模拟的基础上,由**15**为模板设计合成了8种衍生物,构效关系研究发现:①去除了槲皮素部分的7-羟基,活性降低;7-羟基上引入一个大的糖基取代基对活性影响不大;②糖基乙酰化使得活性丧失;③用其他糖取代半乳糖不影响活性。其中,化合物**16**(图6)活性较好, IC_{50} 为24.14 μ mol/L^[23]。2012年,Jeong等运用FRET法研究了64种天然化合物对SARS解旋酶的抑制作用。化合物**17**(杨梅素,图6)通过影响ATP酶活性而非解旋酶活性,间接抑制了SARS-CoV解旋酶蛋白的表达,在酶水平对SARS-CoV病毒活性 IC_{50} 值为2.71 μ mol/L^[24]。2014年,Park等发现补骨脂种子的乙醇提取物具有抗SARS-CoV PL^{pro}活性,在酶水平 IC_{50} 值为15 μ mol/L。进一步分离获得6种芳香族化合物,它们均以剂量依赖性方式抑制PL^{pro},其中化合物**18**活性最佳(图6)在酶水平对SARS-CoV PL^{pro}的 IC_{50} 为4.2 μ mol/L^[25]。2015年,Ryu等发现含有羟

基的查尔酮化合物**19**(图6)对3CL^{pro}和PL^{pro}的抑制 IC_{50} 值分别为11.4和1.2 μ mol/L^[26]。2017年, Lee等从布鲁氏假单胞菌提取的多酚类化合物对3CL^{pro}和PL^{pro}具有抑制活性,多酚类化合物对PL^{pro}的活性强于3CL^{pro};其中,化合物**20**(图6)对PL^{pro}抑制活性最佳, IC_{50} 值为3.7 μ mol/L^[27]。

(2) 三氮唑类

2016年,Wong等采用微滴定板组合反应策略修饰先导化合物,从中发现一类稳定的苯并三唑酯SARS-CoV 3CL^{pro}抑制剂,动力学和质谱分析表明,该类化合物通过酰化修饰3CL^{pro}的活性位点Cys145发挥作用,其中,化合物**21**(图7)在酶水平活性最佳, K_i 为7.5 nmol/L^[28]。此前,Stauffer等筛选NIH分子探针库(Molecular Libraries Probe Production Centers Network, MLPCN)发现了类似结构的SARS-CoV 3CL^{pro}抑制剂,化合物**22**(图7)在酶水平对SARS-CoV 3CL^{pro}的 IC_{50} 为4.1 μ mol/L^[29]。

(3) 咪唑类

2010年,Liang等设计一系列吡啶酮类化合物作为SARS-CoV 3CL^{pro}抑制剂,其中,化合物**23**(图8)在酶水平对SARS-CoV 3CL^{pro}表现出了较强的抑制作用, IC_{50} 为5.5 μ mol/L^[30]。2016年,

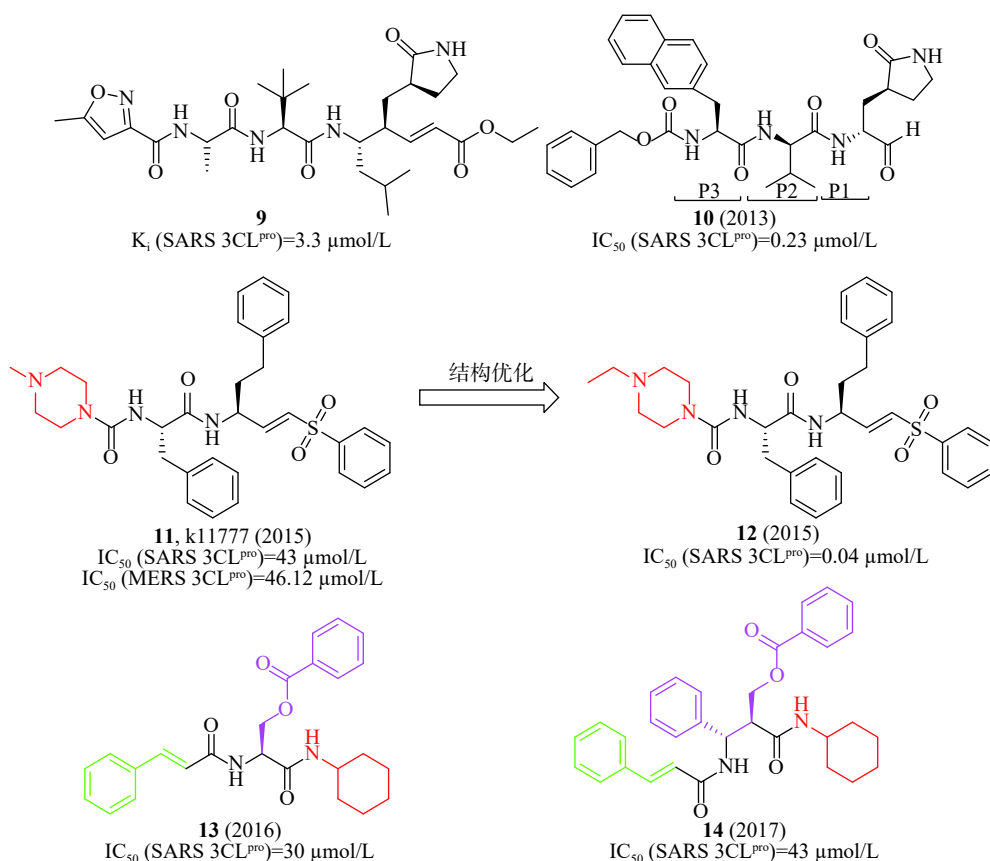


图5 化合物9~14的化学结构

Liang 等通过“老药新用”的方法筛选神经氨酸酶 (neuraminidase) 对 SARS-CoV 的作用, 化合物 24(图 8) 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的 IC₅₀ 为

16.4 μmol/L^[31]。

(4) 萘环类

2014年, Mesecar 等对多种化学文库的高通量

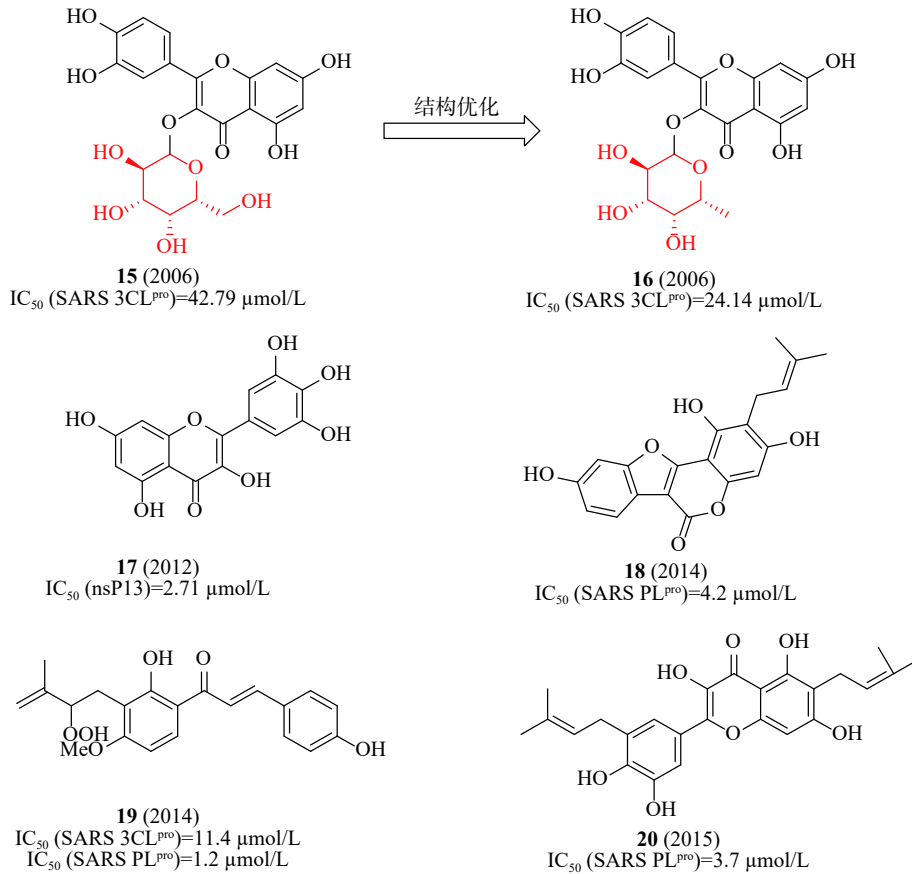


图 6 化合物 15~20 的化学结构

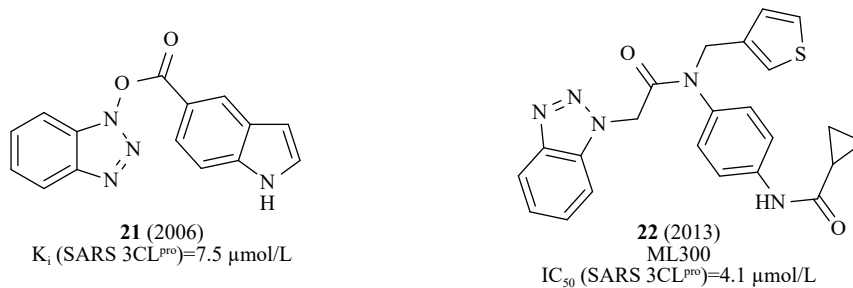


图 7 化合物 21~22 的化学结构

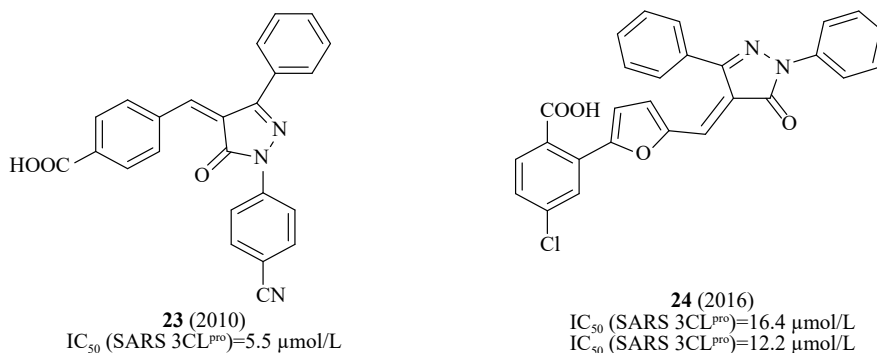


图 8 化合物 23~24 的化学结构

筛选, 确定化合物 **25** 在酶水平具有 SARS-CoV PL^{pro} 抑制活性 IC₅₀ 为 8.7 μmol/L。以此为先导化合物, 开展结构优化和构效关系研究, 发现化合物 **26**(图 9) 中引入乙胺基基团与 SARS-CoV PL^{pro} 的 Gln270、Tyr269 形成氢键, 酶水平提高了 20 倍 (IC₅₀=0.46 μmol/L), 对 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞的抗病毒活性为 EC₅₀=6 μmol/L^[32]。2010 年, Mesecar 等通过对多种化学文库进行高通量筛选, 鉴定了一种新的先导化合物 **27**(图 9), 在酶水平对 SARS-CoV PL^{pro} 抑制活性 IC₅₀ 为 59.2 μmol/L, 在 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞中无抗病毒活性。以 **27** 为先导化合物合成一系列类似物和进行构效关系研究, 将甲氧基替换为乙酰胺基优化得到化合物 **28**(图 9), **28** 中的乙酰胺基基团与 SARS-CoV PL^{pro} 的 Tyr269 形成氢键, **28** 与 SARS-CoV PL^{pro} 结

合更加紧密, 在酶水平 (IC₅₀=0.39 μmol/L) 和抑制 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞 (EC₅₀=8.3 μmol/L) 方面同样有效^[33]。2006 年, 来鲁华等以化合物 **29**(图 9) 为模板, 集中改变 N-1 和 C-5 位置取代基合成了一系列靛红类衍生物, 研究了其构效关系。当 N-1 位置为 β-萘亚甲基, C-5 位置为甲酰胺时, 化合物 **30** 在酶水平 (图 9) 表现出明显的抑制作用, IC₅₀ 为 0.37 μmol/L^[34]。

(5) 喹啉类

2004 年, Keyaerts 等检测了抗疟药氯喹对感染 SARS-CoV 的 Vero E6 细胞的抗病毒潜力。结果表明, 化合物 **31**(图 10) 的 IC₅₀ 值为 8.8 μmol/L^[35]。2005 年, Nichol 等发现化合物 **31**(氯喹) 对 SARS-CoV (ED₅₀ 为 4.4 μmol/L) 发挥抗病毒作用, 提示其可能具有治疗方面的优势^[36], 2014 年, Wilde 等检

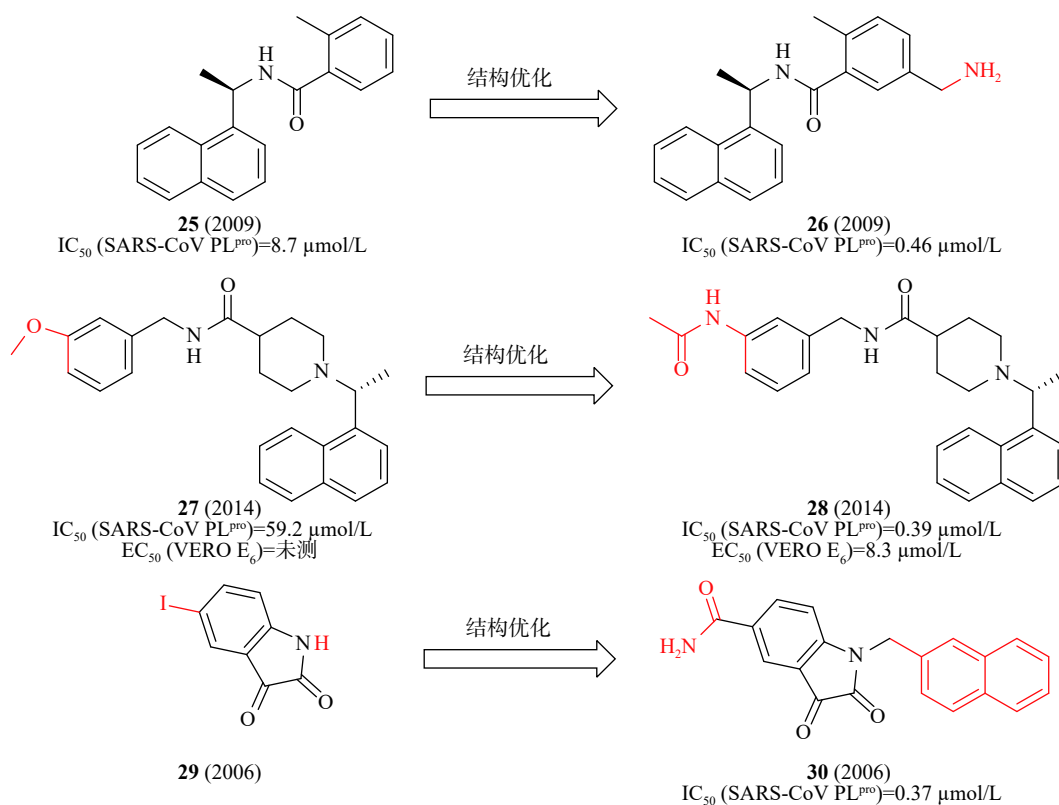


图 9 化合物 25-30 的化学结构

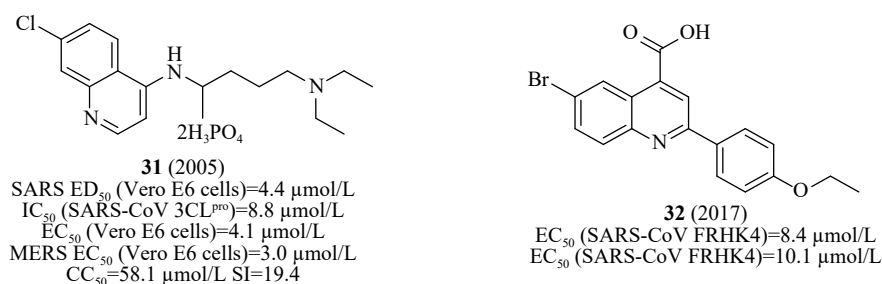


图 10 化合物 31-32 的化学结构

测了氯喹对感染 SARS-CoV 的 Vero E6 细胞的抗病毒活性, EC_{50} 值为 $4.1 \mu\text{mol/L}$, $CC_{50} > 128 \mu\text{mol/L}$, $SI > 31$ ^[37]。2017 年, Kao 等对 50240 种化合物进行筛选 SARS-CoV 小分子抑制剂, 鉴定出喹啉类化合物 **32**(图 10), 其在感染 SARS-CoV 的 FRHK4 细胞中测得的 EC_{50} 值为 $8.4 \mu\text{mol/L}$, 在有效浓度下未观察到明显的细胞毒性^[38]。

(6) 吡啶类

2008 年, James 等利用高通量筛选发现了化合物 **33**(MAC-5576, 图 11) 对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的酶活性 IC_{50} 值为 $0.5 \mu\text{mol/L}$; 以 **33** 为先导化合物, 基于分子对接技术设计合成了一系列衍生物, 其中, 含有氯苯取代的化合物 **34**(图 11) 对 SARS-CoV 3CL^{pro} 酶抑制活性提高了 10 倍 (IC_{50} 值为 $0.06 \mu\text{mol/L}$), 表明 SARS-CoV 3CL^{pro} 与咪唑一侧结合口袋具有较大疏水空腔, 可以容纳苯环等大基团, 为进一步结构优化提供了重要依据^[39]。2008 年, Vederas 等制备一系列芳基亚甲基酮类似物, 用 FRET 测试 SARS 3CL^{pro} 抑制剂的酶活性。构效活性和 **35**(图 11) 与 SARS 3CL^{pro} 结合模型研究表明: 3 个芳香环对 SARS-CoV 3CL^{pro} 具有良好抑制作用。该类化合物中 **35**(图 10) 对 IC_{50} 的抑制作用值为 $13 \mu\text{mol/L}$ ^[40]。2012 年, Stauffer 等利用 NIH 分子文库进行高通量筛选 SARS-CoV 3CL^{pro} 抑制剂, 得到探针化合物 **36**(图 11), 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的 IC_{50} 值为 $1.5 \mu\text{mol/L}$, 对 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞抗病毒活性 EC_{50} 值为 $12.9 \mu\text{mol/L}$ 。此外, 化合物 **36** 在中性 PBS 缓冲溶液溶解性较好 ($95 \mu\text{g/ml}$)^[41]。2008 年, Mesecar 等设计

合成一系列 5-氯吡啶酯衍生物, 用 FRET 检测抗 SARS-CoV 3CL^{pro} 的活性。构效关系表明, 咪唑环第 4 位具有 5-氯吡啶基酯的抑制剂 **37**(图 11) 是最有效的抑制剂, 在酶水平对 SARS-CoV 3CL^{pro} 的 IC_{50} 值为 30 nmol/L , 在感染 SARS-CoV 的 Vero E6 细胞中测得 EC_{50} 值为 $6.9 \mu\text{mol/L}$ ^[42]。

(7) 其他类

此外, 通过虚拟筛选体外酶活性测试还发现一系列 SARS-CoV 3CL^{pro} 小分子抑制剂, 如血清素拮抗剂 **38**(图 12)($IC_{50} = 5 \mu\text{mol/L}$)^[43]、异染色质衍生物 **39**(图 12)($IC_{50} = 0.95 \mu\text{mol/L}$)^[44]、砒类化合物 **40**(图 12)($IC_{50} = 0.3 \mu\text{mol/L}$)^[45]、卤甲基酮抑制剂 **41**(图 12)($K_i = 0.31 \mu\text{mol/L}$)^[46]、不对称的芳香族二硫醚化合物 **42**(图 12)($IC_{50} = 0.516 \mu\text{mol/L}$)^[47]、非天然的五元环杂环碳环核苷 1,2,4-三唑类似物 **43**(图 12) 对 SARS-CoV 感染的 Vero E6 细胞 EC_{50} 为 $21 \mu\text{mol/L}$ ^[48]。2018 年, Denison 等发现核苷类似物 **44**(图 12)(GS-5734, remdesivir) 在体外和 SARS-CoV 小鼠模型中能有效抑制人和人畜共患的冠状病毒。在感染 SARS-CoV 的人气道上皮细胞 (human airway epithelial cells, HAE) 原代培养物中评估 **44** 的抗病毒活性, 显示 **44** 的 EC_{50} 值为 $0.069 \mu\text{mol/L}$ ^[49], 通过定量逆转录聚合酶链反应发现, 随着 **44** 剂量的增加, SARS-CoV 感染的细胞内病毒基因组和亚基因组 RNA 数量均呈剂量依赖性减少, 与病毒滴度降低一致^[50]。

2.2 MERS-CoV 的小分子抑制剂

2015 年, Radtke 等设计一系列双柔性核苷类似物并测试其活性, 其中, 化合物 **45**(图 13) 在感染

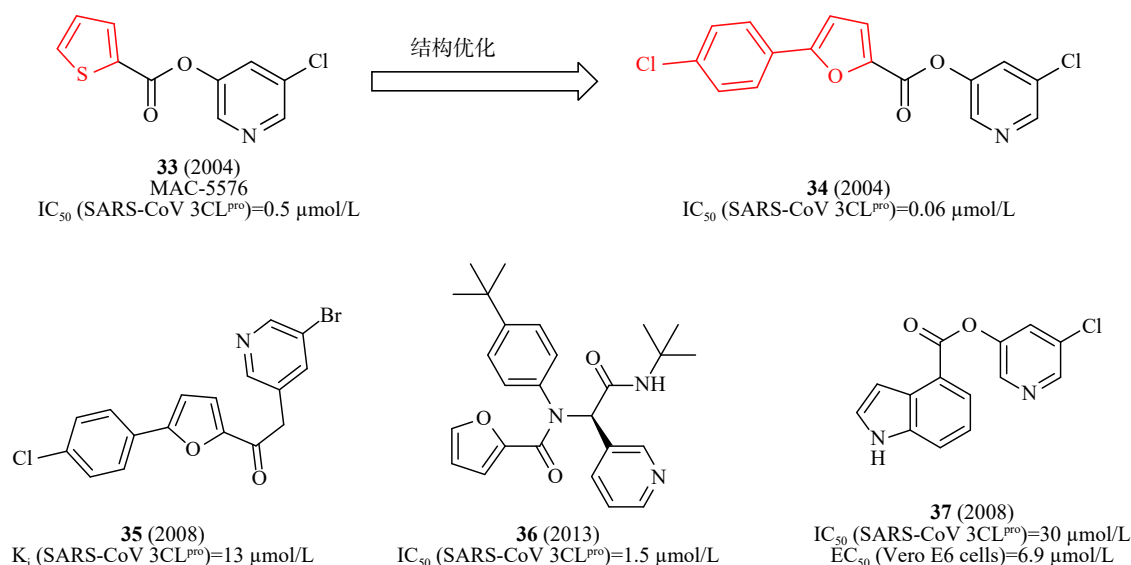


图 11 化合物 33~37 的化学结构

MERS-CoV 的 Vero E6 细胞中显示抗病毒活性 EC_{50} 值为 $23 \mu\text{mol/L}$ ^[51]。2017 年, Grünweller 等用双重荧光素酶测定法和病毒感染的原代细胞分析化合物 **46**(图 13) 对病毒翻译的影响, 确定感染 MERS-CoV 的 MRC-5 细胞的 EC_{50} 值为 $1.3 \mu\text{mol/L}$; 在 MERS-CoV 感染的人外周血单核原代细胞 (PBMC) 证实了化合物 **46** 的抗病毒活性^[52]。2019 年, Johnson 等基于 SPR 和 FRET 技术, 从含有 30000 种化合物的 3 种不同化合物库 (Prestwick, Maybridge, Chembridge) 中筛选出化合物 **47**(图 13), 对 MERS-CoV PL^{pro} 酶具有明显抑制活性, IC_{50} 值为 $20.0 \mu\text{mol/L}$; 为了进一步改善其抑制活性, 从 352 个小片段库得到一个片段 **48**(ZT626+**47**), **48** 是由 **47** 和 ZT626 之间形成氢键作用结合在一起 (图 13), IC_{50} 值为 $6.6 \mu\text{mol/L}$, 比 **47** 提高了 2 倍, 后续将通过分子对接研究 **47** 和 ZT626 的具体结合模式^[53]。

前面提到的多个 SARS-CoV 3CL^{pro} 对 MERS-CoV 也具有明显的抑制活性。例如, 2014 年 De Wilde

等对 348 个药物进行了抗 MERS-CoV 活性的筛选。研究表明化合物 **31**(氯喹, 图 10) 在体外感染 MERS-CoV 的 Vero E6 细胞中测得 EC_{50} 值为 $3.0 \mu\text{mol/L}$, CC_{50} 值为 $58.1 \mu\text{mol/L}$, SI 值为 19.4 ^[37]。2015 年, Simmons 等筛选含有 2100 个化合物的库, 发现化合物 **11**(图 5) 在酶水平上对 MERS-CoV 3CL^{pro} 的活性最好, IC_{50} 值为 $46.12 \mu\text{mol/L}$ ^[20]。2016 年, Liang 等通过老药新用的方法筛选 NA 抑制剂对 SARS-CoV 的作用, 发现该类化合物中 **24** 在酶水平 (图 8) 对 MERS-CoV 3CL^{pro} IC_{50} 为 $12.2 \mu\text{mol/L}$ ^[31]。2017 年, Kao 等对 50240 种化合物进行筛选 MERS-CoV 小分子抑制剂, 鉴定出化合物 **32**(图 10), 其在感染 MERS-CoV 的 FRHK4 细胞中测得的 EC_{50} 值为 $10.1 \mu\text{mol/L}$ ^[38]。2018 年, Denison 等发现核苷类似物 **44**(图 13)(GS-5734, remdesivir), 研究人员选择在人气道上皮细胞 (HAE) 原代培养物中评估 **44** 对 MERS-CoV 的抗病毒活性, 显示 **44** 对 MERS-CoV 的 EC_{50} 值为 $0.074 \mu\text{mol/L}$ ^[49]。

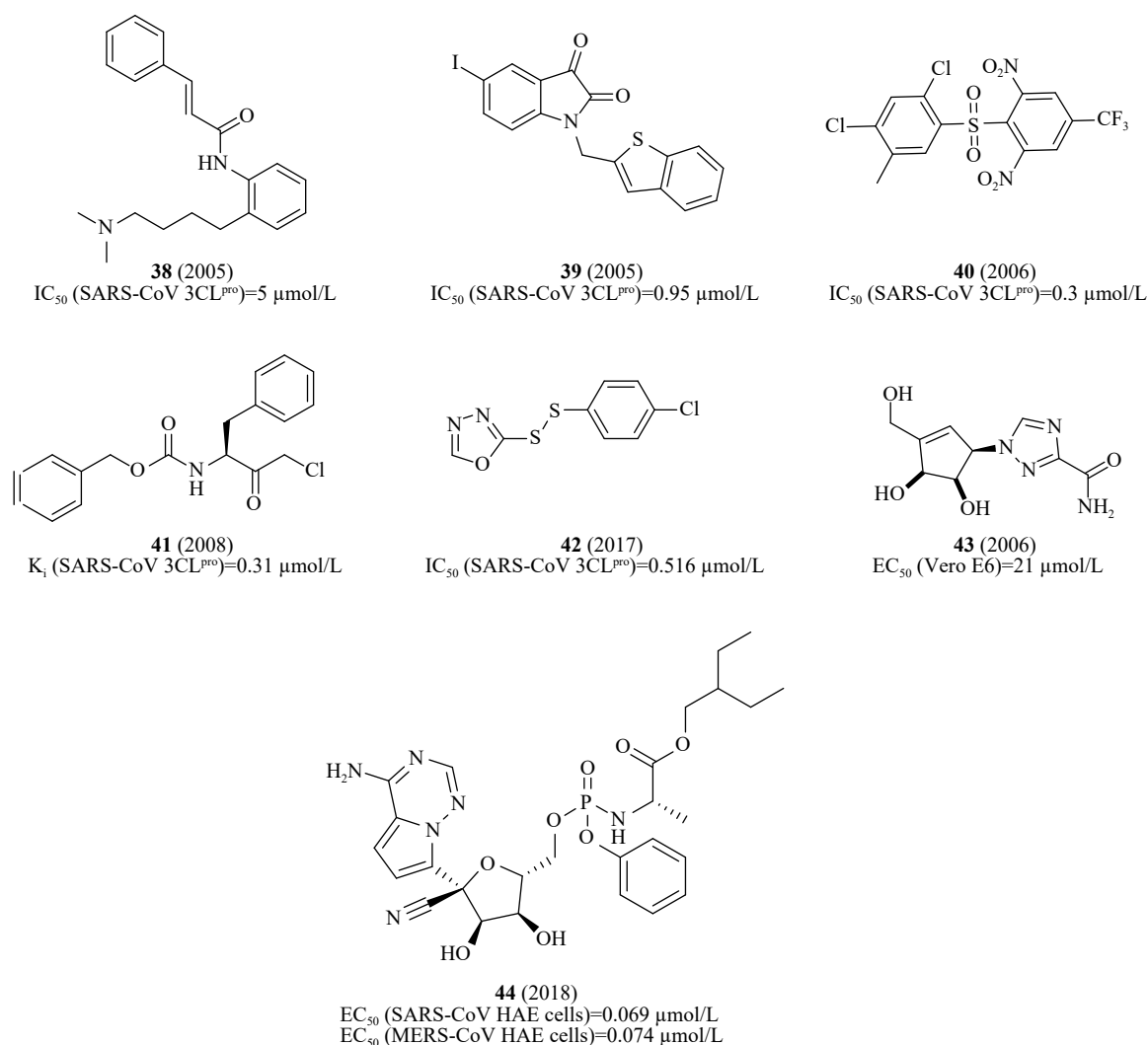


图 12 化合物 38-44 的化学结构

2.3 SARS-CoV-2 的小分子抑制剂

在当前 SARS-CoV-2 疫情下,运用“老药新用,一药多用”策略开展科技攻关研发可治疗 COVID-

19 的药物,可大大缩短药物研发时间,进而可以解决新药研发周期长、难以满足当前疫情控制急需用药的难题。多个药物或候选药物 (图 14) 被发现具

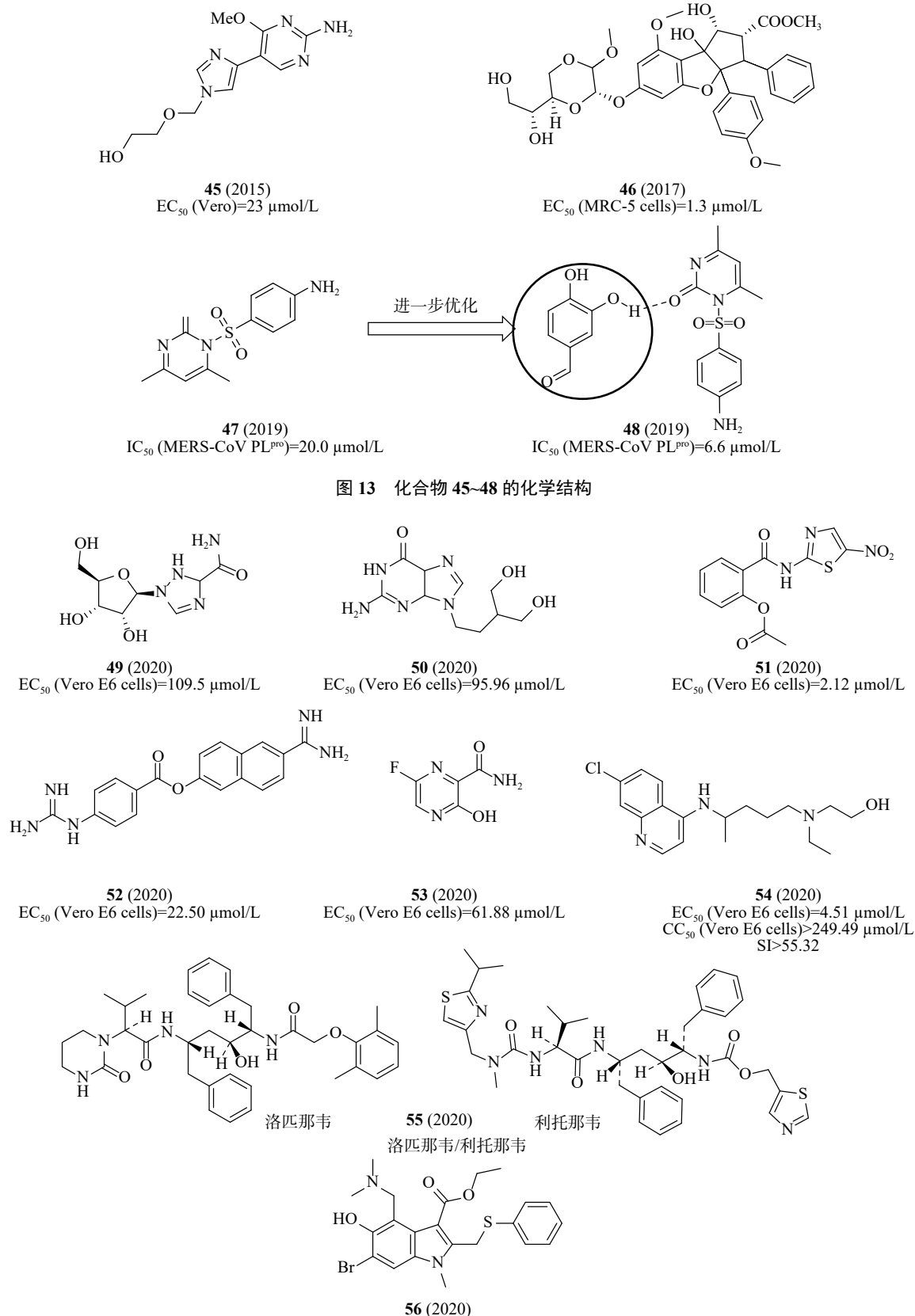


图 13 化合物 45~48 的化学结构

图 14 化合物 49~56 的化学结构

有显著的抗 SARS-CoV-2 病毒效能, 包括化合物 **49** (利巴韦林, $EC_{50}=109.50 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>400 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>3.65$)、化合物 **50** (喷昔洛韦, $EC_{50}=95.96 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>400 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>4.17$)、化合物 **51** (硝唑尼特, $EC_{50}=2.12 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>35.53 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>16.76$)、化合物 **52** (蔡莫司他, $EC_{50}=22.50 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>100 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>4.44$)、化合物 **31** (图 10) (氯喹, $EC_{50}=2.71 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>211.70 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>100.81$)、化合物 **44** (图 12) (瑞德西韦, GS-5734)、化合物 **53** (法匹拉韦, T-705, $EC_{50}=61.88 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>400 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>6.46$)、化合物 **54** (羟氯喹, $EC_{50}=4.51 \mu\text{mol/L}$ 、 $CC_{50}>249.49 \mu\text{mol/L}$ 、 $SI>55.32$) 等^[54-55]。

Gao 等报道了一项多中心临床试验研究氯喹治疗 100 多例 SARS-CoV-2 感染的肺炎患者的效果。结果表明, 化合物 **31** 在抑制肺炎恶化、改善肺部影像及缩短病程方面均优于对照组, 且上述患者未见严重的不良反应, 且毒性可以接受^[56]。

Wang 等在体外用非洲绿猴肾 Vero E6 细胞 (ATCC-1586) 测试羟氯喹的细胞毒性, 结果显示, 化合物 **54** 在体外可以有效抑制 SARS-CoV-2 感染, **54** 是一种已知安全有效的抗炎药, 预测该药物对 COVID-19 患者具有良好的抗炎潜力, 这种可能性有待临床试验的证实^[56]。Patel 等 2020 年 5 月 22 日在《柳叶刀》上发表论文指出: COVID-19 住院患者单独使用氯喹或羟氯喹或与大环内酯类抗生素联用治疗新冠肺炎患者时, 并未观察到益处; 且有可能造成患者生存率降低和室性心律失常的频率增加^[57], 世卫组织随即宣布暂停相关临床试验, 而该文数据的真实性被广泛质疑且未提供原始数据, 该文章已被撤稿。世卫组织宣布重启相关临床实验。

化合物 **44** 作用于病毒进入细胞的后期阶段, 与核苷类药物的作用机制一致。对感染 Vero E6 细胞的 $EC_{90}=1.76 \mu\text{mol/L}$, 具有较低不良反应, 由同情用药过渡到随机双盲的严格 III 期临床试验 (NCT04257656), 治疗轻、中和和重度感染 COVID-19 患者。报告显示, 在针对 237 名病患的试验中, 158 人服用了瑞德西韦, 另 97 人没有服用该药, 结果服药患者的病死率为 13.9%, 没服药者的病死率为 12.8%。此外, 服用瑞德西韦的患者还出现了明显的副作用, 病毒数量及症状却没有明显改善。王辰、曹彬团队得出的结论是: 未观察到瑞德西韦联合标准疗法与标准疗法相比有统计学意义上显著的临床获益^[58]。另外一项是由美国国立卫生研究院领衔的临床研究, 从 2020 年 2 月 21 日开始, 共

招募 1063 名患者, 随机分为试验组和安慰剂组, 评价指标为康复时间。研究结果显示, 接受瑞德西韦治疗的试验组患者痊愈中位时间为 11 d、安慰剂组为 15 d, 与安慰剂组相比, 接受瑞德西韦的试验组患者痊愈时间缩短 31%, $P<0.001$, 结果有显著统计学差异。但是, 试验组患者病死率为 8.0%, 安慰剂组为 11.6%, $P=0.059$, 病死率无显著的统计学差异^[59]。

Zhou 等发现, SARS-CoV-2 与 SARS-CoV 基因组有 79.5% 的相似性^[60]。基于二者序列同源性高, 通过与相同受体 ACE2 (angiotensin converting enzyme 2) 结合后进入细胞, 且已有文献报道证实^[61], **55** (洛匹那韦/利托那韦, lopinavir/ritonavir) 在 SARS 的治疗中显示出良好的效果, 提示可能对 SARS-CoV-2 的治疗有效。在重症 COVID-19 成人住院患者中, 与常规治疗相比, 未观察到化合物 **55** 对治疗有益 (临床试验注册号: ChiCTR2000029308)。试验结果表明, 使用洛匹那韦/利托那韦组合与标准护理相比, 并没有使严重 COVID-19 成人患者症状得到显著改善^[62]。

化合物 **56** (阿比多尔, arbidol) 是一种具有免疫增强的非核苷类广谱抗病毒药物, 用于治疗甲、乙型流感病毒等引起的上呼吸道感染。体外细胞实验显示: 与药物未处理的对照组相比, 阿比多尔在 $10 \sim 30 \mu\text{mol/L}$ 浓度下, 有效抑制 SARS-CoV-2 达 60 倍, 并能显著抑制病毒对细胞的病变效应。目前已注册有盐酸阿比多尔片治疗 COVID-19 的临床研究 (ChiCTR2000029621)。

3 结语

到目前为止, 冠状病毒没有特效的抗病毒药物或疫苗。新药研发通常需要大量的人力、物力、财力和时间; 在当前 COVID-19 疫情急需药物的情况下, 按照常规研发思路开展药物研发, 显然“远水解不了近渴”。“老药新用”策略的优势就是可以节约资源和时间, 化合物的安全性已经过验证, 可直接进入临床药效研究。从战略药物储备角度长远考虑, 我们还可以利用计算机辅助药物设计技术开展药物设计及化合物库筛选, 发现新骨架、结构多样的苗头化合物, 进而通过构效关系研究、结构优化及成药性评价, 发现先导化合物、候选药物及临床有效药物, 可丰富抗病毒药物的“储备库”。

【参考文献】

- [1] PERLMAN S, NETLAND J. Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis[J]. *Nat Rev Microbiol*,

- 2009, 7(6): 439-450.
- [2] 刘昌孝, 王玉丽, 闫凤英. 认识新型冠状病毒肺炎, 关注疫情防控药物研发[J]. *中国抗生素杂志*, 2020, 45(2): 93-102.
- [3] HUANG C L, WANG Y M, LI X W, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China[J]. *Lancet*, 2020, 395(10223): 497-506.
- [4] CUI J, LI F, SHI Z L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2019, 17(3): 181-192.
- [5] 刘昌孝, 伊秀林, 王玉丽, 等. 认识新冠病毒(SARS-CoV-2), 探讨抗病毒药物研发策略[J]. *药物评价研究*, 2020, 43(3): 361-371.
- [6] GORBALENYA A E, SNIJDER E J, SPAAN W J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus phylogeny: toward consensus[J]. *J Virol*, 2004, 78(15): 7863-7866.
- [7] ZIEBUHR J, THIEL V, GORBALENYA A E. The autocatalytic release of a putative RNA virus transcription factor from its polyprotein precursor involves two paralogous papain-like proteases that cleave the same peptide bond[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(35): 33220-33232.
- [8] ZUMLA A, CHAN J F W, AZHAR E I, et al. Coronaviruses: drug discovery and therapeutic options[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2016, 15(5): 327-347.
- [9] DU L Y, HE Y X, ZHOU Y S, et al. The spike protein of SARS-CoV: a target for vaccine and therapeutic development[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(3): 226-236.
- [10] PILLAIYAR T, MANICKAM M, NAMASIVAYAM V, et al. An overview of severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease inhibitors: peptidomimetics and small molecule chemotherapy[J]. *J Med Chem*, 2016, 59(14): 6595-6628.
- [11] ANAND K, ZIEBUHR J, WADHWANI P, et al. Coronavirus main proteinase (3CLpro) structure: basis for design of anti-SARS drugs[J]. *Science*, 2003, 300(5626): 1763-1767.
- [12] PATICK A K, BINFORD S L, BROTHERS M A, et al. *In vitro* antiviral activity of AG7088, a potent inhibitor of human rhinovirus 3C protease[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, 43(10): 2444-2450.
- [13] GHOSH A K, XI K, RATIA K, et al. Design and synthesis of peptidomimetic severe acute respiratory syndrome chymotrypsin-like protease inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2005, 48(22): 6767-6771.
- [14] GHOSH A K, XI K, GRUM-TOKARS V, et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of peptidomimetic SARS-CoV 3CLpro inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, 17(21): 5876-5880.
- [15] JAIN R P, PETERSSON H I, ZHANG J M, et al. Synthesis and evaluation of keto-glutamine analogues as potent inhibitors of severe acute respiratory syndrome 3CLpro[J]. *J Med Chem*, 2004, 47(25): 6113-6116.
- [16] SHIE J J, FANG J M, KUO T H, et al. Inhibition of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease by peptidomimetic alpha, beta-unsaturated esters[J]. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13(17): 5240-5252.
- [17] YANG S, CHEN S J, HSU M F, et al. Synthesis, crystal structure, structure-activity relationships, and antiviral activity of a potent SARS coronavirus 3CL protease inhibitor[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(16): 4971-4980.
- [18] XUE X Y, YU H W, YANG H T, et al. Structures of two coronavirus main proteases: implications for substrate binding and antiviral drug design[J]. *J Virol*, 2008, 82(5): 2515-2527.
- [19] PRIOR A M, KIM Y, WEERASEKARA S, et al. Design, synthesis, and bioevaluation of viral 3C and 3C-like protease inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(23): 6317-6320.
- [20] ZHOU Y C, VEDANTHAM P, LU K, et al. Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry[J]. *Antiviral Res*, 2015, 116: 76-84.
- [21] KONNO H, WAKABAYASHI M, TAKANUMA D, et al. Design and synthesis of a series of serine derivatives as small molecule inhibitors of the SARS coronavirus 3CL protease[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(6): 1241-1254.
- [22] KONNO H, ONUMA T, NITANAI I, et al. Synthesis and evaluation of phenylisoserine derivatives for the SARS-CoV 3CL protease inhibitor[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27(12): 2746-2751.
- [23] CHEN L L, LI J, LUO C, et al. Binding interaction of quercetin-3-beta-galactoside and its synthetic derivatives with SARS-CoV 3CL(pro): structure-activity relationship studies reveal salient pharmacophore features[J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(24): 8295-8306.
- [24] YU M S, LEE J, LEE J M, et al. Identification of myricetin and scutellarein as novel chemical inhibitors of the SARS coronavirus helicase, nsP13[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22(12): 4049-4054.
- [25] KIM D W, SEO K H, CURTIS-LONG M J, et al. Phenolic phytochemical displaying SARS-CoV papain-like protease inhibition from the seeds of *Psoralea corylifolia*[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2014, 29(1): 59-63.
- [26] PARK J Y, KO J A, KIM D W, et al. Chalcones isolated from *Angelica keiskei* inhibit cysteine proteases of SARS-CoV[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2016, 31(1): 23-30.
- [27] PARK J Y, YUK H J, RYU H W, et al. Evaluation of polyphenols from *Broussonetia papyrifera* as coronavirus protease inhibitors[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2017, 32(1): 504-515.
- [28] WU C Y, KING K Y, KUO C J, et al. Stable benzotriazole esters as mechanism-based inactivators of the severe acute respiratory syndrome 3CL protease[J]. *Chem Biol*, 2006, 13(3): 261-268.
- [29] TURLINGTON M, CHUN A, TOMAR S, et al. Discovery of N-benzo[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23(22): 6172-6177.
- [30] RAMAJAYAM R, TAN K P, LIU H G, et al. Synthesis and evaluation of pyrazolone compounds as SARS-coronavirus 3C-like protease inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(22): 7849-7854.
- [31] KUMAR V, TAN K P, WANG Y M, et al. Identification, synthesis and evaluation of SARS-CoV and MERS-CoV 3C-like protease inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24(13): 3035-3042.
- [32] GHOSH A K, TAKAYAMA J, AUBIN Y, et al. Structure-based design, synthesis, and biological evaluation of a series of novel and reversible inhibitors for the severe acute respiratory syndrome-coronavirus papain-like protease[J]. *J Med Chem*, 2009, 52(16): 5228-5240.
- [33] BÁEZ-SANTOS Y M, BARRAZA S J, WILSON M W, et al. X-ray structural and biological evaluation of a series of potent and highly selective inhibitors of human coronavirus papain-like proteases[J]. *J Med Chem*, 2014, 57(6): 2393-2412.

- [34] ZHOU L, LIU Y, ZHANG W L, et al. Isatin compounds as non-covalent SARS coronavirus 3C-like protease inhibitors[J]. *J Med Chem*, 2006, 49(12): 3440-3443.
- [35] KEYAERTS E, VIJGEN L, MAES P, et al. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 323(1): 264-268.
- [36] VINCENT M J, BERGERON E, BENJANNET S, et al. Chloroquine is a potent inhibitor of SARS coronavirus infection and spread[J]. *Virology*, 2005, 2: 69.
- [37] DE WILDE A H, JOCHMANS D, POSTHUMA C C, et al. Screening of an FDA-approved compound library identifies four small-molecule inhibitors of Middle East respiratory syndrome coronavirus replication in cell culture[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58(8): 4875-4884.
- [38] CHEUNG N N, LAI K K, DAI J, et al. Broad-spectrum inhibition of common respiratory RNA viruses by a pyrimidine synthesis inhibitor with involvement of the host antiviral response[J]. *J Gen Virol*, 2017, 98(5): 946-954.
- [39] NIU C Y, YIN J, ZHANG J M, et al. Molecular docking identifies the binding of 3-chloropyridine moieties specifically to the S1 pocket of SARS-CoV Mpro[J]. *Bioorg Med Chem*, 2008, 16(1): 293-302.
- [40] ZHANG J M, HUITEMA C, NIU C Y, et al. Aryl methylene ketones and fluorinated methylene ketones as reversible inhibitors for severe acute respiratory syndrome (SARS) 3C-like proteinase[J]. *Bioorg Chem*, 2008, 36(5): 229-240.
- [41] JACOBS J, GRUM-TOKARS V, ZHOU Y, et al. Discovery, synthesis, and structure-based optimization of a series of N-(tert-butyl)-2-(N-arylamido)-2-(pyridin-3-yl) acetamides (ML188) as potent noncovalent small molecule inhibitors of the severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) 3CL protease[J]. *J Med Chem*, 2013, 56(2): 534-546.
- [42] GHOSH A K, GONG G L, GRUM-TOKARS V, et al. Design, synthesis and antiviral efficacy of a series of potent chloropyridyl ester-derived SARS-CoV 3CLpro inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, 18(20): 5684-5688.
- [43] CHEN L L, GUI C S, LUO X M, et al. Cinanserin is an inhibitor of the 3C-like proteinase of severe acute respiratory syndrome coronavirus and strongly reduces virus replication *in vitro* [J]. *J Virol*, 2005, 79(11): 7095-7103.
- [44] CHEN L R, WANG Y C, LIN Y W, et al. Synthesis and evaluation of isatin derivatives as effective SARS coronavirus 3CL protease inhibitors[J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005, 15(12): 3058-3062.
- [45] LU I L, MAHINDROO N, LIANG P H, et al. Structure-based drug design and structural biology study of novel nonpeptide inhibitors of severe acute respiratory syndrome coronavirus main protease [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(17): 5154-5161.
- [46] BACHA U, BARRILA J, GABELLI S B, et al. Development of broad-spectrum halomethyl ketone inhibitors against coronavirus main protease 3CL(pro) [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2008, 72(1): 34-49.
- [47] WANG L, BAO B B, SONG G Q, et al. Discovery of unsymmetrical aromatic disulfides as novel inhibitors of SARS-CoV main protease: Chemical synthesis, biological evaluation, molecular docking and 3D-QSAR study [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 137: 450-461.
- [48] CHO J H, BERNARD D L, SIDWELL R W, et al. Synthesis of cyclopentenyl carbocyclic nucleosides as potential antiviral agents against orthopoxviruses and SARS [J]. *J Med Chem*, 2006, 49(3): 1140-1148.
- [49] AGOSTINI M L, ANDRES E L, SIMS A C, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease [J]. *mBio*, 2018, 9(2): e00221-e00218.
- [50] 乔欢, 孙超. 潜在抗冠状病毒药物瑞德西韦研究进展 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2020, 39(3): 141-145.
- [51] PETERS H L, JOCHMANS D, DE WILDE A H, et al. Design, synthesis and evaluation of a series of acyclic fleximer nucleoside analogues with anti-coronavirus activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015, 25(15): 2923-2926.
- [52] MÜLLER C, SCHULTE F W, LANGE-GRÜNWELLER K, et al. Broad-spectrum antiviral activity of the eIF4A inhibitor silvestrol against Corona- and picornaviruses [J]. *Antiviral Res*, 2018, 150: 123-129.
- [53] LEE H, REN J H, PESAVENTO R P, et al. Identification and design of novel small molecule inhibitors against MERS-CoV papain-like protease via high-throughput screening and molecular modeling [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(10): 1981-1989.
- [54] WANG M L, CAO R Y, ZHANG L K, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. *Cell Res*, 2020, 30(3): 269-271.
- [55] LIU J, CAO R Y, XU M Y, et al. Hydroxychloroquine, a less toxic derivative of chloroquine, is effective in inhibiting SARS-CoV-2 infection *in vitro* [J]. *Cell Discov*, 2020, 6: 16.
- [56] GAO J J, TIAN Z X, YANG X. Breakthrough: Chloroquine phosphate has shown apparent efficacy in treatment of COVID-19 associated pneumonia in clinical studies [J]. *Biosci Trends*, 2020, 14(1): 72-73.
- [57] MEHRA M R, DESAI S S, RUSCHITZKA F, et al. Hydroxychloroquine or chloroquine with or without a macrolide for treatment of COVID-19: a multinational registry analysis [J]. *The Lancet*, 2020.
- [58] WANG Y M, ZHANG D Y, DU G H, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial [J]. *Lancet*, 2020(20): 31022-31029.
- [59] National Institute of Allergy and Infectious Diseases. NIH clinical trial shows Remdesivir accelerates recovery from advanced COVID-19 [EB/OL]. (2020-04-29)[2020-05-10]. <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-clinical-trial-shows-remdesivir-accelerates-recovery-advanced-covid-19>.
- [60] ZHOU P, YANG X L, WANG X G, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin [J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 270-273.
- [61] CHU C M, CHENG V C, HUNG I F, et al. Role of lopinavir/ritonavir in the treatment of SARS: initial virological and clinical findings [J]. *Thorax*, 2004, 59(3): 252-256.
- [62] CAO B, WANG Y M, WEN D N, et al. A trial of lopinavir-ritonavir in adults hospitalized with severe covid-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(19): 1787-1799.