

秦聖乐,王玉涛,蔡雪君,等. 抗冠状病毒药物研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(6): 105-110.

Qin SL, Wang YT, Cai XJ, et al. Research progress on anti-coronavirus drugs [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(6): 105-110.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.06.016

抗冠状病毒药物研究进展

秦聖乐,王玉涛,蔡雪君,王新华*,杨子峰*

(广州医科大学附属第一医院,广州呼吸健康研究院,呼吸疾病国家重点实验室,广州 510182)

【摘要】 新冠疫情持续至今,对人类健康、经济及社会发展造成深远影响。由于其感染性强,传播速度快,以及变异株的不断出现,导致防控难度极大。药物是防治病毒性感染疾病的重要措施之一,目前尚无批准用于临床的抗新冠病毒特效药物。根据冠状病毒的致病特点和发病机制,已有较多关于抗病毒药物靶点研究,本文对以冠状病毒刺突蛋白,核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)依赖性 RNA 聚合酶,3C 样蛋白酶(3C-like proteinase, 3CLP_{ro})等为靶点的药物研究以及抗冠状病毒中药的体内研究现状进行综述,为冠状病毒感染,尤其是新冠病毒感染防治提供药效学依据,并为其后续的临床应用提供参考。

【关键词】 冠状病毒;抗病毒药物;作用靶点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 06-0105-06

Research progress on anti-coronavirus drugs

QIN Shengle, WANG Yutao, CAI Xuejun, WANG Xinhua*, YANG Zifeng*

(State Key Laboratory of Respiratory Disease, Guangzhou Institute of Respiratory Health, the First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China)

【Abstract】 The ongoing coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic is having a profound impact on human health, economics, and social development. This disease has been extremely difficult to prevent and control because of its strong infectivity and rapid transmission, along with the constant emergence of mutant strains of the causative virus, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Drugs are an important measure for the prevention and treatment of viral infectious diseases. At present, there are no specific anti-SARS-CoV-2 drugs approved for clinical use. There have been many studies on antiviral drug targets guided by present understanding of the characteristics and mechanism of coronavirus pathogenesis. This review discusses the current research status of drugs targeting coronavirus Spike protein, ribonucleic acid (RNA)-dependent RNA polymerase and 3C-like proteinase, as well as Traditional Chinese Medicine against coronaviruses; it details the pharmacodynamic basis for the prevention and treatment of coronaviruses, especially SARS-CoV-2, by these drugs and provides a reference for their subsequent clinical application.

【Keywords】 coronavirus; antiviral drugs; targets

新冠疫情已在世界范围大流行,死亡人数超过
520 万, Severe Acute Respiratory Syndrome

Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) 是一种新型的人类感染
性 β 冠状病毒^[1]。迄今为止,已发现 7 种冠状病毒

【基金项目】 国家重点研发计划(2020YFA0708002);国家自然科学基金(82074311)。

【作者简介】 秦聖乐(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合研究。E-mail:qinshengle2020@163.com

【通信作者】 杨子峰(1977—),男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:抗病毒药物研究。E-mail:jeffyah@163.com

王新华(1960—),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:中西医结合研究。E-mail:xinhua@gzhu.edu.cn * 共同通信作者

可引起人类呼吸道疾病。冠状病毒是有包膜、单股正链 Ribonucleic Acid (RNA) 病毒,分为 α 、 β 、 γ 、 δ 4 个属,其中 α 、 β 冠状病毒属与人类疾病有关。目前引起人类呼吸道疾病的冠状病毒 Human coronavirus 229E (HCoV-229E)、Human coronavirus NL63 (HCoV-NL63) 属于 α 属, Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43)、Human coronavirus HKU-1 (HCoV-HKU-1)、SARS-CoV、Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)、SARS-CoV-2 属于 β 属。HCoV-229E、HCoV-NL63、HCoV-OC43、HCoV-HKU-1 冠状病毒可引起轻度呼吸道疾病,在免疫力低下人群中,还会引起肺炎和下呼吸道疾病^[2]。SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 病毒有高变异性和传染性,可引起严重急性呼吸道综合征。由于 RNA 病毒的高变异性,使得药物研究困难重重。本文对以冠状病毒刺突蛋白, RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 3C 样蛋白酶以及抗冠状病毒中药的体内研究现状进行综述,为抗冠状病毒药物研究提供理论依据。

1 冠状病毒复制周期

吸附与进入: 冠状病毒是有包膜、单股正链 RNA 病毒。病毒的膜表面有 3 种蛋白,分别是刺突蛋白 (spike protein, S 蛋白)、包膜蛋白 (envelope protein, E 蛋白)、膜蛋白 (membrane protein, M 蛋白),其中 S 蛋白是病毒入侵宿主细胞的关键^[3]。病毒进入人体后,其 S 蛋白被宿主蛋白酶切割成 S1 和 S2 两个亚基, S1 亚基的受体结合区域与受体结合,病毒黏附在宿主细胞表面, S2 构象发生改变。病毒进入细胞包括膜融合和内吞两种方式, S2 的两个串联域七肽重复序列 1 (heptad repeat domains 1, HR1) 和七肽重复序列 2 (heptad repeat domains, HR2), 介导病毒与细胞之间膜融合途径,使病毒进入宿主细胞^[4],如 MERS-CoV 病毒^[5];此外,低 pH 值和 pH 依赖性的内质体半胱氨酸蛋白酶等组织蛋白酶协助冠状病毒由内吞途径进入宿主细胞,如 SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 病毒^[6-7]。

复制与转录: 病毒基因组的复制和转录主要是由病毒的复制酶介导。病毒进入宿主细胞并脱壳,病毒基因组 RNA 释放到细胞质中后, Open Reading Frame 1a (ORF 1a)、ORF 1b 翻译多聚蛋白 (polyprotein, pp) pp1a 和 pp1ab, pp1a 和 pp1ab 随后被木瓜蛋白酶样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro) 和 3C 样蛋白酶 (chymotrypsin-like protease,

3CLpro) 切割,产生 15 ~ 16 个非结构蛋白 (nonstructure protein, NSPs), NSPs 组装成复制-转录复合物 (replicase-transcriptase complex, RTC), 负责病毒 RNA 的复制和多个亚基因组 RNA (subgenomic RNAs, sgRNAs) 的转录。冠状病毒复制以其正链 RNA 为模板,通过 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 生成全长的反义负链模板,用于合成新的基因组 RNA 和重叠的亚基因组负链模板。

蛋白翻译: 亚基因组 mRNAs 的翻译产生病毒的结构蛋白和辅助蛋白,如刺突蛋白 (S)、核衣壳磷酸蛋白 (N)、血凝素-酯酶糖蛋白 (HE)、膜糖蛋白 (M)、外膜蛋白 (E) 在内质网进行翻译,并转运至高尔基体^[8]。

组装与释放: 病毒颗粒组装过程主要是在内质网-高尔基体中间体中发生, N 蛋白与新生的基因组 RNA 在胞浆内组成螺旋核衣壳,核衣壳首先与 M 蛋白结合, E 蛋白与 M 蛋白相互作用引发芽生,包装核衣壳。S 蛋白与 HE 蛋白在翻译时形成三聚体,包装到成熟的病毒颗粒,最后通过胞吐释放到胞外。

2 基于病毒蛋白靶点的抗冠状病毒药物

病毒复制周期中的酶和蛋白都是抗冠状病毒药物潜在的作用靶点,目前对于抗冠状病毒药物的研究热点主要集中在 S 蛋白、RdRp、3CLpro、PLpro 等。

2.1 靶向于病毒刺突 (S) 蛋白

刺突 (S) 蛋白属于病毒的结构蛋白,成熟的 S 蛋白为稳定的三聚体,具有受体及膜融合活性, S1 和 S2 之间存在蛋白酶的裂解位点, S 蛋白的裂解活化是病毒入侵宿主细胞的关键^[3]。S 蛋白上的受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 与细胞表面受体结合,使病毒黏附于细胞表面,不同的冠状病毒其受体不同,亲和力也有区别, MERS-CoV 以人细胞表面蛋白二肽基肽酶 4 (dipeptidyl peptidase-4, DPP4) 作为进入受体,而 SARS-CoV-2 和 SARS-CoV 以血管紧张素转化酶 II (angiotensin-converting 2, ACE2) 作为受体,由于 SARS-CoV-2 的 S 蛋白与 ACE2 受体亲和力比 SARS-CoV 高 20 倍,导致该病毒在人类中的传播速度更快^[9]。

SARS-CoV-2 不仅需要 ACE2 作为进入受体,还须同时结合位于细胞表面上的硫酸乙酰肝素

(heparan sulfate, HS) 才能进入宿主细胞,肝素结构上类似于 HS,可结合并诱导 SARS-CoV-2 S 蛋白受体结合域构象变化,抑制 SARS-CoV-2 对 Vero 细胞的感染^[10],此外,肝素是一种硫酸多糖,有研究证实海参硫酸多糖(SCSP)可能通过抑制 HS 和 S 蛋白结合,阻止 SARS-CoV-2 进入宿主细胞^[11]。

部分药物可通过直接与病毒 S 蛋白结合,如单克隆抗体 7D10 与 MERS-CoV S 蛋白的 N 端结构域(amino terminal domain, NTD)结合,与 DPP4 竞争性结合病毒 S 蛋白,抑制了 S 蛋白融合前到融合后的构象变化,从而阻止 MERS-CoV 进入宿主细胞^[12]。或通过其他方式作用于 S 蛋白,如重组蛋白 Griffithsin 与 SARS-CoV 的 S 蛋白存在多个具有高亲和力结合位点,但其并不抑制 S 蛋白与 ACE2 结合,研究表明 Griffithsin 在体外可预防 SARS-CoV 感染,预处理可预防小鼠致命性的肺部感染,减轻小鼠肺部病理改变,降低小鼠肺部炎症因子 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、G-CSF、MCP-1 和 IL-12 的表达^[13]。化合物阳离子改性壳聚糖 N-(2-羟丙基)-3-三甲基铵壳聚糖氯(HTCC)通过与病毒 S 蛋白之间的静电相互作用,有效地阻断了 MERS-CoV 和 SARS-CoV-2 进入宿主细胞,且通过微调 HTCC 可以靶向其他冠状病毒,但目前该化合物尚未用于人类,需要进一步深入研究^[14]。

冠状病毒 S 蛋白与受体结合后,通过破坏融合前 S 蛋白三聚体的稳定性,引起 S1 亚基脱落并从 S2 亚基过渡到稳定的融合后构象,Arbidol 就通过阻断 SARS-CoV-2 刺突蛋白的三聚反应,从而抑制病毒的感染性^[15],但其有效性和安全性需要进一步的临床研究。

S2 的两个串联域七肽重复序列 1(HR1)和七肽重复序列 2(HR2)可形成一个 6-HB 的螺旋结构,协助 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 与细胞之间膜融合途径^[4,16],SARS-CoV-2 的 HR1 比 SARS-CoV 具有更高的螺旋度和热稳定性,与对应的 HR2 亲和性也更强^[17],丹参的亲水化合物丹参酚酸 C,通过结合 SARS-CoV-2 的 HR1 区域中处于融合中间状态的保守疏水囊,阻断 HR1 和 HR2 之间 6-HB 的形成,从而抑制 SARS-CoV-2 感染^[18]。通过 SARS-CoV-2 蛋白 HRC 结构域设计出的 SARS-CoV-2 HRC 脂肽,可通过抑制 SARS-CoV-2、SARS-CoV 和 MERS-CoV 的 S 蛋白介导的细胞膜融合,从而有效地抑制病毒感染^[19]。

Furin 裂解位点在 S 蛋白融合活性中至关重要,有助于病毒合胞体形成,其抑制剂 CMK 和 Naphthofluorescein 在体外可抑制 SARS-CoV-2 的复制,该类抑制剂可作为先导化合物,进一步开发为抗病毒药物^[20],此外,组织蛋白酶 L(CTSL)切割 SARS-CoV-2 刺突蛋白,协助病毒进入宿主细胞,有研究表明 COVID-19 患者的组织蛋白酶 L(CTSL)水平升高,且与疾病的严重程度呈正相关,因此组织蛋白酶 L(CTSL)有望开发成为抗 SARS-CoV-2 病毒药物的靶标^[21]。

2.2 靶向于 RNA 依赖性 RNA 聚合酶

RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp, Nsp12)是冠状病毒 RTC 的重要组成部分,冠状病毒在复制过程需自身编码的 RdRp 参与,主要负责病毒复制过程中链引发和链延伸两个阶段,是研究抗冠状病毒的主要靶标^[22]。

瑞德西韦(remdesivir)是一种新型核苷类似物,靶向于 RdRp,通过掺入到 RNA 复制过程中,添加 3 个核苷酸从而诱导 RdRp 遇到易位屏障,终止链延伸,抑制病毒复制^[23],因此瑞德西韦也具有广谱性,对 SARS-CoV、MERS-CoV、SARS-CoV-2 均有抗病毒活性^[24],临床上瑞德西韦副作用小,多用于治疗呼吸道病毒感染,但对于 COVID-19 重症患者没有显著的临床和抗病毒效果^[25]。苏拉明(suramin)在酶水平上,是瑞德西韦的三磷酸活性形式的 20 倍以上,通过与 RdRp 活性位点结合,抑制病毒 RNA 模板与引物和底物结合,同时抑制了 RdRp 聚合酶活性^[26]。而利托那韦可与 SARS-CoV-2 RdRp 蛋白结合,可能通过抑制 RdRp 蛋白 3' 到 5' 外切酶活性,可提高药物治疗 COVID-19^[27]。利巴韦林多被用于治疗由呼吸道合胞病毒(RSV)引起的呼吸道相关疾病,其在宿主细胞内磷酸化后,可能通过竞争性地抑制病毒的三磷酸鸟苷合成,或是抑制病毒 mRNA 合成和抑制 RdRp 实现抗病毒作用^[28],有研究提出干扰素- α 2b 和利巴韦林联合使用可有效减少 MERS-CoV、SARS-CoV 的体外复制^[29],且能改善被 MERS-CoV 感染后恒河猴体内病毒载量和肺组织病理变化^[30],对于严重的 MERS-CoV 感染患者,干扰素- α 2b 和利巴韦林联合治疗可改善 14 d 生存率^[31]。

2.3 靶向于 3C 样蛋白酶

3C 样蛋白酶(3C_{pro}, Nsp5)负责切割病毒基因组翻译的蛋白前体,是冠状病毒复制的重要酶。

3CLpro 在 β 属冠状病毒中保守性较高^[32], 其相关的抑制剂对于 MERS-CoV、SARS-CoV 和 SARS-CoV-2 有广泛的抗病毒活性^[33]。

目前有许多化合物通过靶向 3CLpro 显示抗病毒活性, 如吡啶-氯吡啶基酯衍生物 GRL-0820 和 GRL-0920 可与 SARS-CoV-2 的 3CLpro 共价结合, 在体外具有抑制 SARS-CoV-2 作用。GRL-0820 吡啶氮上有一个额外的丙烯取代基, 相比之下 GRL-0920 对 SARS-CoV-2 具有更强的抗病毒活性^[34]。针对 3CLpro 设计出的 TG-0205221 能够减少 SARS-CoV 和 HCoV-229E 病毒滴度, 显示出一定的抗病毒活性^[35]。GC-376 和钙蛋白酶抑制剂 II、XII 则具有双重作用机制, 在 Vero 细胞中同时抑制病毒 3CLpro 和宿主组织蛋白酶 L 的活性, 对 SARS-CoV-2、SARS-CoV、MERS-CoV 以及 HCoV-229E、OC43 和 NL63 均有抗病毒活性^[36]。阿扎那韦与 3CLpro 氢键结合, 可抑制 SARS-CoV-2 的 3CLpro 酶活性, 与利托那韦联用还可以下调病毒诱导的 IL-6 和 TNF- α 水平^[37]。洛匹那韦是 HIV-1 蛋白酶抑制剂, 常与利托那韦联合使用提高血药浓度, 其靶向于 3CLpro, 对冠状病毒有一定的抗病毒活性, 预防性给予洛匹那韦/利托那韦可降低 MERS-CoV 在小鼠体内病毒载量, 治疗性使用可改善肺功能, 但不减少病毒复制和严重的肺病理改变^[38], 早期的洛匹那韦/利托那韦治疗可缩短 SARS-CoV-2 病毒在病人体内的排毒时间^[39]。

通过体外分子筛查, 筛选出槲皮素有望成为靶向于 3CLpro 的抗 SARS-CoV-2 候选药物^[40]。肉桂硫胺可能通过抑制 3CLpro 来抑制 SARS-CoV 复制^[41]。表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 和 Nsubstited Isatin 可抑制 3CLpro, 具有作为抗冠状病毒药物的潜力^[32, 42]。中药双黄连制剂靶向于 SARS-CoV-2 3CLpro, 抑制病毒在 VERO-E6 细胞中复制, 成剂量依赖关系, 其活性成分黄芩苷和黄芩素在体外也显示较好抗病毒活性^[43]。

3 抗冠状病毒中药的体内研究

传统中药在我国已广泛使用, 其成本低, 疗效好, 能有效缓解症状, 减少从轻度到中度或重度的发展, 改善治愈率, 降低死亡率, 促进患者的康复等。新冠病毒流行期间, 以“三药三方”为代表的中药在新冠病毒的防治方面发挥了重大作用^[44], 基于中药多成分、多靶点、多通路的特点, 因此体内模型

验证其有效性具有重要意义, 由于冠状病毒受体限制, 因此中药抗冠状病毒的动物模型评价研究有限。

3.1 甘草干燥根和山茶水提物的小鼠体内抗新冠病毒研究

GB-2 主要由甘草干燥根和山茶通过水提获得, 为了研究 GB-2 的体内抗 SARS-CoV-2 效应, 以小鼠为实验动物模型每天口服 200 mg/kg 的 GB-2。在 GB-2 治疗 1 周后, 小鼠未有死亡, 且小鼠活动或体重都没有显著变化。此外, GB-2 组与对照组比较, 血清肌酐、谷氨酸草酰乙酸转氨酶和谷氨酸-丙酮酸转氨酶水平没有显著升高, 表明 GB-2 没有明显的肾毒性或肝毒性。肺和肾是 ACE2 相对高表达的重要器官, 是 SARS-CoV-2 的潜在靶点, 因此研究了 GB-2 对 ACE2 和 TMPRSS2 蛋白在两个器官组织中的表达影响。GB-2 治疗 1 周 (200 mg/kg, 口服), 肺和肾的免疫组织化学 (IHC) 数据显示, GB-2 组的 ACE2 和 TMPRSS2 与对照组比较明显减少。结果表明, GB-2 可能阻断 ACE2 和 ACE2TMPRSS2 在肺和肾组织中的表达且无副作用, 包括肾毒性和肝毒性^[45]。

3.2 通过建立人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠模型, 该研究评价热炎宁合剂、复方芩兰口服液、柴银颗粒、金柴抗病毒胶囊的有效性

热炎宁合剂由蒲公英、虎杖、北败酱、半枝莲 4 味中药组成, 结果显示热炎宁合剂能显著降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数, 提高小鼠外周血 CD8⁺ T 淋巴细胞和 CD4⁺ T 淋巴细胞百分比, 其低剂量组 (14.67 mL/(kg·d)) 能提高总 B 淋巴细胞百分比, 降低小鼠肺组织中冠状病毒载量和炎症因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-6、IL-10 含量, 提示热炎宁合剂对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证具有较好疗效, 主要表现在改善肺部病变, 增强小鼠免疫机能, 降低体内炎症因子等方面^[46]。

复方芩兰口服液由金银花、黄芩、连翘、板蓝根 4 味中药组成, 其高 (22 mL/(kg·d))、低剂量 (11 mL/(kg·d)) 可降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数, 抑制率分别为 59.01%、47.72%, 此外, 复方芩兰口服液可降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺组织病毒载量, 提升其外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞及总 B 淋巴细胞百分比, 降低肺组织中炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 及 IFN- γ 表达, 明显改善肺组织炎症^[47]。

柴银颗粒是由柴葛解肌汤和银翘散化裁, 由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草 11 味中药组成, 其高 (8.8 g/(kg

·d)、低剂量(4.4 g/(kg·d))能降低人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证小鼠的肺指数,抑制率分别为 61.02%,55.45%,提高小鼠外周血 CD4⁺ T 淋巴细胞、CD8⁺ T 淋巴细胞、总 B 淋巴细胞百分比,降低小鼠肺组织炎症因子 IL-10、TNF- α 、IFN- γ 含量^[48]。

金柴抗病毒胶囊由金银花、柴胡、连翘、黄芩、清半夏、西洋参、绵马贯众等中药组成,可增加寒湿疫毒袭肺证小鼠的活动度和反应能力,改善小鼠皮毛和大便状态,金柴抗病毒胶囊高(1.76 g/(kg·d))、低剂量组(0.88 g/(kg·d))可以显著降低肺指数,明显提升 CD4⁺ T 细胞,CD8⁺ T 细胞,B 细胞含量,低剂量组显著降低血清中 MTL 含量,降低肺组织中病毒载量和炎症因子 IL-6、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 表达,改善肺组织病理损伤^[49]。

4 结语

新冠病毒感染具有潜伏期长、传染性强等特点,且不断出现变异株,导致传播性增强,免疫逃逸,增加疾病严重性以及降低疫苗的有效性^[50]。目前尚无有效的抗新冠病毒药物批准用于临床,现有药物研究主要集中在病毒相关靶蛋白,由于冠状病毒为 RNA 病毒,易发生突变,因此单靶点药物极易产生耐药性。因此,针对冠状病毒及可能的新出现毒株的药物,应根据其致病特点,深入研究病毒复制周期及病毒-宿主相互作用的特点,不断探索新靶点,将不同靶点药物联合使用降低耐药性及减少毒副作用,此外,“老药新用”及中西医并重的治疗策略都为抗病毒药物研究提供了新思路。

参考文献:

[1] Lu R, Zhao X, Li J, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding [J]. Lancet, 2020, 395(10224): 565-574.

[2] Gorse GJ, O'Connor TZ, Hall SL, et al. Human coronavirus and acute respiratory illness in older adults with chronic obstructive pulmonary disease [J]. J Infect Dis, 2009, 199(6): 847-857.

[3] Yuan Y, Cao D, Zhang Y, et al. Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains [J]. Nat Commun, 2017, 8: 15092.

[4] Zhang N, Jiang S, Du L. Current advancements and potential strategies in the development of MERS-CoV vaccines [J]. Expert Rev Vaccines, 2014, 13(6): 761-774.

[5] Qing E, Hantak MP, Galpalli GG, et al. Evaluating MERS-CoV entry pathways [J]. Methods Mol Biol, 2020, 2099: 9-20.

[6] Watanabe R, Matsuyama S, Shirato K, et al. Entry from the cell

surface of severe acute respiratory syndrome coronavirus with cleaved S protein as revealed by pseudotype virus bearing cleaved S protein [J]. J Virol, 2008, 82(23): 11985-11991.

[7] Shang J, Wan Y, Luo C, et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(21): 11727-11734.

[8] V'Kovski P, Kratzel A, Steiner S, et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 [J]. Nat Rev Microbiol, 2021, 19(3): 155-170.

[9] Andersen KG, Rambaut A, Lipkin WI, et al. The proximal origin of SARS-CoV-2 [J]. Nat Med, 2020, 26(4): 450-452.

[10] Mycroft-West CJ, 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 [J]. Thromb Haemost, 2020, 120(12): 1700-1715.

[11] Song S, Peng H, Wang Q, et al. Inhibitory activities of marine sulfated polysaccharides against SARS-CoV-2 [J]. Food Funct, 2020, 11(9): 7415-7420.

[12] Zhou H, Chen Y, Zhang S, et al. Structural definition of a neutralization epitope on the N-terminal domain of MERS-CoV spike glycoprotein [J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 3068.

[13] O'Keefe BR, Giomarelli B, Barnard DL, et al. Broad-spectrum *in vitro* activity and *in vivo* efficacy of the antiviral protein griffithsin against emerging viruses of the family Coronaviridae [J]. J Virol, 2010, 84(10): 2511-2521.

[14] Milewska A, Chi Y, Szczepanski A, et al. HTCC as a polymeric inhibitor of SARS-CoV-2 and MERS-CoV [J]. J Virol, 2021, 95(4): e01622-e01720.

[15] Vankadari N. Arbidol: A potential antiviral drug for the treatment of SARS-CoV-2 by blocking trimerization of the spike glycoprotein [J]. Int J Antimicrob Agents, 2020, 56(2): 105998.

[16] Xia S, Zhu Y, Liu M, et al. Fusion mechanism of 2019-nCoV and fusion inhibitors targeting HR1 domain in spike protein [J]. Cell Mol Immunol, 2020, 17(7): 765-767.

[17] Zhu Y, Yu D, Yan H, et al. Design of potent membrane fusion inhibitors against SARS-CoV-2, an emerging coronavirus with high fusogenic activity [J]. J Virol, 2020, 94(14): e00635-e00720.

[18] 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 [J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 220.

[19] Outlaw VK, Bovier FT, Mears MC, et al. Inhibition of coronavirus entry *in vitro* and *ex vivo* by a lipid-conjugated peptide derived from the SARS-CoV-2 spike glycoprotein HRC domain [J]. mBio, 2020, 11(5): e01935-e02020.

[20] Cheng YW, Chao TL, Li CL, et al. Furin inhibitors block SARS-CoV-2 spike protein cleavage to suppress virus production and cytopathic effects [J]. Cell Rep, 2020, 33(2): 108254.

[21] Zhao MM, Yang WL, Yang FY, et al. Cathepsin L plays a key role in SARS-CoV-2 infection in humans and humanized mice and is a promising target for new drug development [J]. Signal

- Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 134.
- [22] Wang M, Li R, Shu B, et al. Stringent control of the RNA-dependent RNA polymerase translocation revealed by multiple intermediate structures [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2605.
- [23] Kocik G, Hillen HS, Tegunov D, et al. Mechanism of SARS-CoV-2 polymerase stalling by remdesivir [J]. Nat Commun, 2021, 12(1): 279.
- [24] Malin JJ, Suárez I, Priesner V, et al. Remdesivir against COVID-19 and other viral diseases [J]. Clin Microbiol Rev, 2020, 34(1): e00162-e00220.
- [25] Wang Y, Zhang D, Du G, et al. Remdesivir in adults with severe COVID-19: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial [J]. Lancet, 2020, 395(10236): 1569-1578.
- [26] Yin W, Luan X, Li Z, et al. Structural basis for inhibition of the SARS-CoV-2 RNA polymerase by suramin [J]. Nat Struct Mol Biol, 2021, 28(3): 319-325.
- [27] Narayanan N, Nair DT. Ritonavir may inhibit exoribonuclease activity of nsp14 from the SARS-CoV-2 virus and potentiate the activity of chain terminating drugs [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 168: 272-278.
- [28] Ferron F, Subissi L, Silveira De Moraes AT, et al. Structural and molecular basis of mismatch correction and ribavirin excision from coronavirus RNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018, 115(2): E162-E171.
- [29] Falzarano D, de Wit E, Martellaro C, et al. Inhibition of novel β coronavirus replication by a combination of interferon- α 2b and ribavirin [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1686.
- [30] Falzarano D, de Wit E, Rasmussen AL, et al. Treatment with interferon- α 2b and ribavirin improves outcome in MERS-CoV-infected rhesus macaques [J]. Nat Med, 2013, 19(10): 1313-1317.
- [31] Omrani AS, Saad MM, Baig K, et al. Ribavirin and interferon alfa-2a for severe Middle East respiratory syndrome coronavirus infection: a retrospective cohort study [J]. Lancet Infect Dis, 2014, 14(11): 1090-1095.
- [32] Liu P, Liu H, Sun Q, et al. Potent inhibitors of SARS-CoV-2 3C-like protease derived from N-substituted isatin compounds [J]. Eur J Med Chem, 2020, 206: 112702.
- [33] Rathnayake AD, Zheng J, Kim Y, et al. 3C-like protease inhibitors block coronavirus replication *in vitro* and improve survival in MERS-CoV-infected mice [J]. Sci Transl Med, 2020, 12(557): eabc5332.
- [34] Hattori SI, Higshi-Kuwata N, Raghavaiah J, et al. GRL-0920, an indole chloropyridinyl ester, completely blocks SARS-CoV-2 infection [J]. mBio, 2020, 11(4): e01833-e01920.
- [35] Yang S, Chen SJ, Hsu MF, 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.
- [36] Hu Y, Ma C, Szeto T, et al. Boceprevir, calpain inhibitors II and XII, and GC-376 have broad-spectrum antiviral activity against coronaviruses [J]. ACS Infect Dis, 2021, 7(3): 586-597.
- [37] Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Ribeiro Lima C, et al. Atazanavir, alone or in combination with ritonavir, inhibits SARS-CoV-2 replication and proinflammatory cytokine production [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2020, 64(10): e00825-e00920.
- [38] Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon β against MERS-CoV [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 222.
- [39] Yan D, Liu XY, Zhu YN, et al. Factors associated with prolonged viral shedding and impact of lopinavir/ritonavir treatment in hospitalised non-critically ill patients with SARS-CoV-2 infection [J]. Eur Respir J, 2020, 56(1): 2000799.
- [40] Abian O, Ortega-Alarcon D, Jimenez-Alesanco A, et al. Structural stability of SARS-CoV-2 3CLpro and identification of quercetin as an inhibitor by experimental screening [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 164: 1693-1703.
- [41] Chen L, Gui C, Luo X, 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.
- [42] Du A, Zheng R, Disoma C, et al. Epigallocatechin-3-gallate, an active ingredient of Traditional Chinese Medicines, inhibits the 3CLpro activity of SARS-CoV-2 [J]. Int J Biol Macromol, 2021, 176: 1-12.
- [43] Su HX, Yao S, Zhao WF, et al. Anti-SARS-CoV-2 activities *in vitro* of Shuanghuanglian preparations and bioactive ingredients [J]. Acta Pharmacol Sin, 2020, 41(9): 1167-1177.
- [44] Li C, Wang L, Ren L. Antiviral mechanisms of candidate chemical medicines and traditional Chinese medicines for SARS-CoV-2 infection [J]. Virus Res, 2020, 286: 198073.
- [45] Wu CY, Lin YS, Yang YH, et al. GB-2 inhibits ACE2 and TMPRSS2 expression: *In vivo* and *in vitro* studies [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 132: 110816.
- [46] 包蕾, 时宇静, 耿子涵, 等. 热炎宁合剂在评价人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证中的应用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1465-1472.
- [47] 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 复方芩兰口服液对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(7): 1473-1480.
- [48] 鲍岩岩, 时宇静, 郭姗姗, 等. 基于对免疫功能的调节探讨柴银颗粒对人冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3020-3027.
- [49] 郭姗姗, 李丹, 时宇静, 等. 基于冠状病毒肺炎寒湿疫毒袭肺证病证结合模型的金柴抗病毒胶囊疗效评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(13): 1-7.
- [50] Boehm E, Kronig I, Neher RA, et al. Novel SARS-CoV-2 variants: the pandemics within the pandemic [J]. Clin Microbiol Infect, 2021, 27(8): 1109-1117.