



基于结构的病毒蛋白酶抑制剂理性设计: 上市药物案例解析

熊慕雅¹, 聂添情^{2,3}, 苏海霞^{4,5}, 许叶春^{1,2,3,4,5*}

1. 国科大杭州高等研究院药物与技术学院, 杭州 310024

2. 临港实验室, 上海 200031

3. 上海科技大学物质科学与技术学院, 上海 201210

4. 中国科学院上海药物研究所新药研究国家重点实验室, 上海 201203

5. 中国科学院大学, 北京 101408

*通讯作者, E-mail: ycxu@simm.ac.cn

收稿日期: 2025-04-23; 接受日期: 2025-06-02; 网络版发表日期: 2025-07-23

国家自然科学基金(编号: 22277130)资助项目

摘要 本文以获批上市的抗病毒药物作用靶点为切入点, 系统解析病毒蛋白酶底物识别机制、配体结合位点特征与催化反应机制, 重点剖析蛋白酶与小分子抑制剂及药物的相互作用模式、上市药物结构优化路径与构效关系研究, 从而探讨基于结构的药物设计在已上市病毒蛋白酶抑制剂研发中的关键作用. 本综述希望能为药物研发者开展基于结构的药物设计提供典型案例和方法借鉴, 促进基于结构的药物设计方法发展和助力抗病毒药物研发与临床转化应用.

关键词 人类免疫缺陷病毒蛋白酶, 丙型肝炎病毒NS3/4A蛋白酶, 新型冠状病毒3CL蛋白酶, 蛋白酶抑制剂, 基于结构的药物设计

1 引言

病毒蛋白酶作为病毒复制过程中不可或缺的调控元件, 在病毒生命周期中扮演着不可替代的“分子剪刀”角色. 这类酶通过特异性切割病毒多聚蛋白前体, 协调结构蛋白组装或非结构蛋白(non-structural protein, nsp)功能激活, 从而驱动病毒颗粒成熟与感染扩散. 因此, 病毒蛋白酶是抗病毒药物研发的关键靶点, 其成药性已得到充分验证^[1]. 如图1所示, 目前全球共有25款靶向病毒蛋白酶的抗病毒药物获批上市, 覆盖

三大重要病原体: 人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus, HIV)、丙型肝炎病毒(hepatitis c virus, HCV)和严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2). 其中, 靶向HIV蛋白酶的推动艾滋病从致死性疾病转向慢性病管理^[2]; 针对HCV NS3/4A蛋白酶的上市药物实现HCV治愈率突破95%的里程碑^[3,4], 3C样(3C-like, 3CL)蛋白酶抑制剂更是在2019新型冠状病毒(简称“新冠”)感染大流行中取得“从实验室研发到临床应用”的突破性进展, 在疫情防控中发挥着重要作用^[5].

引用格式: Xiong M, Nie T, Su H, Xu Y. Structure-based rational design of viral protease inhibitors: case studies of approved drugs. *Sci Sin Chim*, 2025, 55: 2392–2420, doi: 10.1360/SSC-2025-0133

靶向病毒蛋白酶的新药研发过程中, 基于结构的药物设计(structure-based drug design, SBDD)发挥了

重要作用. SBDD通过解析蛋白酶三维结构, 揭示底物结合口袋结构特征及催化机制, 为理性药物设计提供

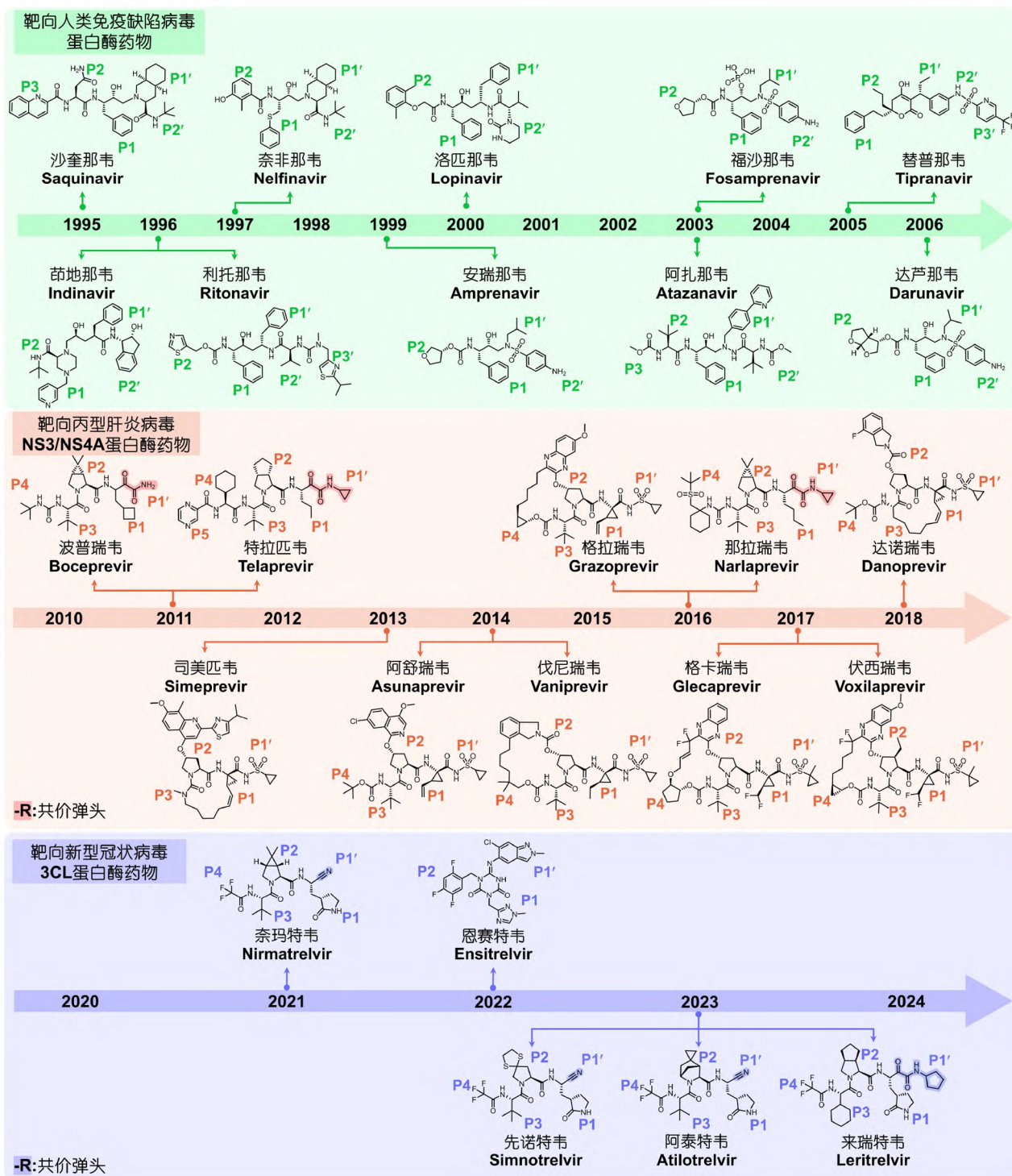


图 1 (网络版彩图)病毒蛋白酶抑制剂的结构及其作为抗病毒药物获批上市时间轴
Figure 1 (Color online) Structures of protease inhibitors and timeline for their approval as antiviral drugs.

蓝图。从20世纪80年代开始,以HIV蛋白酶晶体结构为基础设计并优化获得多个上市的HIV蛋白酶抑制剂^[6-8],是SBDD早期应用的典型案例。此次新冠疫情中,奈玛特韦^[5,9]、恩赛特韦^[10]和先诺特韦^[11]等多个SARS-CoV-2 3CL蛋白酶抑制剂的快速上市,彰显了SBDD在开展新发传染病防控药物研发中的技术优势及在应对突发公共卫生事件中的战略价值。

本文将聚焦HIV蛋白酶、HCV NS3/4A蛋白酶及SARS-CoV-2 3CL蛋白酶三类核心靶点,系统综述其底物识别、三维结构特征及催化机制,重点解析SBDD驱动的代表性药物研发案例,深入探讨其在未来抗病毒药物研发领域中的发展趋势与应用前景,以期为新发和再发病毒性疫情防控策略的制定提供依据与技术支持。

2 病毒蛋白酶的结构特征与功能机制

2.1 生物学功能

HIV为逆转录病毒科单股正链RNA病毒,包括HIV-1和HIV-2两个亚型,其中HIV-1为全球主要流行株^[12]。HIV基因组包含三个结构基因——*gag*、*pol*和*env*,分别编码核心蛋白、病毒多聚酶和外膜蛋白^[13]。HIV蛋白酶(protease, PR)通过水解*gag*和*gag-pol*编码的前体蛋白(图2),释放基质蛋白(matrix protein, MA)、衣壳蛋白(capsid protein, CA)、核衣壳蛋白(nucleocapsid protein, NC)和病毒复制过程中的必需蛋白,包括PR本身、逆转录酶(reverse transcriptase, RT)和整合酶(integrase, IN)等。若抑制这一过程,病毒将无法形成具有传染性的成熟颗粒^[14]。

HCV为黄病毒科单股正链RNA病毒,其基因易变

异,至少可分为8个基因型(genotype, gt)及57个亚型^[15]。其中,gt1b型HCV在我国占据主导地位(占比约56.8%),其次为gt2和gt3型,而gt4~6型则较为少见^[16]。HCV NS3/4A蛋白酶具有多重功能,除了可以切割病毒多聚蛋白外(图2),还能够作用于先天免疫应答的两个宿主蛋白——线粒体抗病毒信号蛋白(mitochondrial antiviral signaling protein, MAVS)和含TIR结构域接头诱导干扰素-β蛋白(tir domain-containing adaptor-inducing interferon-β, TRIF),从而破坏干扰素信号通路,实现免疫逃逸^[17]。

SARS-CoV-2则为冠状病毒科单股正链RNA病毒^[18],流行毒株的进化路径依次为Alpha、Beta、Gamma、Delta及Omicron变体^[19]。其中,3CL蛋白酶负责切割病毒多聚蛋白pp1a/pp1ab的11个位点(图2),释放非结构蛋白,从而调控转录复制复合体的组装^[20]。

2.2 底物识别机制

蛋白酶通过底物识别机制实现功能特异性。按照Schechter-Berger规则^[21],以切割位点为界,底物序列被命名为“(氨基端/N端)···P2、P1 ↓ P1'、P2'···(羧基端/C端)”,蛋白酶底物结合腔的亚位点相应地被命名为“···S2、S1、S1'、S2'···”。

HIV蛋白酶在底物识别中的特异性较弱,其底物中P4-P3'位序列保守性普遍较低(图3)^[22,23]。该酶倾向于在疏水性残基富集的位点进行切割,如P1位苯丙氨酸(Phe)与P1'位脯氨酸(Pro)之间。相较而言,P2和P2'位则显示出对极性残基(如天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln))的选择性偏好。

相较于HIV蛋白酶,HCV NS3/4A蛋白酶的底物识别特异性有所提高(图4),具体表现为P1与P1'位的高度

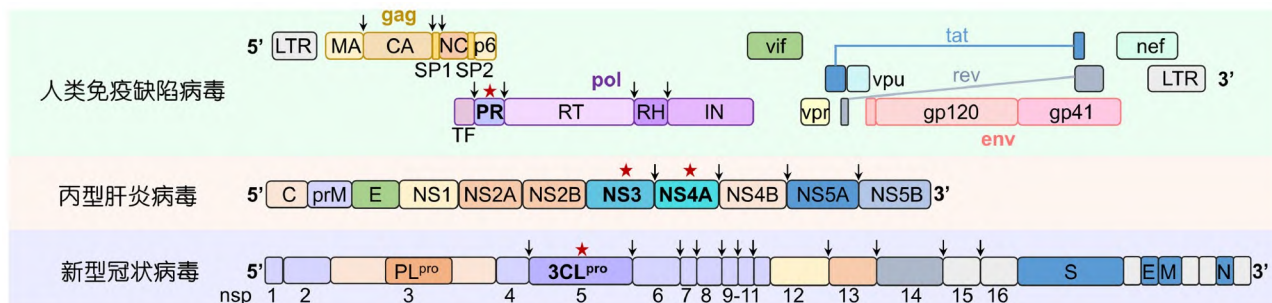


图2 (网络版彩图) HIV-1、HCV与SARS-CoV-2多聚蛋白前体及蛋白酶(红星标识)切割位点(黑色箭头标识)示意图

Figure 2 (Color online) Schematic diagram of protease (marked as red stars) cleavage sites (marked as black arrows) in polyproteins of HIV-1, HCV, and SARS-CoV-2.

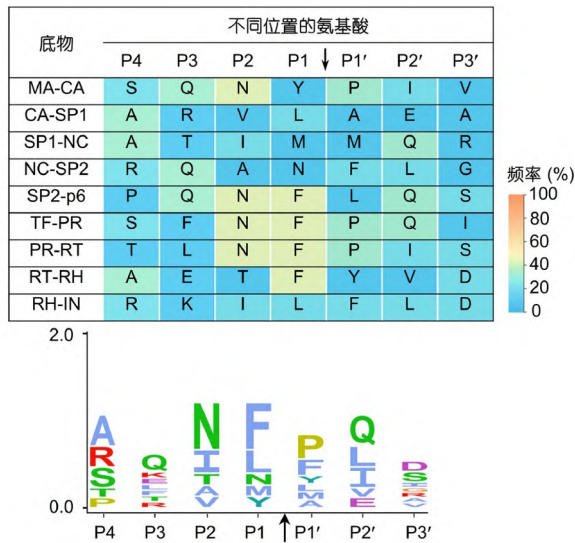


图3 (网络版彩图) HIV-1蛋白酶的底物识别位点序列保守性

Figure 3 (Color online) Sequence conservation of substrate recognition sites of HIV-1 protease.

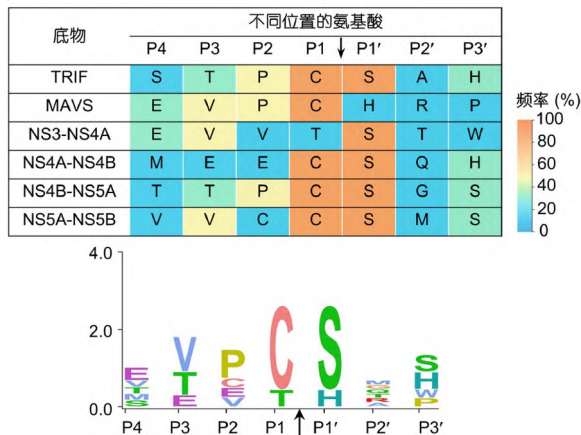


图4 (网络版彩图) gt1b型HCV NS3/4A蛋白酶的底物识别位点序列保守性

Figure 4 (Color online) Sequence conservation of substrate recognition sites of HCV (gt1b) NS3/4A protease.

保守性(分别为半胱氨酸(Cys)和丝氨酸(Ser)), 以及P3(缬氨酸, Val)、P2(脯氨酸)位的次强保守特征^[17,24]。

有趣的是, 尽管SARS-CoV-2 3CL蛋白酶识别的切割位点数量最多(共11个), 却是这三类病毒蛋白酶中底物特异性最高的一类(图5)。它对P1位谷氨酰胺Gln具有严格的特异性识别能力, 同时P2位由疏水性残基亮氨酸(Leu)主导, 而P1'位则偏好小体积残基(如丝氨

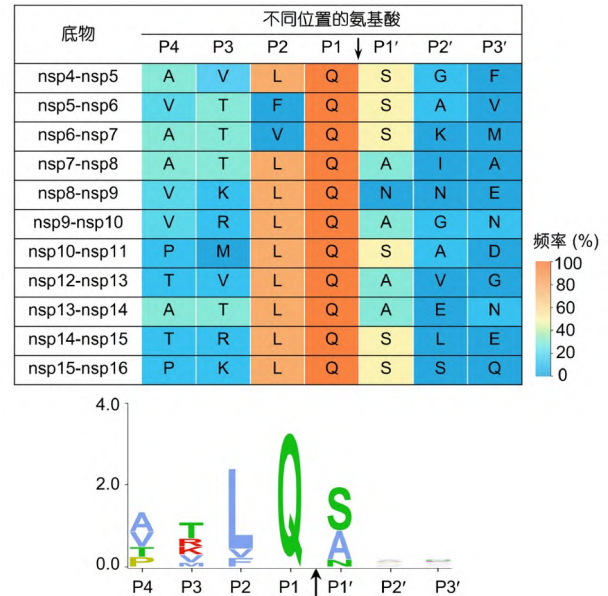


图5 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的底物识别位点序列保守性

Figure 5 (Color online) Sequence conservation of substrate recognition sites of SARS-CoV-2 3CL protease.

酸, Ser)^[20,25,26]。

病毒蛋白酶抑制剂通过模拟底物结合而阻断蛋白酶切割功能, 进而抑制病毒复制, 这使得底物模拟策略成为高效开发抑制剂的首选。底物序列中蕴含的关键结构特征, 如保守残基、切割位点构型等, 为拟肽类抑制剂的理性设计提供了重要线索。

2.3 三维结构及底物结合口袋

HIV蛋白酶属于天冬氨酸蛋白酶家族, 以同源二聚体形式存在, 其活性中心位于二聚界面处, 包含两个对称的Asp25-Thr26-Gly27催化三联体(图6a)^[2]。底物结合口袋上方的动态Flap区(残基45~55, 甘氨酸富集的β片)的构象变化与底物结合密切相关: 在无配体(底物/抑制剂)时呈打开状态(PDB编号: 1HHP), 此时两个Asp25催化残基与水分子形成氢键网络; 当配体进入活性位点后, 与Flap区和催化残基形成多重相互作用, 使得Flap区处于闭合构象(PDB编号: 2AOI)^[27,28]。由于底物结合通道位于C2对称的二聚界面, 故而具备对称性, 两个疏水亚位点(S1/S1')及两个极性亚位点(S2/S2')均呈现对称分布。模拟SP2-p6底物间切割位点序列(P5-P5')的拟肽(1)的主链酰胺键与Gly27、

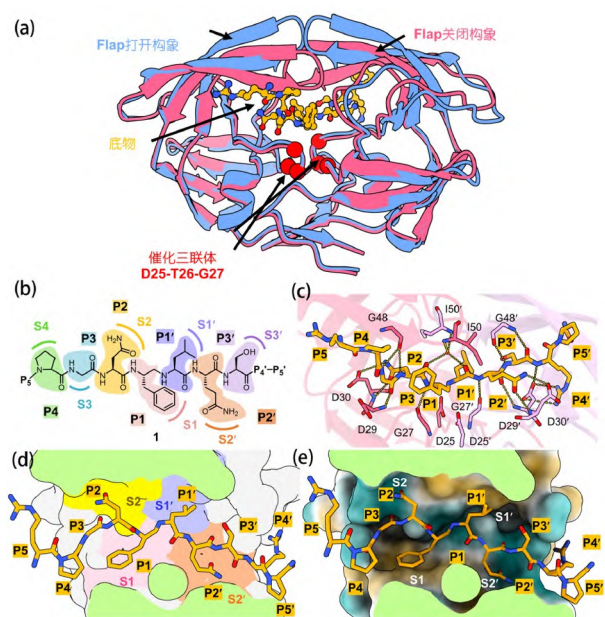


图 6 (网络版彩图) HIV蛋白酶三维结构与底物结合机制示意图: 配体结合/游离状态、结合模式及亚位点分布. (a) HIV蛋白酶Flap呈现打开/关闭构象的三维结构图. (b) 底物的化学结构. (c) 底物与蛋白酶的结合模式图. (d) 底物结合亚位点的分布表面图. (e) 底物结合区域的疏水性分布表面图

Figure 6 (Color online) Three-dimensional structures and substrate binding mechanism of HIV protease: ligand-bound/apo structures, ligand binding mode, and subsites. (a) Three-dimensional structures of HIV protease with open/closed conformations of the Flap. (b) Chemical structure of the substrate. (c) The substrate-protease binding mode. (d) Surface representation of substrate-binding subsites. (e) Surface representation of the hydrophobicity in the binding pocket.

Asp30、Gly48及Ile50形成多重氢键, 同时Gly27'/Asp30'/Gly48'/Ile50'参与对称结合, 而拟肽残基侧链则与Asp29/Asp30及Asp29'/Asp30'产生极性相互作用(图6b~e).

HCV NS3/4A蛋白酶属于丝氨酸蛋白酶家族, 为异源二聚体. NS3的N端蛋白酶结构域与NS4A辅因子结合后, 形成由His57、Asp81和Ser139组成的催化三联体活性中心, 锌指结构域(Cys97、Cys99、Cys145和His149)的存在进一步稳定蛋白酶构象(图7a). NS3/4A蛋白酶突变体(S139A)与底物的复合物晶体结构(PDB编号: 3M5N)显示其包含一个平坦和溶剂高度可及的活性位点^[24]. 其中, 识别较为保守的P1位、P1'位残基的S1、S1'亚位点具有较深的疏水孔腔, 而S2~S4亚位点则比较平坦. 由于S2~S4平坦区域与S1/S1'深腔的疏水锚定协同不足, 小分子难以形成稳定结合. 同时, 该

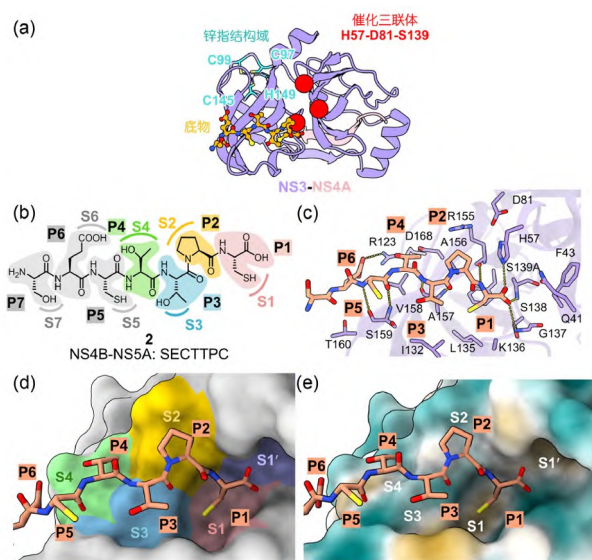


图 7 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶三维结构、底物结合模式及底物结合亚位点示意图. (a) HCV NS3/4A蛋白酶的三维结构图. (b) 底物的化学结构. (c) 底物与蛋白酶的结合模式图. (d) 底物结合亚位点的分布表面图. (e) 底物结合区域的疏水性分布表面图

Figure 7 (Color online) Three-dimensional structures, substrate binding mode, and subsites of HCV NS3/4A protease. (a) Three-dimensional structure of HCV NS3/4A protease. (b) Chemical structure of the substrate. (c) The substrate-protease binding mode. (d) Surface representation of substrate-binding subsites. (e) Surface representation of the hydrophobicity in the binding pocket.

区域主要依赖弱范德华力及动态水分子介导的相互作用, 使得配体采取高能构象, 因此该蛋白酶的结合口袋为设计高选择性、高成药性和强效的HCV NS3/4A蛋白酶小分子抑制剂带来巨大挑战.

以NS3/4A蛋白酶切割NS4B~NS5A之间的底物序列(2, SECTTPC (P7~P1))的结合模式为例, 底物主链的酰胺键和蛋白酶His57、Arg155、Ala157及Ser159残基形成氢键, 底物侧链则主要与蛋白酶残基形成疏水相互作用; P1位半胱氨酸残基的巯基与蛋白酶氧阴离子孔穴(Ser139和Gly137主链NH)形成多重氢键, P6位谷氨酸残基和蛋白酶Arg123残基形成盐桥(图7b~e).

SARS-CoV-2 3CL蛋白酶以同源二聚体形式发挥功能, 一个单体的N端插入另一单体的底物结合口袋, 形成活性二聚体(图8a). 其底物结合口袋由结构域I和II之间的浅表裂缝构成, 这个敞开且狭长的口袋主要由两个较深的极性亚位点S1和疏水亚位点S2、两个较浅的亚位点S1'和S4, 以及一个溶剂可及的亚位点S3组成^[20]. 在结合位点处有两个保守元件——催化二联

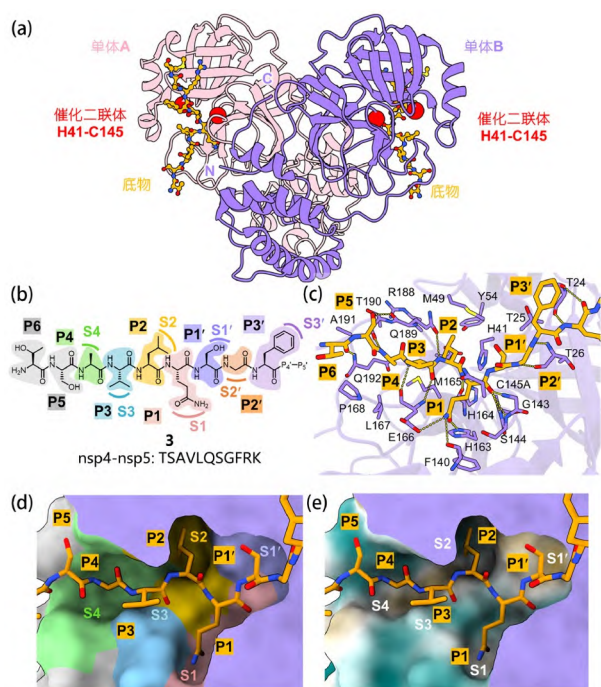


图 8 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶三维结构、底物结合模式及底物结合亚位点示意图。(a) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的三维结构图。(b) 底物的化学结构。(c) 底物与蛋白酶的结合模式图。(d) 底物结合亚位点的分布表面图。(e) 底物结合区域的疏水性分布表面图

Figure 8 (Color online) Three-dimensional structures, substrate binding mode, and subsites of SARS-CoV-2 3CL protease. (a) Three-dimensional structure of SARS-CoV-2 3CL protease. (b) Chemical structure of the substrate. (c) The substrate-protease binding mode. (d) Surface representation of substrate-binding subsites. (e) Surface representation of the hydrophobicity in the binding pocket.

体(His41-Cys145)和氧阴离子孔穴(G143、S144和C145主链NH)。底物(3, nsp4-nsp5之间的切割位点序列)和蛋白酶突变体(C145A)的复合物晶体结构(PDB编号: 7T70)^[25]显示(图8b-e), 底物高度保守的P1位谷

氨酰胺通过三根氢键与S1亚位点(Phe140/His163/Glu166)相互作用; 底物主链则与Thr24、Thr26、Gly143、Ser144、Cys145、His164、Glu166、Gln189、Thr190及Gln192形成多氢键网络; 同时, P1-P1'的酰胺键羰基精准锚定于氧阴离子孔穴。

尽管HIV蛋白酶、HCV NS3/4A蛋白酶与SARS-CoV-2 3CL蛋白酶均以二聚体形式发挥功能, 但其拓扑结构存在差异。HIV蛋白酶作为C2对称同源二聚体, 其底物结合口袋定位于二聚界面, 呈现对称的隧道状腔体, 较为封闭。相比之下, HCV NS3/4A作为异源二聚体, 底物结合口袋呈现平坦且敞开的特征。而SARS-CoV-2 3CL蛋白酶虽为同源二聚体, 但底物结合口袋位于每个单体的两个结构域之间半开放的裂隙(表1), 即包含两个底物结合口袋。这些结构特性为靶向各种蛋白酶的抗病毒药物设计提供了关键结构依据。

2.4 催化机制

HIV蛋白酶的催化机制依赖于同源二聚体中的两个关键催化残基Asp25-Asp25'。催化过程中, Asp25(单体A)作为广义碱激活水分子, 随后水分子的氧进攻底物P1-P1'肽键的羰基碳原子, 而Asp25'(单体B)作为广义酸将质子转移至底物肽键的氮原子, 形成高反应活性的四面体过渡态, 随后肽键断裂并释放切割后产生的氨基和羧基产物, Asp25和Asp25'继续共享一个质子, Flap区重新开放, 水分子再次进入活性位点, 从而完成催化循环(图9)^[29,30]。

HCV NS3/4A蛋白酶的催化活性依赖于His57、Asp81和Ser139组成的催化三联体。催化反应始于His57从Ser139的羟基夺取质子, 生成强亲核的氧阴离子(Ser139-O⁻)^[31,32]。该氧阴离子亲核进攻底物肽键的羰基碳, 形成四面体过渡态。随后, His57将质子转移

表 1 HIV蛋白酶、HCV NS3/4A蛋白酶和SARS-CoV-2 3CL蛋白酶异同点

Table 1 Comparative analysis of HIV protease, HCV NS3/4A protease and SARS-CoV-2 3CL protease

病毒	病毒类型	蛋白酶	蛋白酶家族	活性聚集状态	底物	底物识别保守序列	功能
人类免疫缺陷病毒	逆转录病毒科 单股正链RNA病毒	蛋白酶	天冬氨酸	同源二聚体	<i>gag/gag-pol</i> 编码的多聚蛋白	Phe↓Pro	生成病毒结构蛋白, 促进病毒颗粒成熟
丙型肝炎病毒	黄病毒科 单股正链RNA病毒	NS3/4A 蛋白酶	丝氨酸	异源二聚体	病毒多聚蛋白及宿 主蛋白MAVS/TRIF	Pro-Cys↓Ser	病毒蛋白加工与宿 主免疫逃逸
新型冠状病毒	冠状病毒科 单股正链RNA病毒	3CL 蛋白酶	半胱氨酸	同源二聚体	<i>pp1a/pp1ab</i> 多聚蛋白	Leu-Gln↓Ser	生成病毒非结构蛋 白, 调控病毒复制

至底物P1-P1'肽键的氮原子, 导致肽键断裂并释放切割后产生的氨基产物, 完成酰化过程. 接着, His57夺取进入活性位点内水分子的质子, 促使水分子的氧进攻酰基-酶共价中间体的羰基碳, 最终释放羧基产物并再生游离的Ser139-OH, 使酶恢复至催化起始构象(图10).

SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的催化核心由二联体His41-Cys145构成, 但有研究发现His41附近存在水分子, 桥接其和Asp187, 从而稳定His41的构象, 可能起到第三个催化残基的作用^[33~35]. 在底物结合过程中,

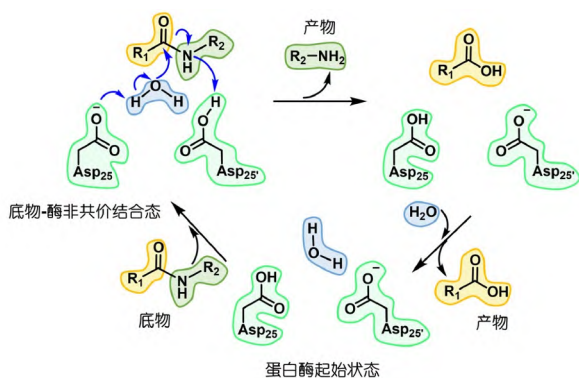


图9 (网络版彩图) HIV蛋白酶的催化机制示意图

Figure 9 (Color online) Schematic diagram for the catalytic mechanism of HIV protease.

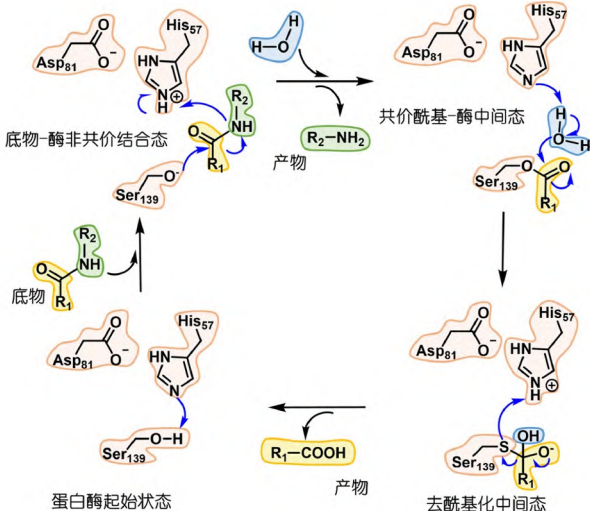


图10 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶的催化机制示意图

Figure 10 (Color online) Schematic diagram for the catalytic mechanism of HCV NS3/4A protease.

His41作为碱从Cys145的巯基(-SH)夺取质子, 生成亲核性硫醇盐离子(Cys145-S⁻). 该硫醇盐离子进攻底物肽键的羰基碳, 形成共价硫酯键中间体, 同时His41将质子转移至底物P1-P1'肽键的氮原子以促进肽键断裂, 释放氨基产物. 随后, 水分子攻击硫酯键中间体, 释放羧基产物并再生游离的Cys145-SH (图11).

尽管HIV蛋白酶(天冬氨酸型)、HCV NS3/4A蛋白酶(丝氨酸型)和SARS-CoV-2 3CL蛋白酶(半胱氨酸型)分属不同类型的蛋白酶家族(表1), 但其催化切割底物的分子机制均通过形成四面体过渡态完成. 此共性特征为抗病毒蛋白酶抑制剂的理性设计提供了过渡态模拟和共价弹头靶向的普适性策略. 当然, 病毒蛋白酶在活性位点极性/疏水性质、结合口袋拓扑、动态构象及耐药突变热点上的差异, 是开发高特异性抑制剂需综合考量的关键因素.

3 批准上市的HIV蛋白酶抑制剂研发案例剖析

自1983年鉴定HIV为艾滋病的病原体以来^[36,37], 已有10种靶向HIV蛋白酶的药物批准上市(图1), 这些非共价的蛋白酶抑制剂主要采用SBDD与过渡态模拟策略实现高效开发. 针对耐药突变(I50L/V、V82A、I84V等)^[38]引发的药物结合口袋构象变化, 研究者进一步通过增强抑制剂与蛋白酶主链的结合(backbone-binding, “主链结合”)策略实现野生型及突变型蛋白酶的双重抑制^[39,40]. 基于化学结构特征, 现有批准上市的HIV蛋白酶抑制剂可分为拟肽和非拟肽两大类.

3.1 拟肽类

3.1.1 沙奎那韦

沙奎那韦(Saquinavir, 9)是首个基于HIV蛋白酶晶体结构设计而获批上市的蛋白酶抑制剂(1995年上市), 其成功研发验证了基于靶标蛋白结构进行药物设计的有效性. 罗氏公司研发团队^[7]基于HIV蛋白酶的晶体结构, 采用模拟过渡态策略, 将P1-P1'肽键替换为羟乙胺基(非水解的过渡态电子等排体). 首先将五肽底物(4)截短为P1-P1'二肽片段并引入羟乙胺基替代原肽键, 同时采用保护基团封闭拟肽的N端和C端, 获得初始化合物5 (图12). 尽管该化合物对HIV蛋白酶的抑制活性较弱, 半数抑制浓度(IC₅₀)为6.5 μM, 但在P2位插入天

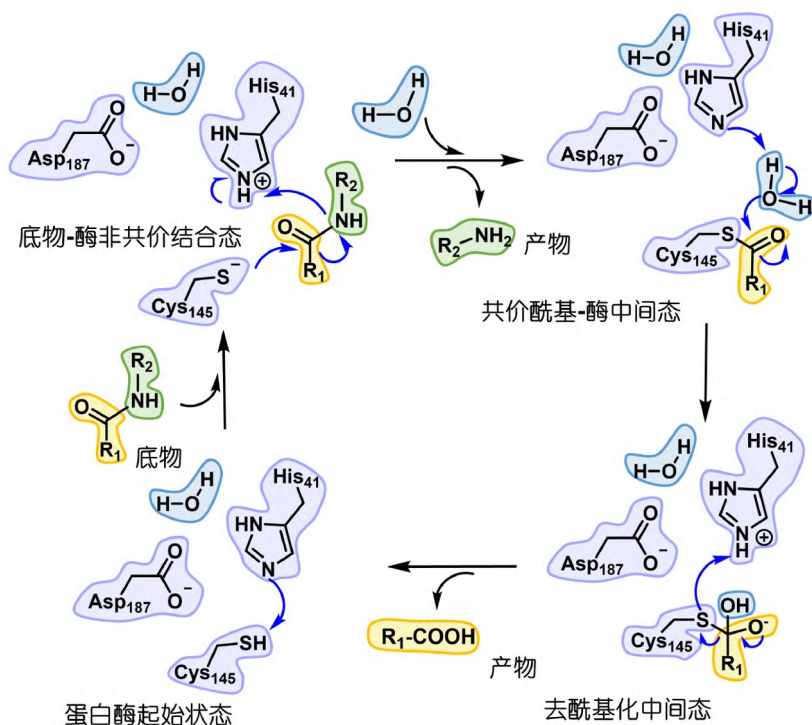


图 11 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的催化机制示意图

Figure 11 (Color online) Schematic diagram for the catalytic mechanism of SARS-CoV-2 3CL protease.

冬酰胺(Asn)后得到化合物6, 其活性显著提升46倍, 并发现R构型羟乙胺基的立体选择性优势. 在确定最小活性拟肽骨架后, 研发团队对化合物P3-P2'位展开优化: P3位替换为喹啉-2-基, 通过增强疏水相互作用使化合物7的抑制活性跃升至23 nM; P1'位采用哌啶环而获得化合物8, IC_{50} 进一步提升至18 nM; P2和P1位最优选仍为天冬酰胺和苯丙氨酸侧链基团. 最后, 通过整合各个优势基团, 并将P1'位采用更大疏水基团(十氢异喹啉结构基团), 得到化合物9 (Saquinavir, Ro 31-8959), 展现出对HIV-1和HIV-2蛋白酶的强效抑制($IC_{50} < 0.8$ nM). 沙奎那韦的获批及其与逆转录酶抑制剂的联合用药, 标志着高效抗逆转录病毒治疗(high active antiretroviral therapy, HARRT), 即“鸡尾酒”疗法的开始^[2].

复合物晶体结构表明: 沙奎那韦通过其羟乙基氧原子精准模拟了底物P1-P1'肽键羰基氧原子, 插入 Asp25/Asp25'双酸催化残基对之间, 与两个残基的羧酸基团形成氢键网络(图13)^[41]. 在结合口袋中, 抑制剂主链与蛋白酶形成了类似底物的相互作用: 主链原子不仅通过水分子介导与Ile50/Ile50'残基形成氢键, 还

与Gly27、Gly48以及Asp29三个残基主链形成多重氢键. 疏水相互作用方面, P1位苯丙氨酸的芳香环完美贴合S1疏水亚位点, P1'位十氢异喹啉基团则通过顺式构象适配S1'亚位点的疏水拓扑结构.

3.1.2 利托那韦

受到HIV蛋白酶晶体结构中底物结合口袋呈现C2对称的结构特征启发, 雅培制药公司研发团队^[42]提出利用对称性策略设计新型抑制剂. 相较于传统底物衍生的拟肽类抑制剂, 此类C2对称主链骨架的类肽分子可能区别于天然底物, 从而具备更好的药代动力学特性. 在具体设计中(图14), 以P1(Phe)-P1'(Pro)二肽的四面体过渡态为模板, 将对称轴定位于水解羰基碳及其附近, 构建了两种C2对称的核心骨架A与B. 通过在A和B的P2和P2'位引入缬氨酸, 并在P3和P3'位以苄氧羰基封闭N端和C端, 分别获得化合物10 ($IC_{50} = 3$ nM)与11 ($IC_{50} = 0.22$ nM). 其中B型骨架展现出显著增强的抑制活性, 因此进一步的结构优化聚焦于高活性分子11. 尽管P3、P2'和P3'位的优化使得化合物12抗病毒活性进一步增强, 但其在大鼠体内的口服生物利用度

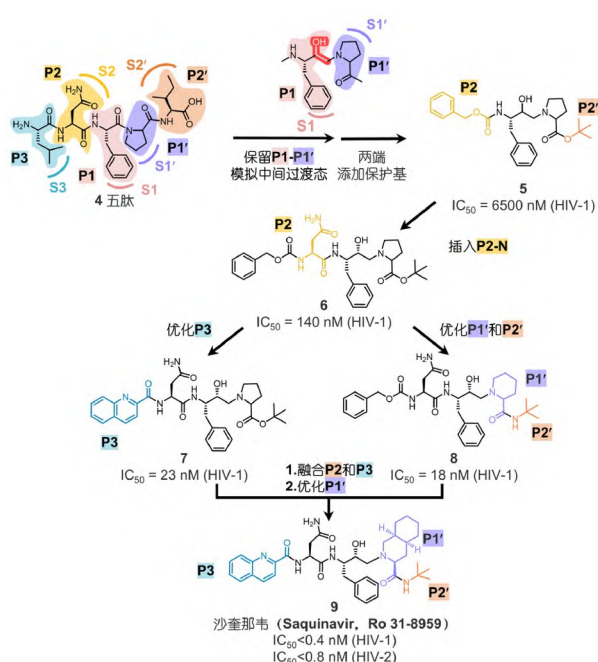


图 12 (网络版彩图)沙奎那韦的设计理念与优化路径
Figure 12 (Color online) Design and optimization routes of Saquinavir.

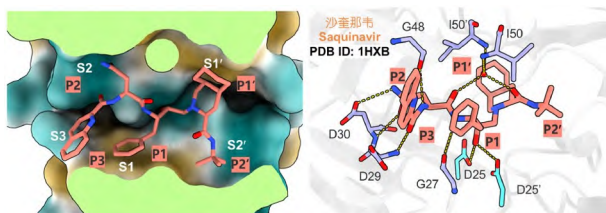


图 13 (网络版彩图) HIV-1蛋白酶与沙奎那韦的结合模式
Figure 13 (Color online) Binding mode of Saquinavir with HIV-1 protease.

仅为0.7%^[43]. 而通过删除化合物11 P1-P1'之间的一个羟基和P2位的缬氨酸, 并采用吡啶基团封闭末端, 化合物13 (A-80987)的口服生物利用度提升至26%^[8,44].

经代谢物鉴定, 化合物13的吡啶基团氮原子易发生氧化, 故在P2/P3'位引入代谢稳定性更优的噻唑基团. 其中, P2位噻唑氮原子与蛋白酶Asp30主链形成特异性氢键, P3'位噻唑环和异丙基取代基则与Pro81'/Val82'侧链形成疏水作用(图15). 同时, *N*-甲基脲基的引入有效提高了溶解性. 最终获得的利托那韦(14, Ritonavir, ABT-538)表现出优异抗病毒活性(半数效应浓度 $EC_{50} = 0.025 \mu\text{M}$)与良好的口服生物利用度(78%)^[8], 于1996年作为HIV蛋白酶抑制剂获批上市.

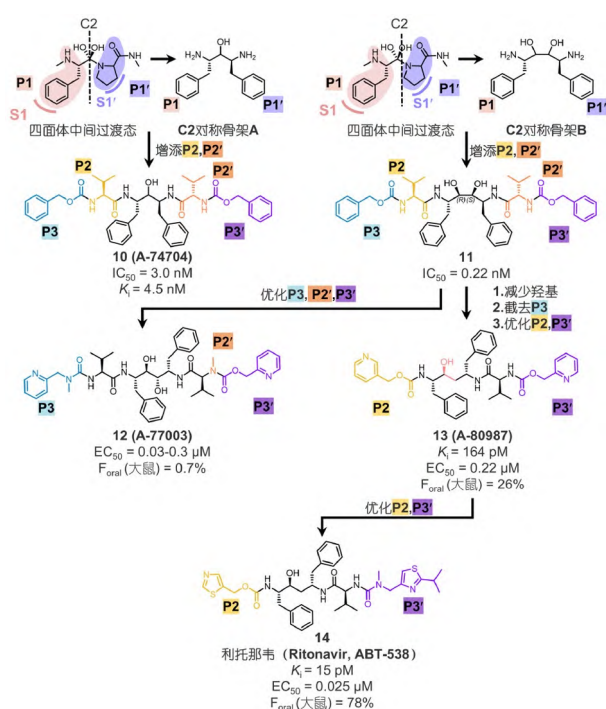


图 14 (网络版彩图)利托那韦的设计理念与优化路径
Figure 14 (Color online) Design and optimization routes of Ritonavir.

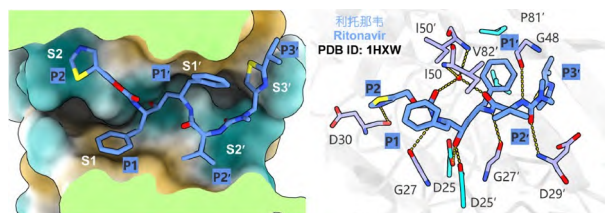


图 15 (网络版彩图) HIV-1蛋白酶与利托那韦的结合模式
Figure 15 (Color online) Binding mode of Ritonavir with HIV-1 protease.

有趣的是, 后续研究发现利托那韦与其他蛋白酶抑制剂不同, 其能将药物转运至胞外, 并有效抑制细胞色素P450 3A4 (cytochrome P450 3A4, CYP3A4)——该酶被确认为蛋白酶抑制剂的主要代谢酶^[45]. 基于这一特性, 利托那韦当前主要作为药代动力学增强剂, 通过联合用药, 改善其他药物的血浆暴露量, 而非直接发挥蛋白酶抑制功能.

3.1.3 达芦那韦

第一代的数个HIV蛋白酶抑制剂虽有突出的靶标结合亲和力, 其临床应用却受到口服生物利用度低、

胃肠道不良反应及耐药突变易发的多重挑战, 这推动了第二代蛋白酶抑制剂的研发进程^[2]. 关于HIV蛋白酶的耐药突变, 可分为主要(major)和次要(minor)突变: 前者通过直接干扰药物-靶标的相互作用而降低抑制效率, 后者则通过补偿机制维持病毒适应性, 但二者的界限并不十分明确^[46-48]. 主要突变的耐药机制又可分为以下几种: (1) 活性位点邻近残基突变(如V82A、I84V)直接干扰抑制剂的结合^[47]; (2) 二聚化调控区域残基突变(如F150L/V)改变亚基间相互作用而影响二聚体稳定性^[49]; (3) 远端残基如L76V突变通过长程效应引发关键位点产生结构重排, 既削弱二聚体稳定性又降低抑制剂的结合^[50].

美国普渡大学的Ghosh等^[51]基于沙奎那韦(9)与HIV蛋白酶复合物的模型结构, 系统地开展了基于结构的药物设计: 首先通过减少肽类特征和引入“主链结合”创新策略, 成功开发出具有高耐药屏障的第二代HIV蛋白酶抑制剂达芦那韦. 研发团队推测沙奎那韦分子中过多的肽类特征可能是导致药代动力学性质不佳的关键因素, 因此采用环醚基团替代酰胺基团. 这一设计灵感源于两类生物活性天然产物——离子载体抗生素莫能菌素(15)和血小板激活因子拮抗剂银杏内酯B(16), 二者均以环醚结构为核心药效团, 并兼具优异的生物利用度特征(图16)^[52,53]. 在具体结构优化过程中, 研发团队首先将(R)-四氢呋喃-3-基甘氨酸引入沙奎那韦的P2位(天冬酰胺残基), 所得化合物17的酶抑制活性显著提升($IC_{50} = 0.05 \text{ nM}$)^[51]. 为进一步降低分子量并减少酰胺键数量, 通过去除P3-喹啉基团获得分子量仅515 Da、酰胺键数量减少的氨基甲酸酯衍生物18 ($IC_{50} = 132 \text{ nM}$), 该化合物成为后续开发的重要先导结构^[54]. 基于Vazquez等^[55]针对羟乙胺磺酰胺类化合物的研究, 将(S)-四氢呋喃-3-氨基甲酸酯引入其分子骨架, 最终推动安瑞那韦(19, Amprenavir)/福沙那韦(安瑞那韦前药)获批上市^[56]. 复合物晶体结构解析表明, 四氢呋喃氧原子与Asp29、Asp30的主链氮原子形成关键但较弱的氢键相互作用(图17a).

在前期研究基础上, 研发团队^[57,58]进一步设计了具有明确立体构型的六氢呋喃并[2,3-*b*]呋喃-3-基((3*R*,3*aS*,6*aR*)-hexahydrofuro[2,3-*b*]furan-3-yl, bis-THF)作为P2基团, 显著增强了P2位与S2亚位点的结合能力. 所得抑制剂20的活性较单环结构大幅提升(图16), 计算机模拟建模(模建)的复合物结构提示bis-THF基团

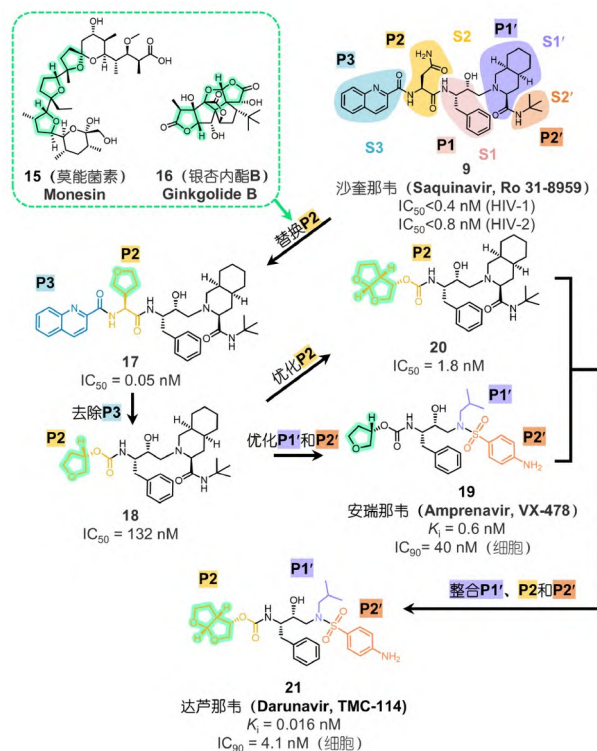


图16 (网络版彩图)达芦那韦的设计理念与优化路径

Figure 16 (Color online) Design and optimization routes of Darunavir.

与Asp29、Asp30形成了更优的氢键网络, 但该化合物未能与S2'亚位点残基建立有效相互作用. 为全面应对耐药性问题, 研究重点转向通过“主链结合”策略强化配体与蛋白酶S2至S2'亚位点骨架原子的氢键作用, 系统探索了bis-THF基团与多种P2'位(R)-羟乙基磺酰胺等排体的组合模式. 在众多候选分子中, 达芦那韦(21, Darunavir, TMC-114)凭借独特耐药屏障特征脱颖而出, 其对多种药物耐药的HIV毒株保持抑制活性^[39,59,60]. 该候选药物随后由强生公司的子公司泰博特克完成临床研究, 于2006年获批用于有用药经验的成人患者, 2008年及2013年适应证先后扩展至初治患者与儿童群体.

达芦那韦的分子作用机制研究^[61]揭示了其产生卓越抗耐药性的结构基础(图17b): bis-THF基团与Asp29、Asp30主链形成多重氢键; P2'位与S2'亚位点的Asp30'侧链建立氢键网络; 羟基通过模拟过渡态与催化残基Asp25/Asp25'产生强相互作用. 此外, 氨基甲酸酯的NH基团与Gly27主链羰基形成氢键, 其羰基氧原子和磺酰基氧原子一起, 通过水分子与Flap区残基

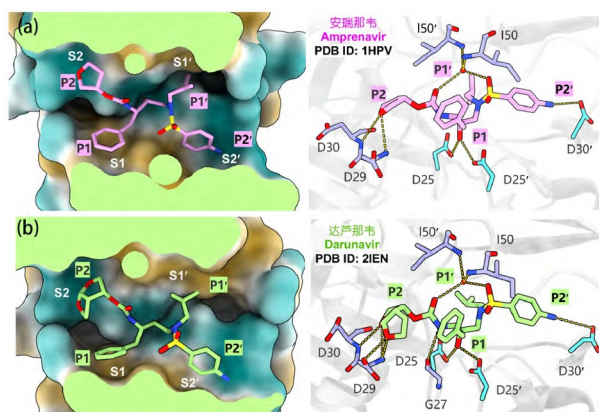


图 17 (网络版彩图) HIV-1蛋白酶与(a) 安瑞那韦、(b) 达芦那韦的结合模式

Figure 17 (Color online) Binding modes of (a) Amprenavir and (b) Darunavir with HIV-1 protease.

Ile50/Ile50'主链建立间接作用。P1/P1'位的异丁基和苄基则通过疏水作用显著增强结合力。这种多层次、多维度的相互作用模式，特别是与蛋白酶主链原子的广泛结合特征，确立了“主链结合”的创新设计理念，为克服HIV药物耐药性提供了突破性解决方案^[39,62,63]。

此外，达芦那韦的抗耐药特性与“底物包膜”(substrate envelope)假说具有高度契合性。该假说作为基于病毒蛋白酶底物识别模式的抗病毒药物设计理念，旨在预防和减少耐药性的产生。其核心观点认为：尽管病毒蛋白酶的天然底物序列多样性显著，但它们在蛋白酶活性位点中占据了一个重叠的共有体积，这一保守空间被定义为“底物包膜”。当蛋白酶突变残基位于该区域时，抑制剂亲和力的降低会同步削弱底物结合能力，导致酶活性下降；若抑制剂超出“底物包膜”范围，则易引发耐药突变^[24]。值得注意的是，达芦那韦虽非依据该假说而开发，但其分子构型完全位于“底物包膜”内^[64]，这从结构生物学角度阐释了其多种耐药毒株保持活性的分子机制。

3.2 非拟肽类

由于拟肽类HIV蛋白酶抑制剂存在药代动力学局限性(如口服生物利用度较低或清除速率快)及合成工艺复杂等问题，推动研究者转向开发100%非拟肽小分子抑制剂，最终成功获得同样作为第二代HIV蛋白酶抑制剂的替普那韦(26, Tipranavir, U-140690)。

Upjohn公司研发团队^[65]通过高通量筛选化合物库和相似性搜索，鉴定苯丙香豆素(22)为新型先导化合物骨架。该化合物对HIV蛋白酶抑制活性较弱($K_i = 1 \mu\text{M}$)，但合成制备较为简单(图18)。基于化合物22的衍生物22a与HIV蛋白酶的复合物晶体结构^[66]分析，发现香豆素苯环刚性导致其与S1亚位点结合能力不足(图19a)。

为此，研发团队^[67,68]分别采用环辛烷取代化合物22中苯并吡喃酮母核的苯环以增强分子柔性，或者使用吡咯酮骨架分支取代苯并吡喃酮骨架，由此获得的化合物23和24活性显著提升(K_i 分别为15和35 nM)，其中23的环辛烷占据了S1亚位点，而24则同时结合S1和S2亚位点。进一步在化合物23中引入磺酰胺基团得到化合物25，其抑制活性跃升至0.8 nM，细胞抗病毒活性同步增强，其类似物25a与HIV-1蛋白酶的复合物晶体结构显示末端苯环精准占据S3'亚位点(图19b)^[69]。对化合物24进行类似结构改造，通过添加5-(三氟甲基)吡啶-2-磺酰胺基团并构建双R构型手性中心，最终获得替普那韦(Tipranavir, U-140690, 26)^[70]，其对HIV-1蛋白酶亲和力较化合物24提升超4000倍(细胞抗病毒

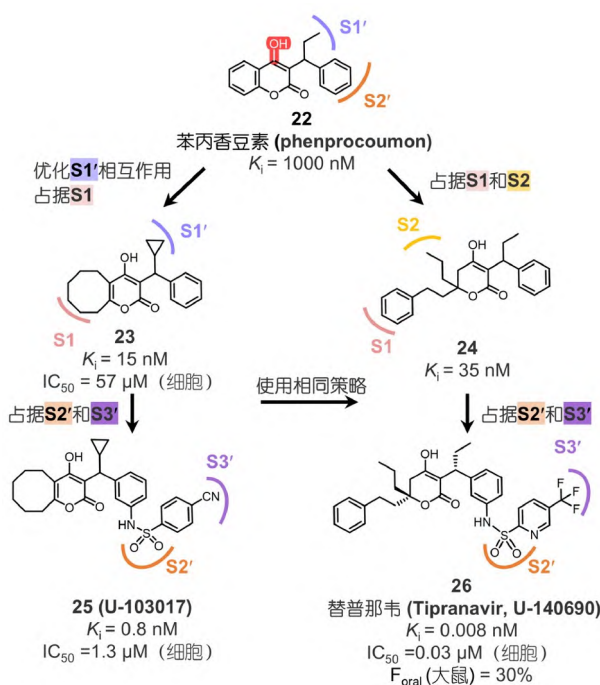


图 18 (网络版彩图)替普那韦的设计理念与优化路径

Figure 18 (Color online) Design and optimization routes of Tipranavir.

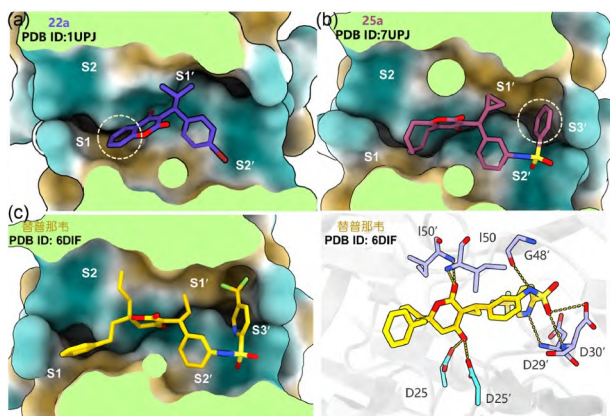


图 19 (网络版彩图) HIV-1蛋白酶与 (a) 化合物22a、(b) 25a以及 (c) 替普那韦的结合模式

Figure 19 (Color online) Binding modes of (a) compounds 22a, (b) 25a and (c) Tipranavir with HIV-1 protease.

活性达3 nM), 且对HIV-2蛋白酶亦表现出强效抑制($K_i < 1$ nM)^[71]. 替普那韦对HIV蛋白酶具有高选择性, 对人胃蛋白酶、组织蛋白酶D/E的 K_i 值分别为2、15和9 μ M, 大鼠口服生物利用度为30%. 临床前研究显示, 替普那韦对10株齐多夫定耐药HIV-1临床分离株的90%抑制浓度(IC_{90})均值为0.16 μ M, 且对利托那韦耐药株的 IC_{90} 值增幅(6倍)显著低于沙奎那韦等药物(47~125倍)^[72]. 2005年获批上市的替普那韦凭借其非拟肽骨架可有效抑制多种药物耐药的HIV毒株, 但严重的副作用(如皮疹、肝炎及颅内出血)限制其广泛的临床应用^[73].

复合物晶体结构解析^[74]表明, 替普那韦的4-羟基与催化残基Asp25/Asp25'形成对称氢键, 羰基氧与Flap区残基Ile50/Ile50'的NH基团产生对称氢键作用, C-6苯乙基和丙基分别占据S1/S2'亚位点, C-3R乙基和苯基定位S1'/S2'亚位点, 5-(三氟甲基)吡啶-2-基嵌入S3'亚位点, 磺酰胺基团则通过强氢键网络与活性位点残基结合, 共同支撑其实现强效抑制活性(图19c).

4 批准上市的HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂研发案例剖析

全球已上市的10款HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂研发标志着抗病毒药物设计从经验探索到基于结构理性设计的重大跨越(图1). 针对该蛋白酶底物结合口袋平坦开放的独特拓扑结构, SBDD策略突破了传统非共

价竞争结合的局限, 开创性地引入共价弹头靶向催化残基, 显著提升结合强度. 然而, HCV NS3/4A蛋白酶通过V36、T54、R155、A156及D168等残基突变, 显著降低对第一代药物波普瑞韦和特拉瑞韦的敏感性, 并引发交叉耐药现象. 虽然第二代蛋白酶抑制剂在克服耐药方面得到明显提升, 但蛋白酶R155K与D168E/V/A/Y残基突变显著削弱其抗病毒活性. 值得注意的是, 这些耐药突变残基位于活性位点附近, 但超出“底物包膜”区域, 从而在维持底物识别功能的同时通过影响抑制剂与蛋白酶之间的相互作用而减少药物结合^[24,75~78]. 这一现象促使研究者开发非共价的大环抑制剂, 重建耐药屏障. 从共价线性结构到非共价大环化合物的设计理念的转变, 为靶向蛋白-配体弱相互作用界面的药物开发提供了新的范式和概念验证型案例.

4.1 共价拟肽类

基于已有的共价抑制剂开发经验, 共价弹头的选择需平衡多种因素: 内在反应性适中以防止脱靶毒性或代谢失活, 同时确保与靶标亲核残基有效结合. 共价弹头的设计遵循靶点选择性原则, 即根据亲核残基特性(如亲核强度)优化弹头特异性, 并优先选择可逆结合模式以降低脱靶风险^[79~81]. 通过匹配共价弹头化学特征与靶标残基特性, 可实现差异化靶向策略. 例如, 硼酸类可逆共价弹头主要针对丝氨酸、苏氨酸蛋白酶, 代表性药物为蛋白酶体抑制剂硼替佐米(Bortezomib)^[82,83]; 醛、酮、腈基类弹头常适用于丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸蛋白酶, 形成可逆共价结合模式, 其中醛类内在反应性最强, 而腈基则具备更温和的亲电特性^[84].

在NS3/4A蛋白酶中, 通过引入亲电基团 α -酮酰胺(酮类)弹头基团至P1-P1'的切割位点处, 从而实现共价结合于NS3/4A蛋白酶的催化残基Ser139, 使蛋白酶不能进行底物酰胺键的切割.

4.1.1 波普瑞韦

第一代HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂波普瑞韦(32, Boceprevir, SCH 503034)的研发历程始于具有 α -酮酰胺结构、P6-P5'跨度的十一肽分子27 (图20)^[85]. 美国先灵葆雅公司研发团队发现该分子虽展现出优异的抑制活性($K_i = 1.9$ nM), 但存在对中性粒细胞弹性蛋白

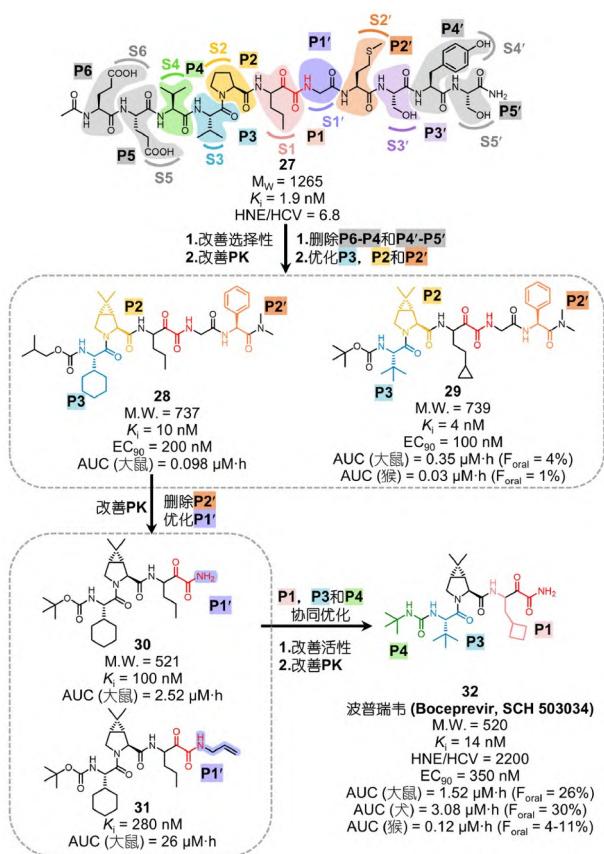


图 20 (网络版彩图)波普瑞韦的设计理念与优化路径
Figure 20 (Color online) Design and optimization routes of Boceprevir.

酶(human neutrophil elastase, HNE)选择性不足(选择性指数 $\text{HNE/HCV} = 6.8$), 且因肽键过多导致药代动力学性质欠佳。研发团队通过删除P6-P4和P4'-P5'位残基, 同时在P2位引入3,4-二甲基环丙基脯氨酸, P3位和P2'位引入大体积疏水性基团进行优化, 获得分子量缩减近半的化合物**28**。尽管其抑制活性减弱($K_i = 10 \text{ nM}$), 但成功保留了细胞水平的抗病毒活性(90%有效浓度 $\text{EC}_{90} = 200 \text{ nM}$)。同时研究发现, 该系列化合物(如**29**)在大鼠和猴类模型中表现出较低的口服生物利用度^[86], 提示仍需进一步去除肽键并降低分子量。通过系统性评估分子量与药代动力学参数, 研发团队最终锁定P2'位删除、P1'基团优化为伯胺酮酰胺的化合物**30** (分子量: 521 Da), 其抑制活性最优, 在大鼠的药时曲线下面积(area under the plasma concentration-time curve, AUC)较好^[85]。在P1'位优化过程中, 发现尽管采用仲胺酮酰胺会使化合物**31**活性降低, 但能极大提高

其在大鼠体内药物暴露量。基于化合物**30**的核心骨架, 开展P1基团构效关系研究, 并协同优化P1、P3及P4基团, 最终获得波普瑞韦(**32**), 其P1位为环丁基丙氨酸, P3位为叔丁基甘氨酸, P4位为叔丁基脲基团。该化合物不仅具备显著的靶点亲和力($K_i = 14 \text{ nM}$)、选择性($\text{HNE/HCV} = 2200$)和细胞抗病毒活性($\text{EC}_{90} = 0.35 \mu\text{M}$), 而且在大鼠与犬类模型中的口服生物利用度分别为26%和30%, 但在猴类模型口服生物利用度欠佳(4%~11%)。2011年, 波普瑞韦获批成为首个口服治疗HCV的直接抗病毒药物(direct-acting antiviral agents, DAA), 与聚乙二醇干扰素、利巴韦林联用治疗gt1型慢性HCV。

复合物晶体结构解析^[87]表明波普瑞韦通过可逆共价结合模式占据HCV NS3蛋白酶的底物结合口袋, 其作用特征表现为: P1'位共价弹头 α -酮酰胺羰基碳与Ser139氧原子形成共价键, 同时 α -酮酰胺的另一氧原子稳定结合于蛋白酶氧阴离子孔穴。在空间构型方面, P1位环丁基丙氨酸的S构型使其精准嵌入疏水S1亚位点; P2位二甲基环丙基脯氨酸则通过与Ala156甲基的有效空间匹配实现S2亚位点接触; 而P3位的叔丁基甘氨酸与P4位叔丁基脲基团通过范德华力分别作用于浅表S3和S4亚位点(图21)。

4.1.2 那拉瑞韦

为了改善波普瑞韦(**32**)的药代动力学特征、分子/细胞水平病毒抑制活性, 美国先灵葆雅公司研发团队^[88,89]开展第二代HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂的开发。分析波普瑞韦与蛋白酶的复合物晶体结构, 发现该化合物的P4基团存在潜在优化空间(图21)。为提升S4亚位点占据程度并通过氢键结合S3/S4亚位点的Ala157和Cys159残基, 研发团队改造获得一系列脲类衍生物, 虽然化合物的抗病毒活性增强且大鼠药代动力学得到改善, 但猴子体内暴露量仍不达标。关键突破来自P4位的双重修饰: 先引入环己烷增强疏水作用, 随后加装叔丁基磺获得化合物**33**, 其在猴体内血浆暴露量($\text{AUC} = 3.18 \mu\text{M}\cdot\text{h}$)与抗病毒活性($\text{EC}_{90} = 100 \text{ nM}$)均显著提升, 但大鼠血浆暴露量($\text{AUC} = 0.02 \mu\text{M}\cdot\text{h}$)却急剧下降(图22)^[90]。

为了解决种属差异问题, 研发团队^[85]回顾前期波普瑞韦的研发过程, 期间曾发现P1'位仲胺酮酰胺类似物较伯胺具有更优的大鼠药代动力学特征(化合物**30**

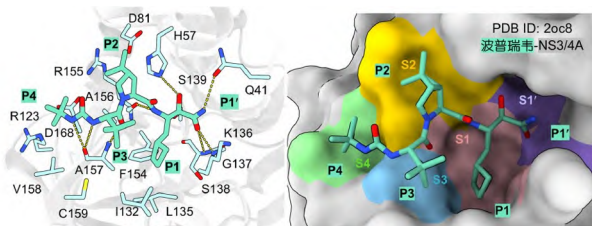


图 21 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶与波普瑞韦的结合模式

Figure 21 (Color online) Binding mode of Boceprevir with HCV NS3/4A protease.

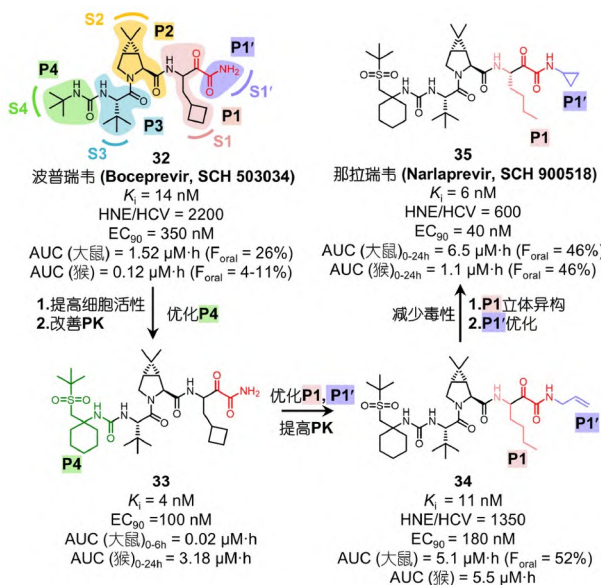


图 22 (网络版彩图)那拉瑞韦的设计理念与优化路径

Figure 22 (Color online) Design and optimization routes of Narlaprevir.

和31), 但P1位环丁基丙氨酸可能不兼容P1'位烯丙基/小体积烷基. 通过系统筛选P1位基团与P1'位烯丙基酰胺的组合, 发现正亮氨酸作为P1基团的化合物34在啮齿类(AUC = 5.1 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)和大型动物(AUC = 5.5 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)中均展现良好的药代动力学特性, 同时保持抗病毒活性(EC_{90} = 180 nM)与选择性(HNE/HCV = 1350). 然而考虑到末端烯烃会在体内形成活性环氧化物从而导致潜在代谢毒性问题, 因此基于化合物34进一步优化P1'基团, 获得S构型正亮氨酸-P1'位环丙基组合, 最终开发出那拉瑞韦(35, Narlaprevir, SCH 900518)^[90]. 该化合物细胞抗病毒活性(EC_{90} = 40 nM)较波普瑞韦提升约9倍, 选择性(HNE/HCV = 600)与跨种属血药暴露量(大鼠AUC = 6.5 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$, 猴AUC = 1.1 $\mu\text{M}\cdot\text{h}$)同步优化,

口服生物利用度在大鼠和猴子中均为46%. 复合物晶体结构解析表明, 那拉瑞韦通过P3-P1'位主链与蛋白酶残基形成多重氢键与疏水作用. 相较波普瑞韦, 其P4位环己基与S4口袋产生额外疏水接触, 同时P4的砷基氧原子与Cys159形成氢键相互作用(图23).

4.2 非共价大环拟肽类

在非共价拟肽类抑制剂设计中, C端通常采用羧基或酰胺电子等排体模拟蛋白酶切割底物P1-P1'位后的断裂肽键, 由此形成线性、P1-P3位大环、P2-P4位大环三类结构. 大环化修饰赋予化合物更高的构象刚性, 并且促使化合物提前锁定其与蛋白酶结合时的构象, 从而减少配体-受体结合时的构象熵损失, 实现与靶标结合的亲和力提升^[91,92]. 此外, 大环骨架不仅能通过空间效应遮蔽易被切割的肽键、促进分子内氢键形成以抵抗蛋白酶的水解, 还可通过降低极性表面积与调节脂水分分配系数显著提升跨膜渗透效率.

4.2.1 P1-P3位大环类——西鲁瑞韦、达诺瑞韦

西鲁瑞韦(42, Ciluprevir, BILN-2061)是首个进入临床研究HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂, 也是首个概念验证P1-P3位大环化的抑制剂. 勃林格殷格翰公司研发团队^[93]以底物六肽(36, IC_{50} = 68 μM)为起点(图24), 通过P1和P2基团的延伸, 获得活性略有提升的化合物37 (IC_{50} = 12 μM). 通过核磁共振实验和分子对接, 将化合物37放到无配体结合的HCV NS3/4A蛋白酶晶体结构中, 发现该化合物的P5和P6基团暴露于溶剂区域, 与蛋白酶的相互作用较弱, 而P3侧链位于蛋白酶的溶剂暴露区, 紧邻P1去甲缬氨酸侧链. 基于此, 研发团队推测连接P1和P3侧链的大环化合物能提前锁定抑制剂与蛋白酶结合时的构象, 减少构象熵损失, 从而增强

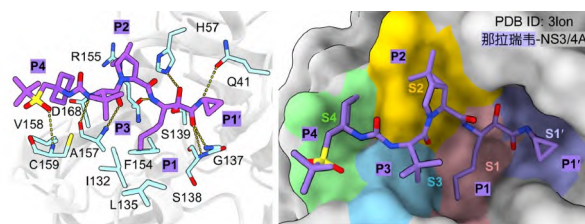


图 23 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶与那拉瑞韦的结合模式

Figure 23 (Color online) Binding mode of Narlaprevir with HCV NS3/4A protease.

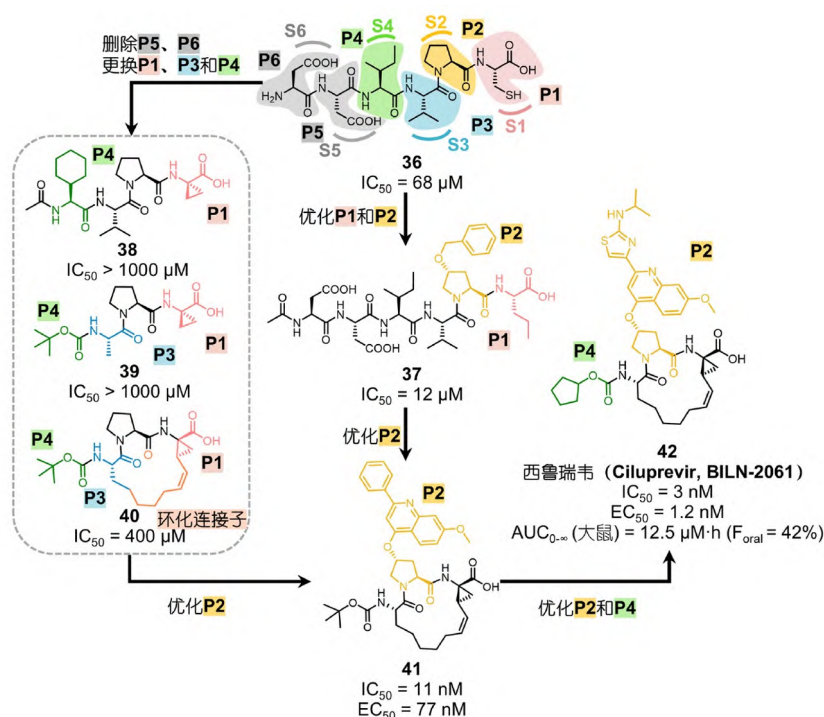


图 24 (网络版彩图)西鲁瑞韦的设计理念与优化路径

Figure 24 (Color online) Design and optimization routes of Ciluprevir.

结合自由能^[94]。通过删除化合物36的P5和P6残基, 更换P1、P3和P4位基团以评估三种简单骨架结构, 发现15元大环化合物40较两种线性化合物38和39表现出更强的抑制活性。随后, 研发团队^[95]在大环化合物40的基础上进一步扩增P2基团, 获得 IC_{50} 为11 nM的化合物41。通过对P2基团和N端修饰的系统优化, 最终开发出西鲁瑞韦(42, Ciluprevir, BILN-2061), 这是首个进入临床试验的强效非共价NS3/4A蛋白酶抑制剂, 分子水平($IC_{50} = 3$ nM)和抗病毒细胞水平上均表现出强效抑制作用($EC_{50} = 1.2$ nM), 在大鼠体内的口服生物利用度达42%。然而, 由于在恒河猴中观察到高剂量西鲁瑞韦产生明显的心脏毒性, 该候选药物后期从临床研究中被撤回^[96]。

达诺瑞韦(46, Danoprevir, ITMN-191)作为首个靶向HCV NS3/4A蛋白酶而成功上市的P1-P3大环化药物, 其研发过程呈现了计算机辅助药物设计与结构优化结合的典范。该药物由我国歌礼制药公司研发, 于2018年在中国获批上市, 其获批上市标志着我国在DAA领域实现首个自主研发创新药的重大突破^[97]。

达诺瑞韦的研发始于针对NS3/4A蛋白酶S2亚位

点疏水区域的虚拟筛选(图25): 研发团队^[98]构建了包含500个四肽结构的虚拟化合物库, 通过GOLD对接软件开展虚拟筛选挑选潜在活性分子。该四肽虚拟库由固定的P1'、P1、P3和P4基团, 以及多样性的P2基团组成的500个化合物构成。随后, 研发团队合成P2由不同氨基模块组建的氨基甲酸酯类聚焦库, 并经多轮P2基团迭代优化, P2位为四氢异喹啉基团(tetrahydroisoquinoline)的氨基甲酸酯类苗头化合物43展现出优异的蛋白酶抑制活性($IC_{50} = 210$ nM), 但细胞抗病毒活性微弱($EC_{50} > 10$ μM), 推测与化合物的高极性表面积、三个氢键供体及羧基电荷导致其膜渗透性差相关。为降低肽键特征, 研发团队采用消除P4肽键并实施P1-P3大环化的策略。基于对接模型设计得到P1-P3侧链环化的15元大环化合物44, 在细胞水平抗病毒活性提升至 EC_{50} 为2 μM。进一步将P1羧基替换为磺酰胺生物电子等排体, 既保留酸性特征又优化负电荷分布, 最终获得先导化合物45, 其对蛋白酶抑制活性($IC_{50} = 2.2$ nM)与细胞抗病毒活性($EC_{50} = 17.5$ nM)同步提升两个数量级, 但血浆清除率 $> 100\%$ 。针对清除率过高问题, 研发团队聚焦P2位基团的迭代优化, 最终发现

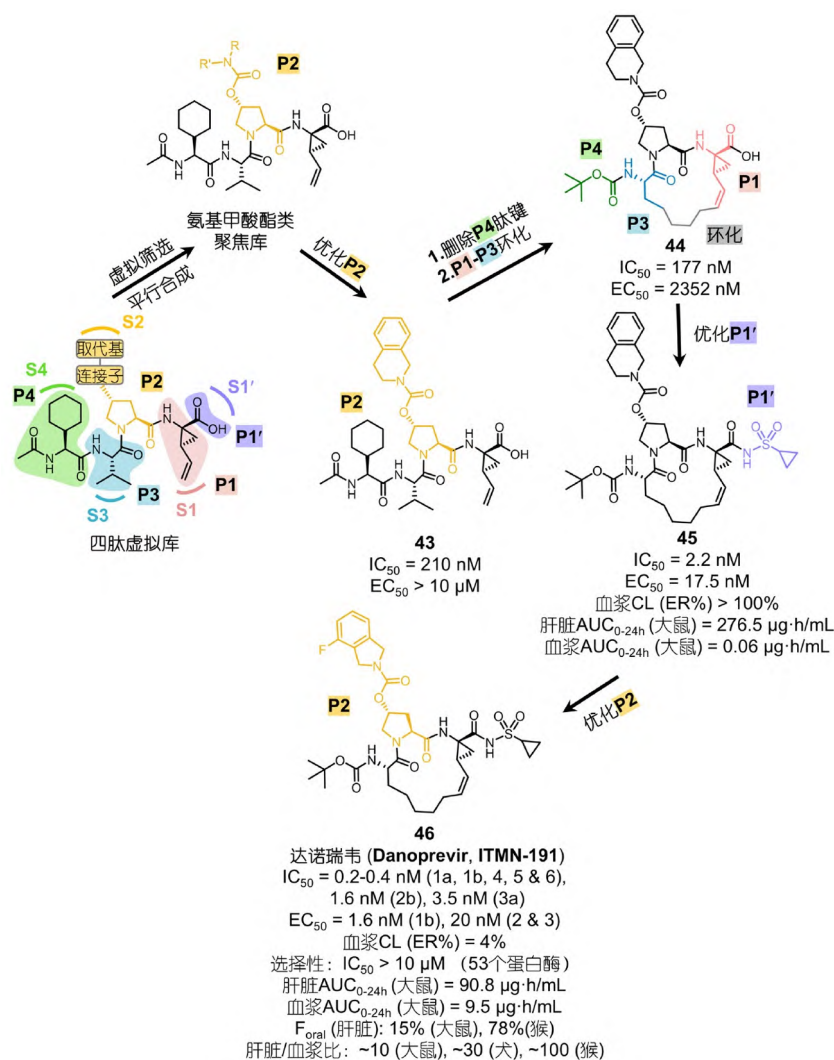


图 25 (网络版彩图)达诺瑞韦的设计理念与优化路径

Figure 25 (Color online) Design and optimization routes of Danoprevir.

4-氟二氢异吲哚氨基甲酸酯衍生物**46** (达诺瑞韦). 该大环抑制剂对gt1a/1b/4/5/6型HCV的NS3/4A蛋白酶 IC_{50} 达0.2~0.4 nM, 对gt2b/3a型NS3/4A蛋白酶 IC_{50} 分别为1.6和3.5 nM, 细胞抗病毒活性 EC_{50} 在gt1b型中为1.6 nM, gt2/3型中为20 nM. 临床前研究数据显示, 30 mg/kg口服剂量下大鼠肝/血浆分布比为10, 血浆清除率优化至4%, 在大鼠和猴子肝脏中得到有效暴露.

复合物晶体结构解析^[24]表明(图26), 达诺瑞韦通过其P1位的环丙基磺酰胺占据NS3/4A蛋白酶的S1/S1'亚位点: 酰基氧原子精准插入阴离子孔穴, 与Gly137和Ser138形成氢键网络, 同时磺酰基氧原子与

Ser139主链建立氢键相互作用, 而酰基磺酰胺的NH基团进一步与His57形成稳定氢键. P2位氟代二氢异吲哚基团则主要通过疏水作用大范围占据S2亚位点, 其氟原子指向S4浅口袋中的P4位叔丁基.

4.2.2 P2-P4大环类——格拉瑞韦、伏西瑞韦

相较于线性拟肽, P1-P3大环化显著提升拟肽化合物的效力和药代动力学特征, 从而成为克服耐药的重要策略. 然而, P1-P3大环化拟肽对gt3型HCV的疗效缺乏, 推动P2-P4环化抑制剂的开发, 以突破大环策略的局限性.

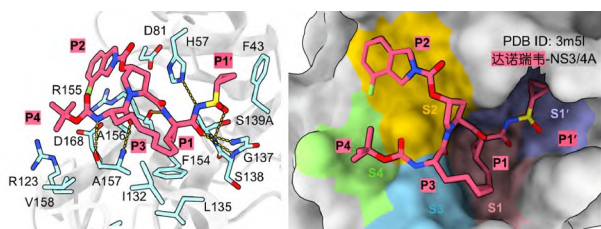


图 26 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶与达诺瑞韦的结合模式

Figure 26 (Color online) Binding mode of Danoprevir with HCV NS3/4A protease.

默克公司研发团队^[99]基于西鲁瑞韦(42)和NS3/4A蛋白酶结构的分子对接模型,发现P2和P4侧链之间存在可容纳连接基团的空间,由此设计了一系列P2-P4环化的抑制剂,包括2014年获批上市的伐尼瑞韦(47, Va-

niprevir, MK-7009)^[100]和MK1220 (48)^[101]。然而,随着gt1b和gt3a型HCV耐药的出现,迫切需要开发针对多种gt型和耐药HCV变异株均具有抑制活性的广谱抗病毒药物。

以对gt3a型HCV NS3/4A蛋白酶抑制活性 K_i 值为200 nM的化合物49为起点(图27),通过增大P2杂环基团的体积,获得了P2位为氮杂三环基团的化合物50,显著提高了对gt3a型HCV NS3/4A蛋白酶的抑制活性($K_i = 12$ nM)^[102]。同时,化合物50与gt3a型HCV NS3/4A蛋白酶的对接模型表明,P2-P4位连接基团位于gt3a型蛋白酶非保守区域,该区域也是gt3a和1b型易发生突变的位点,如Arg123、Asp168和Arg155(参照图28复合物晶体结构)。据此,研究人员提出假设:减少化合物P2位的空间位阻并增加P2-P4大环连接子的柔性,有望进

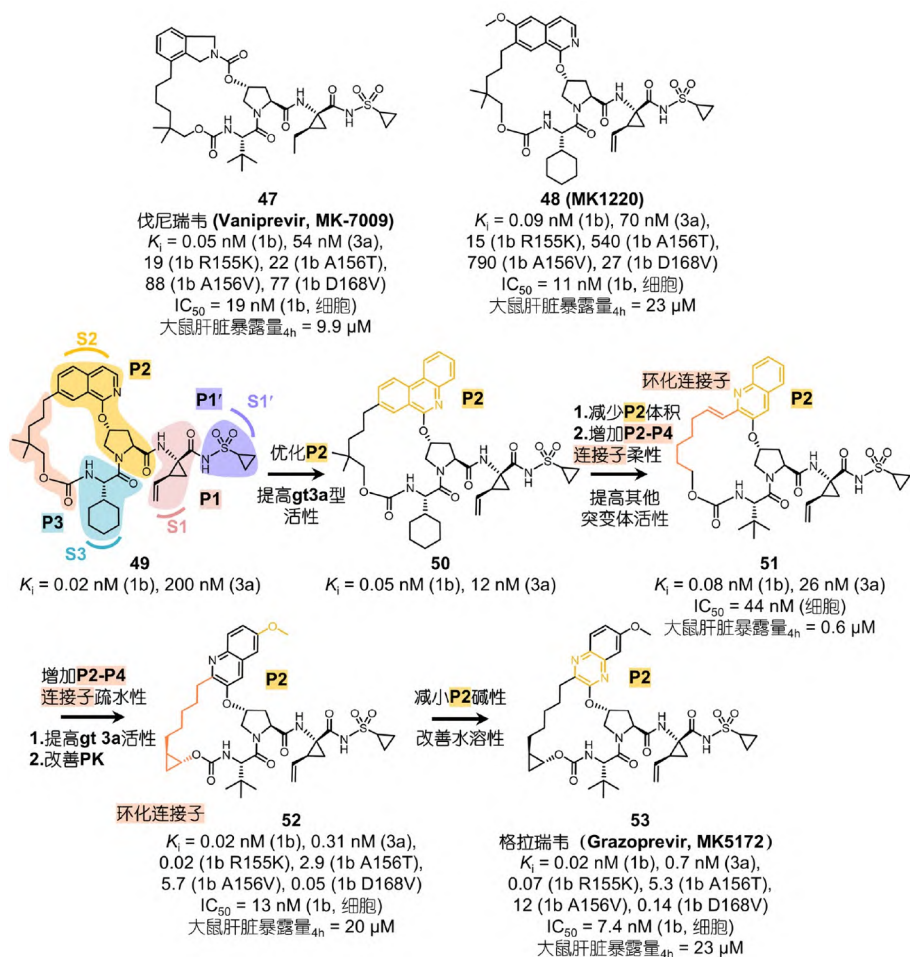


图 27 (网络版彩图)格拉瑞韦的设计理念与优化路径

Figure 27 (Color online) Design and optimization routes of Grazoprevir.

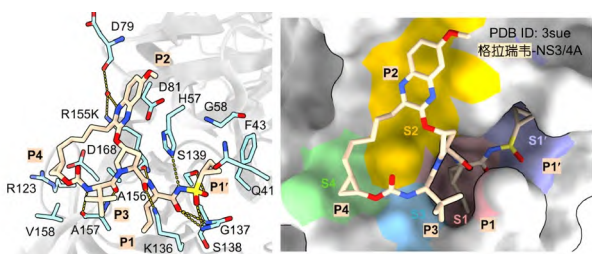


图 28 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶与格拉瑞韦的结合模式

Figure 28 (Color online) Binding mode of Grazoprevir with HCV NS3/4A protease.

一步提升对gt3a型和突变株蛋白酶的活性。基于此假设, 研究人员将P2位的三环结构简化为双环, 并由此延长了P2-P4连接基团, 获得了化合物51。该化合物对gt1b和3a型NS3/4A蛋白酶均具有抑制活性, 但肝脏暴露量较低, 4 h肝脏暴露量仅为0.6 μM 。根据前期研究发现的规律——P2-P4环化连接子亲脂性增加可提高肝脏暴露量, 研究人员在P2-P4环化连接子中引入环丙基, 并在P2位喹啉环上引入7-甲氧基, 得到了化合物52。该化合物具有良好的肝脏暴露量, 且对gt3a和gt1b型NS3/4A蛋白酶的突变体R155K、A156T和A156V的抑制效力显著提高。分子对接模型表明, 引入的环丙基使大环结构避开了Ala156残基, 可能为A156T或A156V突变提供了更多空间适应性。然而, 化合物52易形成两性离子结构, 导致水溶性下降。为保持类似的效力和药代动力学特性, 研究人员将P2位的喹啉结构替换为碱性较弱的喹喔啉基, 获得了格拉瑞韦(53, Grazoprevir, MK-5172)。该化合物保持了对gt3a型和一系列突变体蛋白酶的强效抑制活性, 同时在细胞水平上对gt1b和1a型HCV的抗病毒活性 IC_{50} 分别为7.4和7 nM, 并具有良好的大鼠肝脏暴露量。

格拉瑞韦(53)与gt1a型HCV NS3/4A蛋白酶突变体(R155K)的复合物晶体结构显示, 一个水分子与格拉瑞韦喹喔啉环的N1原子相互作用, 并介导其与蛋白酶Lys155残基侧链的氢键相互作用(图28)^[76]。

伏西瑞韦(57, Voxilaprevir, GS-9857)通过基于格拉瑞韦的结构改造获得^[103,104]。以往的研究表明, 在gt1型HCV NS3/4A蛋白酶中, 抑制剂P2位基团会与Arg155和Asp168残基形成相互作用^[105]。而Asp168残基在gt3型HCV NS3/4A蛋白酶-抑制剂结合中也发挥关键作用, 其突变导致许多蛋白酶抑制剂对gt3型

NS3/4A蛋白酶的抑制活性丧失^[106]。基于HCV NS3/4A蛋白酶保守催化残基His57残基与抑制剂P2基团吡咯烷3位的相邻空间位置(如图28所示的格拉瑞韦与蛋白酶的结合模式), 在该位置上的取代可能有利于形成额外的疏水相互作用, 从而实现蛋白酶抑制剂对各类基因型HCV NS3/4A蛋白酶的强效抑制。

因此, 吉利德公司研发团队^[104]聚焦于格拉瑞韦(53) P2位吡咯烷基团C-3位的立体化学优化(图29), 通过引入乙基取代基(54)显著提升了对gt3型HCV的抑制效力(EC_{50} 优化至20 nM)。然而, 该化合物因代谢稳定性不足(预测清除率 $\text{CL} = 0.84 \text{ L}/(\text{h kg})$)及高浓度蛋白加合物的形成(117 pmol/mg)而存在肝毒性风险, 其机制与P1位乙烯基代谢生成的活性环氧化物相关——这一结构特征在达诺瑞韦(Danoprevir, 46)、格拉瑞韦(Grazoprevir, 53)等蛋白酶抑制剂中已被证实可导致血清丙氨酸转氨酶升高。为规避毒性, 研发人员采用二氟甲基代替P1位乙烯基取代基(55), 该化合物在保留对gt3型病毒高抑制活性($K_i = 0.043 \text{ nM}$, $\text{EC}_{50} = 27 \text{ nM}$)的同时, 代谢稳定性也有所增加(预测清除率 $\text{CL} = 0.20 \text{ L}/(\text{h kg})$)。但该策略不利于药代动力学参数优化(肝脏暴露量 = 1.2 μM , 半衰期 $t_{1/2} = 0.8 \text{ h}$, 分布容积 $V_{ss} = 1.0 \text{ L}/\text{kg}$), 推测与酰基磺酰胺基团周围疏水性降低相关。进一步引入P1'位甲基环丙基取代基(56)后, 肝脏暴露量提升至14.0 μM (6 h), 且分布容积($V_{ss} = 1.7 \text{ L}/\text{kg}$)与半衰期($t_{1/2} = 1.4 \text{ h}$)同步优化。此外, 化合物56的放射性标记蛋白加合物的形成减少至10 pmol/mg。为了实现每日一次的低剂量, 需进一步提高药物在人体中的代谢稳定性和对gt3型病毒的抑制效力。对化合物56进行了人肝微粒体代谢物鉴定研究, 其中在P2到P4的大环连接子上观察到三种不同的羟基化代谢物, 推测是喹喔啉3位上的苄基亚甲基易被氧化。最终, 通过在大环连接子苄基位引入代谢阻断基团二氟亚甲基获得伏西瑞韦(57), 从而成功实现多重目标: 对gt3型病毒效力提升至 $\text{EC}_{50} = 6.1 \text{ nM}$ 、人肝微粒体代谢稳定性显著增强(预测清除率 $\text{CL} < 0.17 \text{ L}/(\text{h kg})$)、蛋白加合物降至小于1 pmol/mg。

共晶结构^[104]解析揭示伏西瑞韦作用机制源于二氟亚甲基与Arg155烷基链的疏水相互作用, 以及大环骨架对底物结合口袋的精准适配(图30)。伏西瑞韦展现出广谱抗病毒活性(gt1a/b、gt2a/b、gt3a、gt4a、gt5a、gt6a型的 $\text{EC}_{50} = 1.5\sim 6.6 \text{ nM}$), 并对gt1a Q80K、

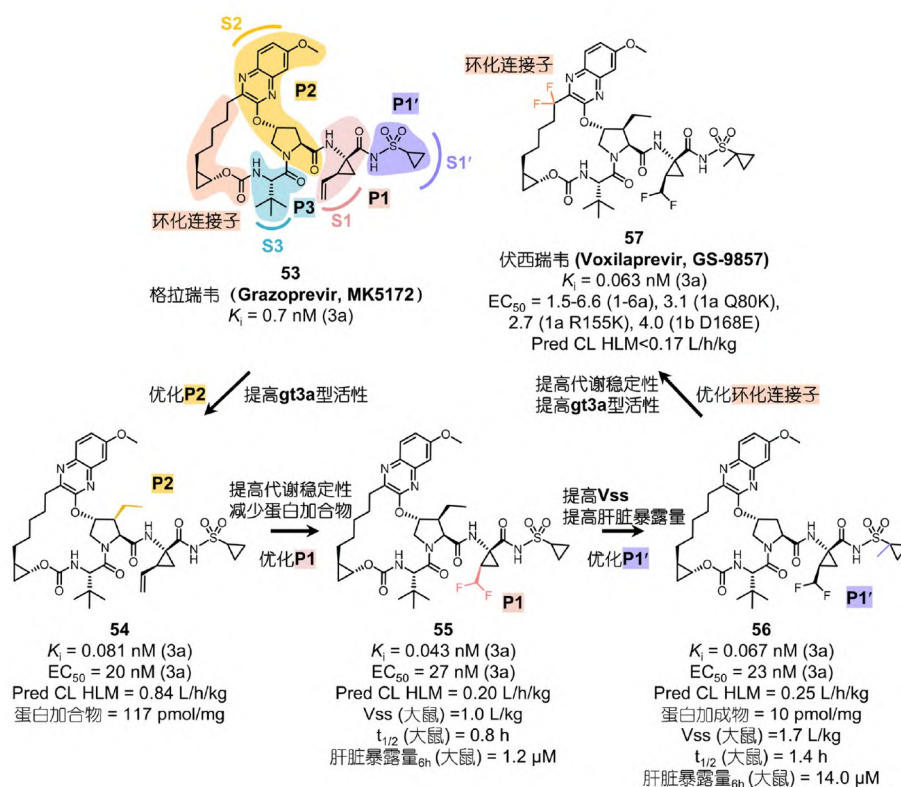


图 29 (网络版彩图)伏西瑞韦的设计理念与优化路径
 Figure 29 (Color online) Design and optimization routes of Voxilaprevir.

gt1a R155K、gt1b D168E等耐药突变株保持强效抑制 ($EC_{50} = 2.7\text{-}4.0 \text{ nM}$), 唯独对A156T突变株敏感性显著下降 ($EC_{50} > 500 \text{ nM}$). 其卓越的肝靶向性(肝/血浆药物浓度比 > 50倍)与低毒性, 使其于2017年获FDA批准与索非布韦/维帕他韦(Sofosbuvir/Velpatasvir)联用, 成为治疗多基因型HCV感染, 尤其针对既往DAA治疗失败患者的核心方案.

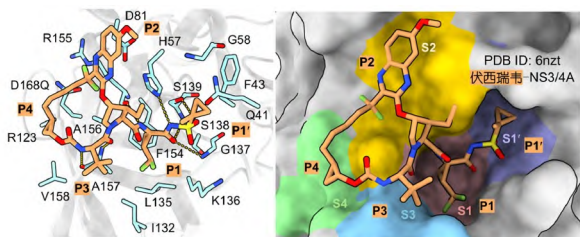


图 30 (网络版彩图) HCV NS3/4A蛋白酶与伏西瑞韦的结合模式
 Figure 30 (Color online) Binding mode of Voxilaprevir with HCV NS3/4A protease.

5 批准上市的SARS-CoV-2 3CL蛋白酶抑制剂研发案例剖析

新冠肺炎的全球大流行, 驱动学术界与工业界以前所未有的协同速度聚焦抗新冠病毒药物研发, 目前共有五款靶向SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的抑制剂获批上市(图1). 基于HIV蛋白酶与HCV NS3/4A蛋白酶拟肽类抑制剂的成功经验, 整合辉瑞团队前期在非典型肺炎(简称“非典”)期间对冠状病毒3CL蛋白酶的研究积累^[107], 借助SBDD精准设计共价抑制剂, 最终推动首批候选药物实现高效临床转化. 与此同时, SBDD与虚拟筛选的深度融合, 快速突破传统拟肽类抑制剂的化学空间限制, 成功开发出非共价、非拟肽类药物. 在耐药方面, 虽然迄今尚未报告患者中出现对3CL蛋白酶抑制剂耐药的SARS-CoV-2突变体, 体外研究已发现3CL蛋白酶中的潜在耐药突变位点(如T211、L50V、E166V/A), 这些突变主要通过降低药物结合能力(如E166V影响S1/S4口袋)或补偿性增强酶活性(如

T211、L50F)实现耐药^[108,109].

5.1 共价拟肽类

借鉴HCV NS3/4A蛋白酶共价拟肽类抑制剂的设计理念, SARS-CoV-2 3CL蛋白酶拟肽类抑制剂的设计策略为: (1) 整体结构模拟底物P1-P4位残基契合底物结合口袋的S1~S4亚位点拓扑特征; (2) 将底物P1-P1'肽键的羰基替换为共价弹头, 与催化残基Cys145形成共价键, 从而增强结合强度和持久性.

5.1.1 奈玛特韦

奈玛特韦(**64**, Nirmatrelvir, PF-07321332)作为全球首个获批上市的SARS-CoV-2 3CL蛋白酶抑制剂, 其研发历程体现了基于结构生物学与药代动力学特性协同优化的策略创新. 该分子的开发可追溯至辉瑞公司在2003年非冠状状病毒(severe acute respiratory syndrome

coronavirus, SARS-CoV)流行期间, 基于人鼻病毒3C蛋白酶抑制剂AG7088和SARS-CoV 3CL蛋白酶底物(**58**)的四面体过渡态, 采用羟甲基酮弹头共价结合催化半胱氨酸而得到的共价抑制剂PF-00835231 (**59**)^[107]. 然而, 由于非典疫情的消退, 其临床研究终止, 该分子长期处于研究停滞状态. 直至新冠疫情暴发后, 鉴于两种冠状病毒3CL蛋白酶底物结合口袋100%的序列同源性, 研发团队重启了对PF-00835231的改造计划.

研究显示, PF-00835231 (**59**)虽对SARS-CoV-2 3CL蛋白酶保持强效抑制活性($K_i = 0.271$ nM), 但其高极性特征导致被动渗透性($P_{app} = 0.2 \times 10^{-6}$ cm/s)与口服生物利用度(1.4%)严重受限(图31)^[5,107]. 复合物晶体结构解析表明其结合模式与底物类似, 其中P1'位羟甲基酮弹头的羰基碳原子与Cys145的硫原子形成共价键, 弹头羟基与Cys145主链氮原子及His41形成稳定的氢键网络. 在S1亚位点, P1位侧链羰基通过多重氢键

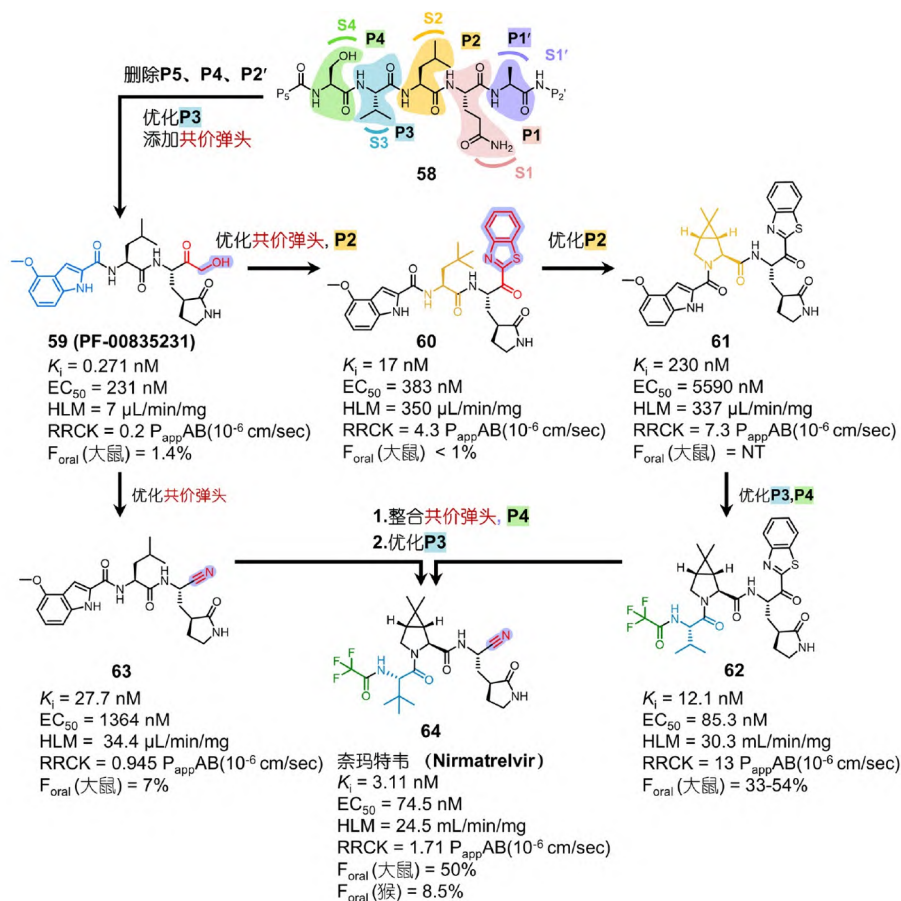


图31 (网络版彩图)奈玛特韦的设计理念与优化路径

Figure 31 (Color online) Design and optimization routes of Nirmatrelvir.

与His163、Glu166侧链及Phe140主链结合, 而主链胺基进一步与His164主链羰基形成氢键, 强化了结合位点的空间和互作适配性. P2位亮氨酸侧链则嵌入由Asp187、Arg188、Gln189、Met49和His41组成的疏水S2亚位点, 其主链氨基与Gln189侧链形成氢键, 实现疏水腔的精准填充. 此外, 吡啶基团通过双氢键与Glu166主链结合, 并与189-191残基形成广泛的疏水相互作用, 进一步稳定了蛋白酶-抑制剂复合物结构(图32a).

针对PF-00835231的渗透性缺陷, 研发团队聚焦于弹头区域的系统性改造. 通过将P1'位共价弹头羟甲基酮替换为苯并噻唑酮(**60**), 实现了协同优化: 减少氢键供体数量(从5降至4)、降低拓扑极性表面积及提升亲脂性, 使渗透性提升至 4.3×10^{-6} cm/s, 同时维持抑制活性($IC_{50} = 17$ nM). 然而, 化合物**60**的口服生物利用度仍低于1%, 且存在代谢稳定性缺陷. 基于HCV NS3/4A蛋白酶拟肽类抑制剂P2环化基团^[9,110], 通过分子对接指导P2位环化改造, 在P2引入模拟底物P2-亮氨酸的刚性双甲基环丙烷脯氨酸, 获得化合物**61**, 其酶水平抑制活性和细胞抗病毒活性虽然有所下降($IC_{50} = 230$ nM, $EC_{50} = 5590$ nM), 但 P_{app} 值显著提升至 7.3×10^{-6} cm/s, 复合物晶体结构显示该化合物相较PF-00835231, P2基团更为有效地填充疏水性S2亚位点(图32b). 基于化合物**61**, 将P3位替换为缬氨酸、P4位引入三氟乙酰胺基团, 获得化合物**62**. 该分子通过三氟甲基的吸电子效应降低羰基偶极矩, 提升亲脂性, 使细胞抗病毒活性($EC_{50} = 85$ nM)与被动渗透性($P_{app} = 13 \times 10^{-6}$ cm/s)同步增强, 并且大鼠口服生物利用度达33%~54%. 然而, 急性毒理实验发现其可诱导炎症标志物升高及溶血现象, 迫使研发转向. 回溯性分析显示, 将P1'弹头替换为氰基(化合物**63**)虽使细胞活性减弱($EC_{50} = 1364$ nM), 但大鼠口服生物利用度提升至7%, 提示氰基弹头在药代属性优化中的潜力^[9].

最终, 通过整合化合物**62**的P4位三氟乙酰胺基团、化合物**63**的氰基弹头, 并将P3位优化为叔丁基亮氨酸, 成功获得候选分子奈玛特韦(**64**). 该分子在保持高抑制活性($K_i = 3.11$ nM, $EC_{50} = 75$ nM)的同时, 实现大鼠50%与食蟹猴8.5%的口服生物利用度, 且具备优异的合成可放大性与制剂稳定性. 复合物晶体结构解析表明P1'位氰基的碳原子共价结合于Cys145, 并且氮原子很好地占据氧阴离子孔穴, 形成多重氢键; P3位

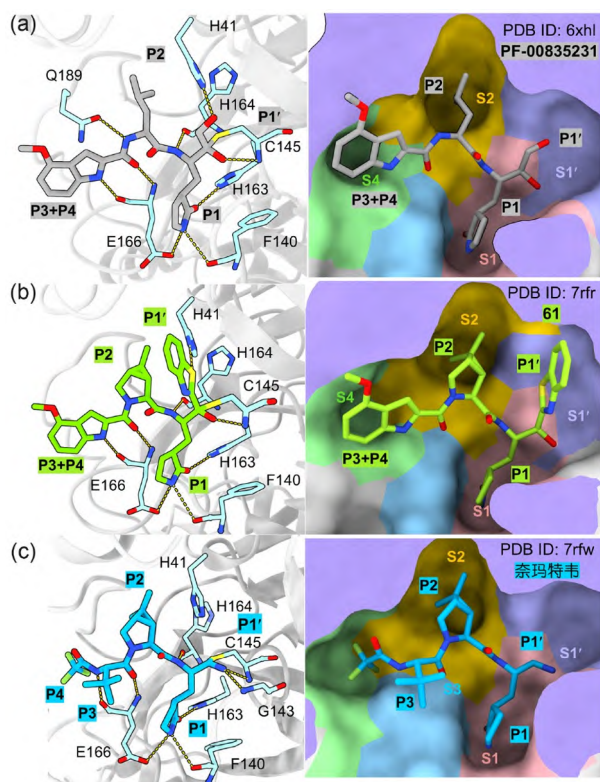


图32 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶与 (a) PF-00835231、(b) **61**和 (c) 奈玛特韦的结合模式

Figure 32 (Color online) Binding modes of (a) PF-00835231, (b) **61** and (c) Nirmatrelvir with SARS-CoV-2 3CL protease.

叔丁基亮氨酸伸向溶剂区, 使得P4位三氟乙酰胺基团很好地朝向S4亚位点疏水壁(图32c). 然而, 药代动力学研究表明, 奈玛特韦的P3位叔丁基、P2位氮杂双环及P1位吡咯烷酮基团易被CYP3A4代谢氧化, 导致血浆暴露量快速下降. 为此, 临床采用与强效CYP3A4抑制剂利托那韦联用的策略, 最终由奈玛特韦与利托那韦组合的Paxlovid被批准上市. 尽管该联用方案显著提升了治疗窗, 但利托那韦对CYP3A4的抑制作用可能引发药物-药物相互作用, 尤其对需长期服用经CYP3A4代谢药物(如抗凝剂、免疫抑制剂)的合并症患者构成潜在风险. 这一局限性驱动了后续非利托那韦联用的3CL蛋白酶抑制剂单药的开发.

5.1.2 先诺特韦

先诺特韦(**67**, Simnotrevir)由中国科学院上海药物研究所联合武汉病毒研究所和先声药业等完成研发, 作为我国首个实现自主研发及获批上市的SARS-CoV-2

3CL蛋白酶抑制剂, 其研发历程展现了基于结构的理性药物设计范式。

该药物的开发始于HCV NS3/4A蛋白酶抑制剂波普瑞韦(Boceprevir, **32**)的再定位研究(drug repurposing, 图33), 通过高通量筛选发现其对SARS-CoV-2 3CL蛋白酶具有微摩尔级抑制活性($IC_{50} = 8.6 \mu M$)^[11]. 基于波普瑞韦与SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的复合物晶体结构分析(图34a), 研发团队发现其P1位环丁基未能充分占据S1亚位点. 针对3CL蛋白酶对P1-Gln严格的底物偏好性, 将P1位Gln环化为环戊酰胺基以增大刚性和代谢稳定性, 同时选择相对惰性的氰基作为P1'位共价弹头, 所得化合物**65**的抑制活性提升420倍($IC_{50} = 20 \text{ nM}$). 复合物晶体结构解析表明, 该分子通过P1位环戊酰胺与S1亚位点完美适配, 与His163、Glu166侧链及Phe140主链形成多重氢键网络, 同时P1'氰基精准占据催化位点的氧阴离子孔穴, 并与Cys145形成共价键. 此外, 谷胱甘肽反应性测试证实氰基弹头具有适中的共价反应性, 在保证靶标结合效率的同时降低了脱靶风险.

为进一步提升化合物的抗病毒活性, 研发团队聚焦于占据蛋白酶S2亚位点的P2基团优化. 在复合物晶体结构中观察到化合物**65**的P2位双甲基环丙烷脯氨酸基团未能充分填充S2亚位点空腔(图34b), 遂选择大尺寸P2基团(如二硫杂螺[4.4]脯氨酸), 获得化合物**66**

($EC_{50} = 220 \text{ nM}$). 同时, 受奈玛特韦(**64**)结构启发, 进一步在P4位引入三氟乙酰基团, 最终得到先诺特韦(**67**). 该分子对SARS-CoV-2 Delta及Omicron变异株均表现出纳摩尔级抗病毒活性(EC_{50} 分别为34及43 nM). 先诺特韦与SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的复合物晶体结构解析(图34c)和对比分析表明: P4三氟乙酰基通过构象重排完美匹配S4亚位点的疏水区域, 而相对比化合物**65**的P4叔丁基因空间位阻被迫朝向亲水区, 这一结构差异显著增强了抑制剂与蛋白酶的结合焓和结合自由能. 与奈玛特韦类似, 先诺特韦与3CL蛋白酶(C145G突变体)的非共价结合主要依赖焓驱动, 其亲和力($K_d = 302 \text{ nM}$)较奈玛特韦($K_d = 620 \text{ nM}$)提升2倍, 主要归功于先诺特韦中尺寸增大的P2基团(二硫杂螺[4.4]脯氨酸)产生的额外焓增益. 该基团通过诱导契合推动Met49所在环区主链的构象变化, 扩大S2结合腔体积, 并与Met49及Met165形成硫-硫相互作用, 进而建立更多更紧密的疏水作用网络.

在药代动力学方面, 先诺特韦与利托那韦联用展现出良好的口服吸收特征, 在小鼠与食蟹猴的口服生物利用度分别达35.3%和41.9%. 体内实验证实, 该组合能有效抑制转基因小鼠肺组织与脑组织的病毒复制, 其病理损伤保护效果显著优于奈玛特韦对照组. 基于上述优势, 先诺特韦片/利托那韦片组合包装(商品名: 先诺欣®)作为我国首款自主研发的靶向3CL蛋白

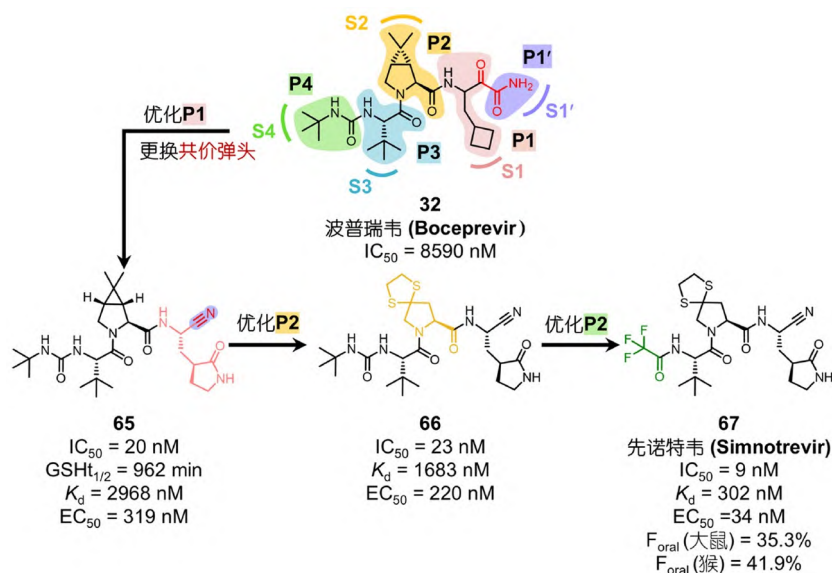


图 33 (网络版彩图)先诺特韦的设计理念与优化路径

Figure 33 (Color online) Design and optimization routes of Simnotrevir.

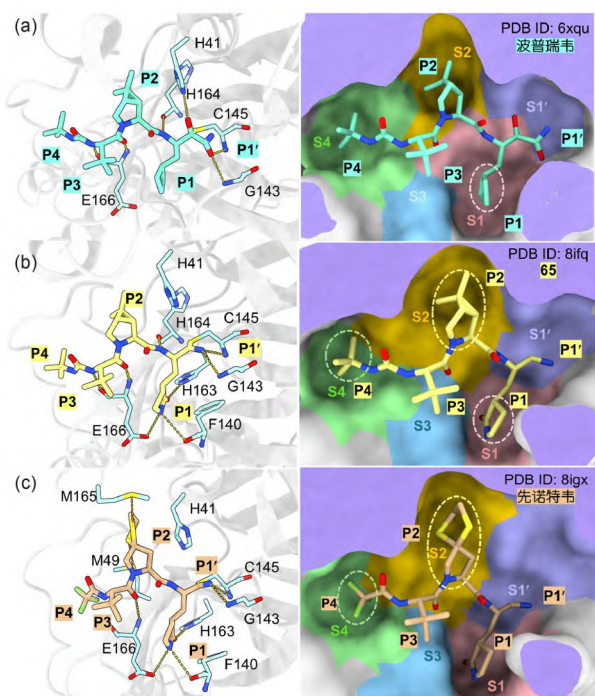


图 34 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶与 (a) 波普瑞韦、(b) 65和 (c) 先诺特韦的结合模式

Figure 34 (Color online) Binding modes of (a) Boceprevir, (b) 65 and (c) Simnotrevir with SARS-CoV-2 3CL protease.

酶抗新冠肺炎创新药于2023年获准上市。然而,与奈玛特韦类似,与利托那韦的联用可能引发药物-药物相互作用风险。

5.2 非共价、非拟肽类

恩赛特韦(70, Ensitrelvir, S-217622)作为首个非拟

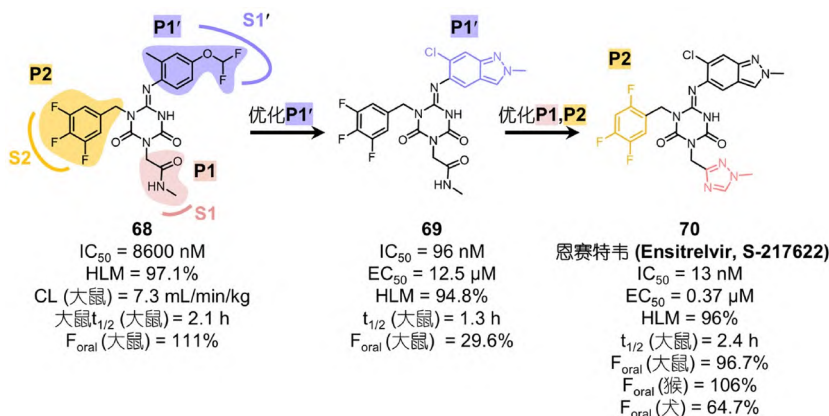


图 35 (网络版彩图)恩赛特韦的设计理念与优化路径

Figure 35 (Color online) Design and optimization routes of Ensitrelvir.

肽、非共价型口服新冠病毒3CL蛋白酶抑制剂,其成功研发再次展示了基于结构的药物设计和计算机辅助药物设计策略在广谱抗病毒药物开发中发挥的关键作用。

恩赛特韦的研发起源于北海道大学与盐野义制药团队对内部化合物库的三维药效团虚拟筛选,其设计核心基于SARS-CoV-2 3CL蛋白酶与抑制剂的保守结合特征:与S1亚位点His163的氢键作用、与S2疏水口袋的范德华相互作用及与Glu166主链氮的氢键网络^[10]。通过300个打分高的化合物的抑制活性测试,苗头化合物68 (IC₅₀ = 8.6 μM)因优异的药代特性脱颖而出——其在大鼠体内表现出111%的口服生物利用度与7.3 mL/(min kg)的低清除率,且人和大鼠的肝微粒体代谢稳定性分别达97%和71% (图35)。复合物晶体结构解析显示,该分子通过甲基酰胺、3,4,5-三氟苯基及4-二氟甲氧基-2-甲基苯分别占据S1、S2与S1'亚位点,其中核心三嗪基团的2-羰基氧与Glu166主链形成氢键,4-羰基氧则锚定于氧阴离子孔穴,而甲基酰胺羰基氧与His163侧链的氢键进一步稳定结合构象。值得注意的是,S2亚位点的His41与3,4,5-三氟苯基形成独特的面对面π-π堆积作用,P1'位醚氧基团与Thr26主链的氢键则揭示了新的结合模式(图36a)。

基于化合物68与蛋白酶的复合物晶体结构,研发团队将P1'位改造为6-氯-2-甲基-2H-吡啶-5-基,通过环化增强与Thr26的氢键及疏水接触,使化合物69的抑制活性提升90倍。进一步将P1位替换为1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基、P2位优化为2,4,5-三氟苯基,最终获得候选药物恩赛特韦(70, Ensitrelvir, S-217622),其IC₅₀为

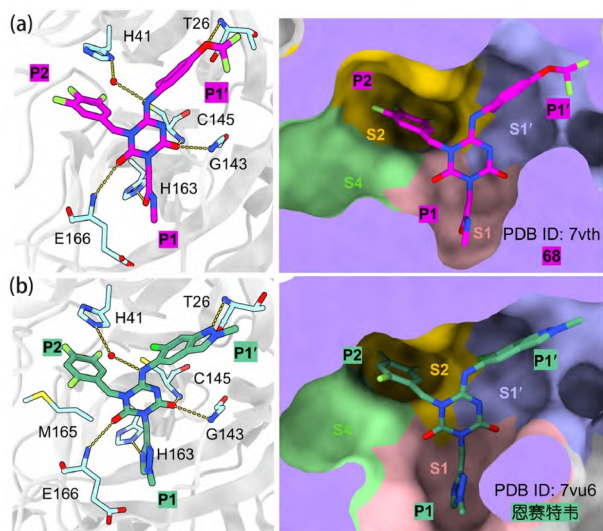


图 36 (网络版彩图) SARS-CoV-2 3CL蛋白酶与 (a) 68和 (b) 恩赛特韦的结合模式

Figure 36 (Color online) Binding modes of (a) 68 and (b) Ensitrelvir with SARS-CoV-2 3CL protease.

13 nM, EC_{50} 达0.37 μ M. 该分子在多种动物模型中展现出卓越的药代属性: 猴与犬的半衰期分别达10和30 h, 口服生物利用度显著优于同类药物, 支持每日单次给药且无需联用利托那韦. 复合物晶体结构解析证实, 其P1位三唑基与His163形成定向稳定氢键, P2位三氟苯基与His41维持 π - π 相互作用, 而His41的侧链构象翻转稳定了S2结合腔的疏水环境(图36b). 体外抗病毒谱显示, 恩赛特韦对SARS-CoV-2变异株(EC_{50} = 0.29~0.50 μ M)、中东呼吸综合征冠状病毒(EC_{50} = 1.4 μ M)及人冠状病毒OC43 (EC_{90} = 0.074 μ M)均具强效抑制活性, 提示其作为广谱抗冠状病毒药物的潜力. 这种基于抑制剂与靶点保守作用模式的理性设计, 为应对未来新发冠状病毒大流行提供了普适性的抗病毒药物开发策略.

6 总结与展望

本文以HIV蛋白酶、HCV NS3/4A蛋白酶及SARS-CoV-2 3CL蛋白酶的底物识别机制、三维结构与催化机制解析为基础, 系统阐述SBDD策略在开发

靶向上述三类病毒蛋白酶的上市抗病毒药物中的应用路径. 在从苗头化合物发现到临床候选化合物确立的关键研发阶段, 抑制剂普遍保留P4-P2'位的4~5个关键结构单元; 通过引入过渡态模拟物、C端羧基电子等排体及共价弹头实现与催化残基的定向结合; 采用电子等排替换、环化修饰或取代基引入等方式减少酰胺键数量以改善药代动力学特性; 同时运用“主链结合”策略和大环化构象限制策略增强对耐药突变毒株的抵抗能力. 本文重点剖析了关键基团优化对蛋白酶抑制活性、细胞抗病毒活性、细胞渗透性及药代动力学属性的差异化影响, 为继续研发病毒蛋白酶抑制剂药物提供系统深入的经验借鉴和理论指导. 例如, 为应对潜在猴痘病毒大流行, 最近已有多个研究团队解析了猴痘病毒核心蛋白酶的三维结构, 通过基于结构的理性设计发现抑制活性优异的拟肽类抑制剂, 但细胞抗病毒活性与成药性有待优化^[111,112]. 为此, 针对该类抑制剂, 可采取缩短拟肽链长度并引入酰胺键电子等排体, 以改善药代动力学性质; 同时利用“主链结合”策略强化与蛋白酶主链原子的氢键作用, 并基于“底物包膜”原则, 利用X射线蛋白质晶体衍射和冷冻电镜解析的复合物结构限制抑制剂体积, 以应对潜在的耐药突变.

此外, 本文的案例也展现了SBDD与计算机辅助药物设计不断融合的演变进程: 从HIV蛋白酶抑制剂利用分子对接指导拟肽结构优化, 到HCV NS3/4A蛋白酶通过整合虚拟聚焦库和虚拟筛选发现拟肽类苗头化合物, 以及近期针对SARS-CoV-2 3CL蛋白酶直接实现虚拟筛选驱动非拟肽小分子抑制剂的发现. 随着当前AI技术的不断发展(如AlphaFold3实现高精度蛋白结构预测、扩散模型拓展化学空间探索等), 将深度赋能SBDD策略, 有望实现新的突破, 从“结构驱动理性设计”向“智能生成”转变, 从而进一步加速抗病毒蛋白酶抑制剂的研发进程. 同样以上述猴痘病毒蛋白酶抑制剂研发为例, 通过锚定抑制剂-蛋白酶的保守作用模式, 利用基于结构的虚拟筛选及AI模型从大型虚拟库中挖掘具有成药潜力且化学合成简易的新型骨架苗头化合物, 开展非拟肽的小分子抑制剂的从头设计与优化.

致谢 在陈凯先院士80华诞之际, 谨以此文献给在药物设计学领域做出杰出贡献的陈先生.

参考文献

- 1 Agbowuro AA, Huston WM, Gamble AB, Tyndall JDA. *Med Res Rev*, 2018, 38: 1295–1331
- 2 Ghosh AK, Osswald HL, Prato G. *J Med Chem*, 2016, 59: 5172–5208
- 3 Manns MP, Maasoumy B. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2022, 19: 533–550
- 4 Puoti M, Foster GR, Wang S, Mutimer D, Gane E, Moreno C, Chang TT, Lee SS, Marinho R, Dufour JF, Pol S, Hezode C, Gordon SC, Strasser SI, Thuluvath PJ, Zhang Z, Lovell S, Pilot-Matias T, Mensa FJ. *J Hepatol*, 2018, 69: 293–300
- 5 Owen DR, Allerton CMN, Anderson AS, Aschenbrenner L, Avery M, Berritt S, Boras B, Cardin RD, Carlo A, Coffman KJ, Dantonio A, Di L, Eng H, Ferre RA, Gajiwala KS, Gibson SA, Greasley SE, Hurst BL, Kadar EP, Kalgutkar AS, Lee JC, Lee J, Liu W, Mason SW, Noell S, Novak JJ, Obach RS, Ogilvie K, Patel NC, Pettersson M, Rai DK, Reese MR, Sammons MF, Sathish JG, Singh RSP, Steppan CM, Stewart AE, Tuttle JB, Updyke L, Verhoest PR, Wei L, Yang Q, Zhu Y. *Science*, 2021, 374: 1586–1593
- 6 Wlodawer A, Miller M, Jaskólski M, Sathyanarayana BK, Baldwin E, Weber IT, Selk LM, Clawson L, Schneider J, Kent SBH. *Science*, 1989, 245: 616–621
- 7 Roberts NA, Martin JA, Kinchington D, Broadhurst AV, Craig JC, Duncan IB, Galpin SA, Handa BK, Kay J, Kröhn A, Lambert RW, Merrett JH, Mills JS, Parkes KEB, Redshaw S, Ritchie AJ, Taylor DL, Thomas GJ, Machin PJ. *Science*, 1990, 248: 358–361
- 8 Kempf DJ, Marsh KC, Denissen JF, McDonald E, Vasavanonda S, Flentge CA, Green BE, Fino L, Park CH, Kong XP. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 2484–2488
- 9 Tuttle JB, Allais C, Allerton CMN, Anderson AS, Arcari JT, Aschenbrenner LM, Avery M, Bellenger J, Berritt S, Boras B, Boscoe BP, Buzon LM, Cardin RD, Carlo AA, Coffman KJ, Dantonio A, Di L, Eng H, Farley KA, Ferre RA, Gajiwala KS, Gibson SA, Greasley SE, Hurst BL, Kadar EP, Kalgutkar AS, Lachapelle EA, Lanyon LF, Lee J, Lee J, Lian Y, Liu W, Martínez-Alsina LA, Mason SW, Noell S, Novak J, Obach RS, Ogilvie K, O’Neil SV, Ostner G, Owen DR, Patel NC, Pettersson M, Singh RS, Rai DK, Reese MR, Sakata S, Sammons MF, Sathish JG, Sharma R, Steppan CM, Stewart A, Updyke L, Verhoest PR, Wei L, Wright SW, Yang E, Yang Q, Zhu Y. *J Med Chem*, 2025, 68: 7003–7030
- 10 Unoh Y, Uehara S, Nakahara K, Nobori H, Yamatsu Y, Yamamoto S, Maruyama Y, Taoda Y, Kasamatsu K, Suto T, Kouki K, Nakahashi A, Kawashima S, Sanaki T, Toba S, Uemura K, Mizutare T, Ando S, Sasaki M, Orba Y, Sawa H, Sato A, Sato T, Kato T, Tachibana Y. *J Med Chem*, 2022, 65: 6499–6512
- 11 Jiang X, Su H, Shang W, Zhou F, Zhang Y, Zhao W, Zhang Q, Xie H, Jiang L, Nie T, Yang F, Xiong M, Huang X, Li M, Chen P, Peng S, Xiao G, Jiang H, Tang R, Zhang L, Shen J, Xu Y. *Nat Commun*, 2023, 14: 6463
- 12 Engelman A, Cherepanov P. *Nat Rev Microbiol*, 2012, 10: 279–290
- 13 Tözsér J, Oroszlan S. *Curr Pharm Des*, 2003, 9: 1803–1815
- 14 Nuwagaba J, Li JA, Ngo B, Sutton RE. *Virology*, 2025, 603: 110362
- 15 Rao H, Wei L, Lopez-Talavera JC, Shang J, Chen H, Li J, Xie Q, Gao Z, Wang L, Wei J, Jiang J, Sun Y, Yang R, Li H, Zhang H, Gong Z, Zhang L, Zhao L, Dou X, Niu J, You H, Chen Z, Ning Q, Gong G, Wu S, Ji W, Mao Q, Tang H, Li S, Wei S, Sun J, Jiang J, Lu L, Jia J, Zhuang H. *J Gastro Hepatol*, 2014, 29: 545–553
- 16 Wei L, Xu XY, Li TS. *Chin J Clin Infect Dis*, 2022, 15: 428–447 (in Chinese) [魏来, 徐小元, 李太生. 中国临床感染病杂志, 2022, 15: 428–447]
- 17 Romano KP, Laine JM, Deveau LM, Cao H, Massi F, Schiffer CA. *J Virol*, 2011, 85: 6106–6116
- 18 Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, Niu P, Zhan F, Ma X, Wang D, Xu W, Wu G, Gao GF, Tan W. *N Engl J Med*, 2020, 382: 727–733
- 19 Carabelli AM, Peacock TP, Thorne LG, Harvey WT, Hughes J, de Silva TI, Peacock SJ, Barclay WS, de Silva TI, Towers GJ, Robertson DL. *Nat Rev Microbiol*, 2023, 21: 162–177
- 20 Xiong M, Su H, Zhao W, Xie H, Shao Q, Xu Y. *Med Res Rev*, 2021, 41: 1965–1998
- 21 Schechter I, Berger A. *Biochem Biophys Res Co*, 2012, 425: 497–502
- 22 Weber IT, Wang YF, Harrison RW. *Viruses*, 2021, 13: 839
- 23 Deshmukh L, Tugarinov V, Louis JM, Clore GM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114: E9855
- 24 Romano KP, Ali A, Royer WE, Schiffer CA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 20986–20991

- 25 Shaqra AM, Zvornicanin SN, Huang QYJ, Lockbaum GJ, Knapp M, Tandeske L, Bakan DT, Flynn J, Bolon DNA, Moquin S, Dovala D, Kurt Yilmaz N, Schiffer CA. *Nat Commun*, 2022, 13: 3556
- 26 Li C, Sun Q, Lu Y, Liu Y, Lai L. *Sci Sin Chim*, 2020, 50: 1250–1279 [李春梅, 孙琦, 陆阳彬, 刘莹, 来鲁华. 中国科学, 2020, 50: 1250–1279]
- 27 Spinelli S, Liu Q, Alzari P, Hirel P, Poljak R. *Biochimie*, 1991, 73: 1391–1396
- 28 Tie Y, Boross PI, Wang YF, Gaddis L, Liu F, Chen X, Tozser J, Harrison RW, Weber IT. *FEBS J*, 2005, 272: 5265–5277
- 29 Sanusi ZK, Lawal MM, Govender T, Maguire GEM, Honarparvar B, Kruger HG. *J Phys Chem B*, 2019, 123: 6389–6400
- 30 Sanusi ZK, Lawal MM, Govender T, Baijnath S, Naicker T, Maguire GEM, Honarparvar B, Kruger HG. *Phys Chem Chem Phys*, 2020, 22: 2530–2539
- 31 Zheng C, Schneider M, Marion A, Antes I. *Phys Chem Chem Phys*, 2022, 24: 2126–2138
- 32 Zhang Y, Kua J, McCammon JA. *J Am Chem Soc*, 2002, 124: 10572–10577
- 33 Kneller DW, Phillips G, O'Neill HM, Jedrzejczak R, Stols L, Langan P, Joachimiak A, Coates L, Kovalevsky A. *Nat Commun*, 2020, 11: 3202
- 34 Zanetti-Polzi L, Smith MD, Chipot C, Gumbart JC, Lynch DL, Pavlova A, Smith JC, Daidone I. *J Phys Chem Lett*, 2021, 12: 4195–4202
- 35 Xiong M, Nie T, Li Z, Hu M, Su H, Hu H, Xu Y, Shao Q. *J Chem Inf Model*, 2024, 64: 9501–9516
- 36 Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautquet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W, Montagnier L. *Science*, 1983, 220: 868–871
- 37 Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J, Popovic M. *Science*, 1983, 220: 865–867
- 38 Das D. *Geomech Health Med*, 2024, 6: 357–362
- 39 Ghosh AK, Anderson DD, Weber IT, Mitsuya H. *Angew Chem Int Ed*, 2012, 51: 1778–1802
- 40 Ghosh AK, Chapsal BD, Weber IT, Mitsuya H. *Acc Chem Res*, 2008, 41: 78–86
- 41 Krohn A, Redshaw S, Ritchie JC, Graves BJ, Hatada MH. *J Med Chem*, 1991, 34: 3340–3342
- 42 Kempf DJ, Norbeck DW, Codacovi LM, Wang XC, Kohlbrenner WE, Wideburg NE, Paul DA, Knigge MF, Vasavanonda S. *J Med Chem*, 1990, 33: 2687–2689
- 43 Kempf DJ, Marsh KC, Paul DA, Knigge MF, Norbeck DW, Kohlbrenner WE, Codacovi L, Vasavanonda S, Bryant P, Wang XC. *Antimicrob Agents Ch*, 1991, 35: 2209–2214
- 44 Kempf DJ, Marsh KC, Fino LC, Bryant P, Craig-Kennard A, Sham HL, Zhao C, Vasavanonda S, Kohlbrenner WE, Wideburg NE, Saldivar A, Green BE, Herrin T, Norbeck DW. *Bioorg Med Chem*, 1994, 2: 847–858
- 45 Kumar GN, Rodrigues AD, Buko AM, Denissen JF. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, 277: 423–431
- 46 Kneller DW, Agniswamy J, Harrison RW, Weber IT. *FEBS J*, 2020, 287: 3235–3254
- 47 Weber IT, Agniswamy J. *Viruses*, 2009, 1: 1110–1136
- 48 Wensing AM, Calvez V, Ceccherini-Silberstein F, Charpentier C, Gunthard HF, Paredes R, Shafer RW, Richman DD. *Top Antivir Med*, 2022, 30: 559–574
- 49 Liu F, Boross PI, Wang YF, Tozser J, Louis JM, Harrison RW, Weber IT. *J Mol Biol*, 2005, 354: 789–800
- 50 Louis JM, Zhang Y, Sayer JM, Wang YF, Harrison RW, Weber IT. *Biochemistry*, 2011, 50: 4786–4795
- 51 Ghosh AK, Thompson WJ, Holloway MK, McKee SP, Duong TT, Lee HY, Munson PM, Smith AM, Wai JM, Darke PL, Zugay JA, Emimi EA, Schleif WA, Huff JR, Anderson PS. *J Med Chem*, 1993, 36: 2300–2310
- 52 Clark MR, Mohandas N, Shohet SB. *J Clin Invest*, 1982, 70: 1074–1080
- 53 Nakanishi K. *Bioorg Med Chem*, 2005, 13: 4987–5000
- 54 Ghosh AK, Lee HY, Thompson WJ, Culberson C, Holloway MK, McKee SP, Munson PM, Duong TT, Smith AM. *J Med Chem*, 1994, 37: 1177–1188
- 55 Vazquez ML, Bryant ML, Clare M, DeCrescenzo GA, Doherty EM, Freskos JN, Getman DP, Houseman KA, Julien JA, Kocan GP, Mueller RA, Shieh HS, Stallings WC, Stegeman RA, Tilley JJ. *J Med Chem*, 1995, 38: 581–584
- 56 Kim EE, Baker CT, Dwyer MD, Murcko MA, Rao BG, Tung RD, Navia MA. *J Am Chem Soc*, 1995, 117: 1181–1182
- 57 Ghosh AK, Thompson WJ, Fitzgerald PMD, Culberson JC, Axel MG, McKee SP, Huff JR, Anderson PS. *J Med Chem*, 1994, 37: 2506–2508
- 58 Ghosh AK, Kincaid JF, Walters DE, Chen Y, Chaudhuri NC, Thompson WJ, Culberson C, Fitzgerald PMD, Lee HY, McKee SP, Munson PM, Duong TT, Darke PL, Zugay JA, Schleif WA, Axel MG, Lin J, Huff JR. *J Med Chem*, 1996, 39: 3278–3290

- 59 Ghosh AK, Kincaid JF, Cho W, Walters DE, Krishnan K, Hussain KA, Koo Y, Cho H, Rudall C, Holland L, Buthod J. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 687–690
- 60 De Meyer S, Azijn H, Surleraux D, Jochmans D, Tahri A, Pauwels R, Wigerinck P, de Bethune MP. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 2314–2321
- 61 Tie Y, Boross PI, Wang YF, Gaddis L, Hussain AK, Leshchenko S, Ghosh AK, Louis JM, Harrison RW, Weber IT. *J Mol Biol*, 2004, 338: 341–352
- 62 Ghosh AK, Dawson ZL, Mitsuya H. *Bioorg Med Chem*, 2007, 15: 7576–7580
- 63 Ghosh AK, Ramu Sridhar P, Kumaragurubaran N, Koh Y, Weber IT, Mitsuya H. *ChemMedChem*, 2006, 1: 939–950
- 64 King NM, Prabu-Jeyabalan M, Nalivaika EA, Wigerinck P, de Bethune MP, Schiffer CA. *J Virol*, 2004, 78: 12012–12021
- 65 Thaisrivongs S, Tomich PK, Watenpaugh KD, Chong KT, Howe WJ, Yang CP, Strohbach JW, Turner SR, McGrath JP. *J Med Chem*, 1994, 37: 3200–3204
- 66 Thaisrivongs S, Watenpaugh KD, Howe WJ, Tomich PK, Dolak LA, Chong KT, Tomich CSC, Tomasselli AG, Turner SR. *J Med Chem*, 1995, 38: 3624–3637
- 67 Skulnick HI, Johnson PD, Howe WJ, Tomich PK, Chong KT, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Dolak LA, McGrath JP. *J Med Chem*, 1995, 38: 4968–4971
- 68 Thaisrivongs S, Romero DL, Tommasi RA, Janakiraman MN, Strohbach JW, Turner SR, Biles C, Morge RR, Johnson PD, Aristoff PA, Tomich PK, Lynn JC, Horng MM, Chong KT, Hinshaw RR, Howe WJ, Finzel BC, Watenpaugh KD. *J Med Chem*, 1996, 39: 4630–4642
- 69 Skulnick HI, Johnson PD, Aristoff PA, Morris JK, Lovasz KD, Howe WJ, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Anderson DJ, Reischer RJ, Schwartz TM, Banitt LS, Tomich PK, Lynn JC, Horng MM, Chong KT, Hinshaw RR, Dolak LA, Seest EP, Schwende FJ, Rush BD, Howard GM, Toth LN, Wilkinson KR, Kakuk TJ, Johnson CW, Cole SL, Zaya RM, Zipp GL, Possert PL, Dalga RJ, Zhong WZ, Williams MG, Romines KR. *J Med Chem*, 1997, 40: 1149–1164
- 70 Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Aristoff PA, Johnson PD, Skulnick HI, Dolak LA, Seest EP, Tomich PK, Bohanon MJ, Horng MM, Lynn JC, Chong KT, Hinshaw RR, Watenpaugh KD, Janakiraman MN, Thaisrivongs S. *J Med Chem*, 1998, 41: 3467–3476
- 71 Poppe SM, Slade DE, Chong KT, Hinshaw RR, Pagano PJ, Markowitz M, Ho DD, Mo H, Gorman 3rd RR, Dueweke TJ, Thaisrivongs S, Tarpley WG. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 1058–1063
- 72 Thaisrivongs S, Skulnick HI, Turner SR, Strohbach JW, Tommasi RA, Johnson PD, Aristoff PA, Judge TM, Gammill RB, Morris JK, Romines KR, Chrusciel RA, Hinshaw RR, Chong KT, Tarpley WG, Poppe SM, Slade DE, Lynn JC, Horng MM, Tomich PK, Seest EP, Dolak LA, Howe WJ, Howard GM, Schwende FJ, Toth LN, Padbury GE, Wilson GJ, Shiou L, Zipp GL, Wilkinson KF, Rush BD, Ruwart MJ, Koeplinger KA, Zhao Z, Cole S, Zaya RM, Kakuk TJ, Janakiraman MN, Watenpaugh KD. *J Med Chem*, 1996, 39: 4349–4353
- 73 Chan-Tack KM, Struble KA, Birnkrant DB. *AIDS Patient Care STDs*, 2008, 22: 843–850
- 74 Wong-Sam A, Wang YF, Zhang Y, Ghosh AK, Harrison RW, Weber IT. *ACS Omega*, 2018, 3: 12132–12140
- 75 Matthew AN, Zephyr J, Nageswara Rao D, Henes M, Kamran W, Kosovrasti K, Hedger AK, Lockbaum GJ, Timm J, Ali A, Kurt Yilmaz N, Schiffer CA, Brennan RG. *mBio*, 2020, 11: e00172
- 76 Romano KP, Ali A, Aydin C, Soumana D, Özen A, Deveau LM, Silver C, Cao H, Newton A, Petropoulos CJ, Huang W, Schiffer CA, Gamarnik A. *PLoS Pathog*, 2012, 8: e1002832
- 77 Coppola N, Minichini C, Starace M, Sagnelli C, Sagnelli E. *J Med Virol*, 2016, 88: 1659–1671
- 78 Malandris K, Kalopitas G, Theocharidou E, Germanidis G. *Viruses*, 2021, 13: 2096
- 79 Mehta NV, Degani MS. *Drug Discov Today*, 2023, 28: 103799
- 80 Gehringer M, Laufer SA. *J Med Chem*, 2019, 62: 5673–5724
- 81 Boike L, Henning NJ, Nomura DK. *Nat Rev Drug Discov*, 2022, 21: 881–898
- 82 Müller P, Meta M, Meidner JL, Schwickert M, Meyr J, Schwickert K, Kersten C, Zimmer C, Hammerschmidt SJ, Frey A, Lahu A, de la Hoz-Rodríguez S, Agost-Beltrán L, Rodríguez S, Diemer K, Neumann W, González FV, Engels B, Schirmeister T. *Int J Mol Sci*, 2023, 24: 7226
- 83 Adams J, Kauffman M. *Cancer Invest*, 2004, 22: 304–311
- 84 Brogi S, Ibba R, Rossi S, Butini S, Calderone V, Gemma S, Campiani G. *Molecules*, 2022, 27: 2561
- 85 Venkatraman S, Bogen SL, Arasappan A, Bennett F, Chen K, Jao E, Liu YT, Lovey R, Hendrata S, Huang Y, Pan W, Parekh T, Pinto P, Popov V, Pike R, Ruan S, Santhanam B, Vibulbhan B, Wu W, Yang W, Kong J, Liang X, Wong J, Liu R, Butkiewicz N, Chase R, Hart A, Agrawal S,

- Ingravallo P, Pichardo J, Kong R, Baroudy B, Malcolm B, Guo Z, Prongay A, Madison V, Broske L, Cui X, Cheng KC, Hsieh Y, Brisson JM, Prelusky D, Korfmacher W, White R, Bogdanowich-Knipp S, Pavlovsky A, Bradley P, Saksena AK, Ganguly A, Piwinski J, Girijavallabhan V, Njoroge FG. *J Med Chem*, 2006, 49: 6074–6086
- 86 Bogen SL, Arasappan A, Bennett F, Chen K, Jao E, Liu YT, Lovey RG, Venkatraman S, Pan W, Parekh T, Pike RE, Ruan S, Liu R, Baroudy B, Agrawal S, Chase R, Ingravallo P, Pichardo J, Prongay A, Brisson JM, Hsieh TY, Cheng KC, Kemp SJ, Levy OE, Lim-Wilby M, Tamura SY, Saksena AK, Girijavallabhan V, Njoroge FG. *J Med Chem*, 2006, 49: 2750–2757
- 87 Prongay AJ, Guo Z, Yao N, Pichardo J, Fischmann T, Strickland C, Myers J, Weber PC, Beyer BM, Ingram R, Hong Z, Prosisse WW, Ramanathan L, Taremi SS, Yarosh-Tomaine T, Zhang R, Senior M, Yang RS, Malcolm B, Arasappan A, Bennett F, Bogen SL, Chen K, Jao E, Liu YT, Lovey RG, Saksena AK, Venkatraman S, Girijavallabhan V, Njoroge FG, Madison V. *J Med Chem*, 2007, 50: 2310–2318
- 88 Arasappan A, Padilla AI, Jao E, Bennett F, Bogen SL, Chen KX, Pike RE, Sannigrahi M, Soares J, Venkatraman S, Vibulbhan B, Saksena AK, Girijavallabhan V, Tong X, Cheng KC, Njoroge FG. *J Med Chem*, 2009, 52: 2806–2817
- 89 Bogen SL, Pan W, Ruan S, Nair LG, Arasappan A, Bennett F, Chen KX, Jao E, Venkatraman S, Vibulbhan B, Liu R, Cheng KC, Guo Z, Tong X, Saksena AK, Girijavallabhan V, Njoroge FG. *J Med Chem*, 2009, 52: 3679–3688
- 90 Arasappan A, Bennett F, Bogen SL, Venkatraman S, Blackman M, Chen KX, Hendrata S, Huang Y, Huelgas RM, Nair L, Padilla AI, Pan W, Pike R, Pinto P, Ruan S, Sannigrahi M, Velazquez F, Vibulbhan B, Wu W, Yang W, Saksena AK, Girijavallabhan V, Shih NY, Kong J, Meng T, Jin Y, Wong J, McNamara P, Prongay A, Madison V, Piwinski JJ, Cheng KC, Morrison R, Malcolm B, Tong X, Ralston R, Njoroge FG. *ACS Med Chem Lett*, 2010, 1: 64–69
- 91 Driggers EM, Hale SP, Lee J, Terrett NK. *Nat Rev Drug Discov*, 2008, 7: 608–624
- 92 Marsault E, Peterson ML. *J Med Chem*, 2011, 54: 1961–2004
- 93 LaPlante SR, Cameron DR, Aubry N, Lefebvre S, Kukolj G, Maurice R, Thibeault D, Lamarre D, Llinàs-Brunet M. *J Biol Chem*, 1999, 274: 18618–18624
- 94 Tsantrizos YS, Bolger G, Bonneau P, Cameron DR, Goudreau N, Kukolj G, LaPlante SR, Llinàs-Brunet M, Nar H, Lamarre D. *Angew Chem Int Ed*, 2003, 42: 1356–1360
- 95 Llinàs-Brunet M, Bailey MD, Bolger G, Brochu C, Faucher AM, Ferland JM, Garneau M, Ghiro E, Gorys V, Grand-Maître C, Halmos T, Lapeyre-Paquette N, Liard F, Poirier M, Rhéaume M, Tsantrizos YS, Lamarre D. *J Med Chem*, 2004, 47: 1605–1608
- 96 Stoltz JH, Stern JO, Huang Q, Seidler RW, Pack FD, Knight BL. *Toxicol Pathol*, 2011, 39: 496–501
- 97 Miao M, Jing X, De Clercq E, Li G. *Drug Des Devel Ther*, 2020, Volume 14: 2759–2774
- 98 Jiang Y, Andrews SW, Condroski KR, Buckman B, Serebryany V, Wenglowksy S, Kennedy AL, Madduru MR, Wang B, Lyon M, Doherty GA, Woodard BT, Lemieux C, Do MG, Zhang H, Ballard J, Vigers G, Brandhuber BJ, Stengel P, Josey JA, Beigelman L, Blatt L, Seiwert SD. *J Med Chem*, 2014, 57: 1753–1769
- 99 Liverton NJ, Holloway MK, McCauley JA, Rudd MT, Butcher JW, Carroll SS, DiMuzio J, Fandozzi C, Gilbert KF, Mao SS, McIntyre CJ, Nguyen KT, Romano JJ, Stahlhut M, Wan BL, Olsen DB, Vacca JP. *J Am Chem Soc*, 2008, 130: 4607–4609
- 100 McCauley JA, McIntyre CJ, Rudd MT, Nguyen KT, Romano JJ, Butcher JW, Gilbert KF, Bush KJ, Holloway MK, Swestock J, Wan BL, Carroll SS, DiMuzio JM, Graham DJ, Ludmerer SW, Mao SS, Stahlhut MW, Fandozzi CM, Trainor N, Olsen DB, Vacca JP, Liverton NJ. *J Med Chem*, 2010, 53: 2443–2463
- 101 Rudd MT, McCauley JA, Butcher JW, Romano JJ, McIntyre CJ, Nguyen KT, Gilbert KF, Bush KJ, Holloway MK, Swestock J, Wan BL, Carroll SS, DiMuzio JM, Graham DJ, Ludmerer SW, Stahlhut MW, Fandozzi CM, Trainor N, Olsen DB, Vacca JP, Liverton NJ. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 207–212
- 102 Harper S, McCauley JA, Rudd MT, Ferrara M, DiFilippo M, Crescenzi B, Koch U, Petrocchi A, Holloway MK, Butcher JW, Romano JJ, Bush KJ, Gilbert KF, McIntyre CJ, Nguyen KT, Nizi E, Carroll SS, Ludmerer SW, Burlein C, DiMuzio JM, Graham DJ, McHale CM, Stahlhut MW, Olsen DB, Monteagudo E, Cianetti S, Giuliano C, Pucci V, Trainor N, Fandozzi CM, Rowley M, Coleman PJ, Vacca JP, Summa V, Liverton NJ. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3: 332–336
- 103 Zephyr J, Nageswara Rao D, Vo SV, Henes M, Kosovrasti K, Matthew AN, Hedger AK, Timm J, Chan ET, Ali A, Kurt Yilmaz N, Schiffer CA. *J Mol Biol*, 2022, 434: 167503
- 104 Taylor JG, Zipfel S, Ramey K, Vivian R, Schrier A, Karki KK, Katana A, Kato D, Kobayashi T, Martinez R, Sangi M, Siegel D, Tran CV, Yang ZY, Zablocki J, Yang CY, Wang Y, Wang K, Chan K, Barauskas O, Cheng G, Jin D, Schultz BE, Appleby T, Villaseñor AG, Link JO. *Bioorg*

- Med Chem Lett*, 2019, 29: 2428–2436
- 105 Soumana DI, Kurt Yilmaz N, Prachanronarong KL, Aydin C, Ali A, Schiffer CA. *ACS Chem Biol*, 2016, 11: 900–909
- 106 Soumana DI, Kurt Yilmaz N, Ali A, Prachanronarong KL, Schiffer CA. *J Am Chem Soc*, 2016, 138: 11850–11859
- 107 Hoffman RL, Kania RS, Brothers MA, Davies JF, Ferre RA, Gajiwala KS, He M, Hogan RJ, Kozminski K, Li LY, Lockner JW, Lou J, Marra MT, Mitchell Jr. LJ, Murray BW, Nieman JA, Noell S, Planken SP, Rowe T, Ryan K, Smith Iii GJ, Solowiej JE, Stepan CM, Taggart B. *J Med Chem*, 2020, 63: 12725–12747
- 108 Duan Y, Zhou H, Liu X, Iketani S, Lin M, Zhang X, Bian Q, Wang H, Sun H, Hong SJ, Culbertson B, Mohri H, Luck MI, Zhu Y, Liu X, Lu Y, Yang X, Yang K, Sabo Y, Chavez A, Goff SP, Rao Z, Ho DD, Yang H. *Nature*, 2023, 622: 376–382
- 109 Iketani S, Mohri H, Culbertson B, Hong SJ, Duan Y, Luck MI, Annavajhala MK, Guo Y, Sheng Z, Uhlemann AC, Goff SP, Sabo Y, Yang H, Chavez A, Ho DD. *Nature*, 2023, 613: 558–564
- 110 Cannalire R, Barreca ML, Manfroni G, Cecchetti V. *J Med Chem*, 2016, 59: 16–41
- 111 Su H, Wu G, Xiong M, Wang Y, Cao J, You M, Xiang Y, Nie T, Li M, Xiao G, Zhang L, Shao Q, Xu Y. *Adv Sci*, 2025, 2501625
- 112 Gao Y, Xie X, Zhang X, Cao J, Lan W, You T, Li D, Dong X, Dai W, Xiang Y, Hu S, Shang W, Wu B, Zhang Y, Xu J, Liu X, Wang H, Hu W, Zhang M, Duan Y, Cui W, Zhou H, Mao S, Jia H, Sun Z, Jia M, Yin Y, Nguyen HC, Yang K, Yang B, Yang X, Ji X, Xiao G, Wang W, Zhang L, Rao Z, Liu H, Yang H. *Nature*, 2025, 643: 271–279

Structure-based rational design of viral protease inhibitors: case studies of approved drugs

Muya Xiong¹, Tianqing Nie^{2,3}, Haixia Su^{4,5}, Yechun Xu^{1,2,3,4,5*}

¹ School of Pharmaceutical Science and Technology, Hangzhou Institute for Advanced Study, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310024, China

² Lingang Laboratory, Shanghai 200031, China

³ School of Physical Science and Technology, ShanghaiTech University, Shanghai 201210, China

⁴ State Key Laboratory of Drug Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

⁵ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China

*Corresponding author (email: ycxu@simm.ac.cn)

Abstract: This review focuses on approved antiviral drugs targeting viral proteases. It first systematically reviews three critical aspects: (i) substrate recognition mechanisms, (ii) characteristics of ligand binding sites, and (iii) catalytic reaction mechanisms of these viral proteases. Subsequently, special emphasis is placed on the analysis of the inhibitor/drug binding modes with these proteases, structural optimization pathways of the drugs, and structure-activity relationship studies. Collectively, it demonstrates the pivotal role of structure-based drug design (SBDD) in the development of approved viral protease inhibitors. Overall, this review aims to provide exemplary cases and methodological references for drug development researchers to conduct SBDD, facilitate SBDD methods development and assist in the development and clinical application of antiviral drugs.

Keywords: human immunodeficiency virus protease, hepatitis C virus NS3/4A protease, SARS-CoV-2 3CL protease, protease inhibitors, structure-based drug design

doi: [10.1360/SSC-2025-0133](https://doi.org/10.1360/SSC-2025-0133)