

研究报告

人冠状病毒 OC43 对主蛋白酶抑制剂 FB2001 的耐药性

陈露^{1,2}, 尚卫娟², 张磊珂², 肖庚富², 刘文^{*1}, 张宇旻^{*2}

1 三峡大学 生物与制药学院, 湖北 宜昌 443002

2 中国科学院武汉病毒研究所 生物安全大科学中心病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430071

陈露, 尚卫娟, 张磊珂, 肖庚富, 刘文, 张宇旻. 人冠状病毒 OC43 对主蛋白酶抑制剂 FB2001 的耐药性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(6): 2828-2843.

CHEN Lu, SHANG Weijuan, ZHANG Leike, XIAO Gengfu, LIU Wen, ZHANG Yumin. The resistance characteristics and mechanisms of HCoV-OC43 to protease inhibitor FB2001[J]. Microbiology China, 2025, 52(6): 2828-2843.

摘要:【背景】人冠状病毒 OC43 (human coronavirus OC43, HCoV-OC43)属 β 冠状病毒, 其感染会对免疫低下的老人和幼儿的健康带来严重威胁。FB2001 作为已进入临床试验的抗冠状病毒主蛋白酶 3CLpro 抑制剂, 前期研究表明其对 HCoV-OC43 也具有良好的抗病毒活性, 但 HCoV-OC43 对 FB2001 的耐药特征有待阐明。【目的】研究 HCoV-OC43 3CLpro 对 FB2001 产生的耐药突变位点及耐药机制, 发现冠状病毒对 3CLpro 抑制剂耐药的共性特征, 对广谱抗冠状病毒 3CLpro 小分子药物的开发和优化改造具有重要意义。【方法】通过在体外进行药物压力下连续传代实验获得具有明显耐药表型的 HCoV-OC43 耐药适应株, 二代测序(next generation sequencing, NGS)发现病毒 3CLpro 上存在多个突变位点, 然后构建 HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP 活细胞酶活系统验证耐药突变特征, 最后通过 AlphaFold 3 和 DiffDock 人工智能平台获得突变蛋白-小分子的结合模式, 分析耐药机制并通过生长竞争试验研究耐药适应株的生长适应性变化。【结果】耐药适应株 3CLpro 出现 D65G、L165V、I300T、D65G+L165V 氨基酸突变, 这些突变均会导致 3CLpro 在 HEK-293T 细胞中对 FB2001 的敏感性降低, 其中 L165V 造成的耐药特征最显著; 3CLpro^{L165V}-FB2001 复合物结构预测显示, 突变后第 165 位的 Val 侧链残基改变 3CLpro 活性中心 S1 位局部构象, 导致蛋白酶与 FB2001 的 P1 位亲和力和下降; 生长竞争试验结果表明, 耐药适应株在与 HCoV-OC43 野生株的生长竞争中不具有生长竞争优势。【结论】本研究提示冠状病毒主蛋白酶对 P1 位为 γ -内酰胺环的拟肽抑制剂具有耐药共性机制。

关键词: 人冠状病毒 OC43; 主蛋白酶 3CLpro; FB2001; 耐药机制

资助项目: 武汉市知识创新专项(2023000123); 中国科学院特别研究助理资助项目(2022000025)

This work was supported by the Wuhan Knowledge Innovation Special Project (2023000123) and the Special Research Assistant Funding Project of Chinese Academy of Sciences (2022000025).

*Corresponding authors. E-mail: ZHANG Yumin, ymzhang@wh.iov.cn; LIU Wen, liuwen@ctgu.edu.cn

Received: 2024-09-18; Accepted: 2024-11-24; Published online: 2024-12-19

The resistance characteristics and mechanisms of HCoV-OC43 to protease inhibitor FB2001

CHEN Lu^{1,2}, SHANG Weijuan², ZHANG Leike², XIAO Gengfu², LIU Wen^{*1}, ZHANG Yumin^{*2}

1 College of Biological and Pharmaceutical Sciences, China Three Gorges University, Yichang 443002, Hubei, China

2 State Key Laboratory of Virology, Center for Biosafety Mega-Science, Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract: [Background] Human coronavirus OC43 (HCoV-OC43) belongs to betacoronavirus, and its infection poses a serious threat to the health of immunocompromised elderly and young children. As a reported 3CLpro inhibitor that has entered phase II/III clinical trial against coronaviruses, FB2001 has strong inhibitory activity against HCoV-OC43, while the resistance characteristics of HCoV-OC43 to FB2001 remain to be clarified. **[Objective]** To study the mutation sites and resistance mechanism of HCoV-OC43 3CLpro to FB2001 and discover the common characteristics of coronavirus resistance to 3CLpro inhibitors, which is of great significance for the development and optimization of broad-spectrum small molecule drugs targeting coronavirus 3CLpro. **[Methods]** A HCoV-OC43 strain with obvious resistance was obtained by continuous passage under drug pressure *in vitro*. Next generation sequencing revealed multiple mutation sites on 3CLpro. Then, a HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP system was constructed to verify the characteristics of resistance mutations. Finally, the mutant protein-small molecule binding mode was predicted by AlphaFold 3 and DiffDock to reveal the drug resistance mechanism, and a growth competition experiment was carried out to investigate the adaptive growth changes of the resistant strain. **[Results]** The amino acid mutations of D65G, L165V, I300T, and D65G+L165V were present in 3CLpro of the resistant strain. All the mutations reduced the sensitivity of 3CLpro to FB2001 in HEK-293T cells, among which L165V caused the most significant resistance. Structural prediction of the 3CLpro^{L165V}-FB2001 complex showed that the Val side chain residue at position 165 changed the local conformation of the 3CLpro active center at position S1 after mutation, resulting in a decrease in affinity between protease and FB2001 at position P1. The results of the growth competition experiment showed that the resistant strain did not have a growth competitive advantage over the wild-type strain HCoV-OC43. **[Conclusion]** This study suggests that the main protease of coronaviruses has a common mechanism of resistance to peptide-like inhibitors with γ -lactam ring at P1.

Keywords: human coronavirus OC43 (HCoV-OC43); 3CLpro; FB2001; drug resistance mechanism

冠状病毒(coronavirus)是一类单链正义 RNA 病毒,其病毒结构由长度为 26–32 kb 的 RNA 基因组和 4 种核心结构蛋白(S, M, E, N)组成;冠状病毒具有较高的基因重组率和突变率,

这导致了冠状病毒的生态多样性和跨种传播能力^[1]。目前,已知有 7 种冠状病毒可以感染人类,其中严重急性呼吸综合征冠状病毒(severe acute respiratory syndrome coronavirus, SARS-CoV)和

中东呼吸综合征冠状病毒(Middle East respiratory syndrome coronavirus, MERS-CoV)等属于高致病性冠状病毒;另外,人冠状病毒 229E (human coronavirus 229E, HCoV-229E)、HCoV-NL63、HCoV-OC43 和 HCoV-HKU1 属于弱毒性季节性冠状病毒,但对免疫力低下的老人和幼儿仍造成较大威胁,严重可致下呼吸道感染和肺炎^[2-3]。主蛋白酶 3CLpro 是冠状病毒具有高度保守结合位点序列和结构相似性的非结构蛋白,其主要功能是从不少于 11 个位点切割病毒多聚蛋白,释放非结构蛋白(non-structural protein, NSP),从而让各个蛋白发挥其复制和转录组装等功能^[4]。由于 3CLpro 在病毒复制过程中起关键作用,并且在人体内无同源蛋白,因此是研发广谱抗冠状病毒药物的理想靶点^[5]。近年来以 3CLpro 为靶点的上市药物有 nirmatrelvir (与 ritonavir 合用上市为 paxlovid)、ensitrelvir 和 simnotrelvir (与 ritonavir 合用上市为先诺欣),并有多款 3CLpro 抑制剂处于临床试验阶段,以上 3CLpro 抑制剂均具有广谱抗冠状病毒作用^[6-7]。

需要注意的是,抗病毒药物面临的一个重要问题是耐药性产生,例如艾滋病病毒和丙肝病毒的耐药性问题已对医疗和公共健康造成严峻挑战^[8-9]。自 paxlovid 获批后,临床上在使用抗病毒药物治疗的免疫缺陷患者体内发现了产生多重耐药突变的 3CLpro 基因^[10-12]。研究人员对 3CLpro 耐 nirmatrelvir 进行了系统的耐药表型及其机制的研究,发现并阐明了 3CLpro 上的多个耐药突变位点,其中 E166V 突变导致的耐药程度最高,复合物晶体结构表明 E166 突变后 nirmatrelvir 的 P1 位与蛋白酶 S1 口袋的氢键网络被打破,导致蛋白酶-药物亲和力下降^[13-14]。研究人员研究了 3CLpro 非共价抑制剂 ensitrelvir 和 WU-04 的耐药情况,发现 3CLpro 同一个氨基酸位点的不同突变,会对不同抑制剂产生不同的影响,如 M49K 导致 3CLpro 对 WU-04 耐药,但对 ensitrelvir 仍然敏感,而 M49I 则与之相

反^[15-16]。然而,目前已报道的冠状病毒耐药问题缺乏共性研究,其他冠状病毒对 3CLpro 抑制剂的耐药特征和机制尚不清楚。因此,研究比较不同冠状病毒 3CLpro 耐药突变位点及耐药模式的共性特点,对理解冠状病毒 3CLpro 的结构功能、优化小分子药物设计以应对下一次可能的冠状病毒流行具有重要意义。

HCoV-OC43 于 1967 年首次发现,属 β 冠状病毒,是冠状病毒引起的普通感冒中最常见的毒株^[17]。本实验室在 2020 年初参与研发的小分子抑制剂 FB2001,目前已进入临床 II/III 期,并已证明其对 HCoV-OC43 也具有优异的抗病毒活性^[18-19]。本研究以 HCoV-OC43 为研究对象,通过体外连续传代实验筛选 HCoV-OC43 的 FB2001 耐药适应株,对其进行耐药表型检测及二代测序(next generation sequencing, NGS),随后对 3CLpro 氨基酸突变位点进行 Flip GFP 活细胞酶活实验验证及其分子结构对接预测,探究 HCoV-OC43 3CLpro 对 FB2001 的耐药特征和潜在耐药机制,最后通过生长竞争试验分析筛选出耐药株的生长适应性变化。

1 材料与方法

1.1 细胞、质粒及病毒

人恶性胚胎横纹肌肉瘤(rhabdomyosarcoma, RD)细胞、人胚胎肾脏-293T (human embryonic kidney 293T, HEK-293T)细胞和 HCoV-OC43 病毒均由中国科学院武汉病毒研究所保存提供。真核表达质粒和报告质粒购自 Addgene 公司。筛选得到的 HCoV-OC43 耐药株经中国科学院武汉病毒研究所生物安全委员会审核(编号:WIVAF25202304),可继续在生物安全二级(biosafety level 2, BSL-2)和动物生物安全二级(animal biosafety level 2, ABSL-2)实验室开展实验。

1.2 培养基、主要试剂与仪器

LB 培养基(g/L):酵母粉 5,胰蛋白胨 10,氯化钠 5,固体培养基在此基础上加入 15 g/L

琼脂粉。

磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)(g/L): 氯化钠 8.0, 氯化钾 0.2, 磷酸氢二钠 1.42, 磷酸氢二钾 0.27, pH 7.4; PBST: 含 0.05%吐温 20 的 PBS 缓冲液; 化学试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

2%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) DMEM 培养基^[20]及胰蛋白酶, Gibco 公司; miniBEST Viral RNA/DNA 提取试剂盒, TaKaRa 公司; TOP10 感受态细胞、增强型 DAB 显色试剂和质粒小提试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 胶回收试剂盒, Omega Engineering 公司; KOD-Plus-Neo 高保真聚合酶, 东洋纺(上海)生物科技有限公司; pCAGGS 质粒、Opti-MEM 培养基和转染试剂 Lipofectamine 2000, 赛默飞世尔科技有限公司; *Kpn* I、*Xba* I 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶, 纽英伦生物技术(北京)有限公司; DAPI 染色液和脱脂奶粉, 上海碧云天生物技术股份有限公司; HCoV-OC43 N protein IgG、HRP 标记的羊抗兔 IgG 和 Alexa 488 标记的羊抗兔 IgG, 武汉三鹰生物技术有限公司; 甲基纤维素粉末, Merck 公司; DNA 文库准备试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 胰蛋白酶和酵母提取物, Oxoid 公司。

细胞培养瓶和细胞培养孔板, 康宁公司; 细胞培养箱, 赛默飞世尔科技有限公司; 倒置显微镜, 奥林巴斯有限公司; 多功能微孔板检测仪和荧光成像仪, 安捷伦科技有限公司; DNBSEQ-T7 测序仪, 深圳华大智造科技股份有限公司。

1.3 HCoV-OC43 扩增与传代

HCoV-OC43 使用 RD 细胞进行扩增, 将 RD 细胞铺至 T75 培养瓶培养 24 h^[20], 待细胞完全贴壁汇合度达到 90%时, 将培养基更换为 2% FBS 的 DMEM 培养基, 以感染复数(multiplicity of infection, MOI)为 0.01 感染 HCoV-OC43。感染 4 d 取细胞上清于 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min

除去细胞碎片, 再将上清分装至 1.5 mL EP 管中, -80 °C 保存。

1.4 HCoV-OC43 耐药适应株筛选

将 RD 细胞铺至 12 孔板, 密度为 1×10^5 cells/孔, 培养 24 h。待细胞完全贴壁汇合度达到 80%时, 将培养基更换为含有一定浓度 FB2001 (不同试验选取不同浓度)的 2% FBS 的 DMEM 培养基, 以 MOI=0.01 感染 HCoV-OC43。待 RD 细胞出现细胞病变时收集细胞上清, 4 °C、13 000 r/min 离心 10 min 除去细胞碎片, 再将上清分装至 1.5 mL EP 管中, -80 °C 保存。

1.5 免疫噬斑法检测 HCoV-OC43 病毒滴度

将 RD 细胞铺至 24 孔板, 5×10^4 cells/孔, 培养 24 h。使用 2% FBS 的 DMEM 培养基将 HCoV-OC43 病毒进行 10 倍梯度稀释, 以 200 μ L/孔的病毒量感染细胞, 每个梯度设 2 个复孔。感染 1 h 后去除上清, PBS 清洗 1-2 次, 加入含有 2% FBS 和 1.25%甲基纤维素的 DMEM 培养基直至完全覆盖底部, 继续培养 96 h。去除细胞上层覆盖物, 加入 4%甲醛固定细胞 30 min。去除固定液并使用 PBST 清洗 3 次, 加入含有 0.02% Triton X-100 和 5%脱脂奶粉的 PBS 进行透化和封闭, 1 h 后用 PBST 清洗 3 次, 加入 120 μ L 一抗溶液(兔抗 HCoV-OC43 N protein IgG, 用 5%脱脂牛奶 1:1 000 稀释), 4 °C 孵育过夜。用 PBST 清洗 3 次, 加入 200 μ L/孔二抗溶液(HRP 标记的抗兔 IgG, 用 5%脱脂牛奶 1:1 000 稀释), 室温孵育 2 h。PBST 清洗 3 次, 加入 200 μ L/孔新鲜的 HRP 显色液, 在水平摇床上室温避光孵育 30 min。去除显色液并用水清洗 1 次, 烘干后数斑, 根据稀释度计算病毒滴度。

1.6 间接免疫荧光法(indirect immunofluorescence assay, IFA)检测病毒 N 蛋白

HCoV-OC43 以 MOI=0.01 接种到 RD 细胞培养 48 h 后进行间接免疫荧光试验。用 4%甲

醛固定细胞过夜,用 PBS 清洗细胞 3 次,加入含有 0.02% Triton X-100 和 5%脱脂奶粉的 PBS 进行透化和封闭,1 h 后用 PBST 清洗 3 次,加入一抗(兔抗 HCoV-OC43 N protein IgG,用 5%脱脂牛奶 1:1 000 稀释)在 4 °C 孵育过夜。用 PBST 清洗 3 次后,加入二抗(Alexa 488 标记的羊抗兔 IgG,用 PBS 1:1 000 稀释)在室温下避光孵育 2 h。用 PBST 清洗 3 次,加入 DAPI (用 PBS 1:10 000 稀释)室温避光孵育 5 min。用 PBST 清洗 3 次后,在荧光成像仪下进行拍照。使用 Image J 软件处理图片计算病毒感染的细胞个数,并使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件绘图。

1.7 NGS 建库及分析

将 HCoV-OC43 连续传代的 P5、P10、P14、P17 和 P20 病毒使用 miniBEST Viral RNA/DNA 提取试剂盒提取 RNA,并进行反转录。DNA 文库采用 DNA 文库准备试剂盒的组分构建。构建好的文库在 DNBSEQ-T7 测序仪上用 PE150 平台对 200–500 bp 之间的片段进行富集、定量和测序。使用 fastp 对原始 FastQ 文件进行过滤,使用 Trimmomatic 删除接头序列。用 Burrows-Wheeler 比对工具将 Reads 映射到冠状病毒 HCoV-OC43 参考基因组,并使用 Picard MarkDuplicate 标记重复序列以在下游分析中过滤,然后使用 GATK BaseRecalibrator 对碱基质量分数进行重新校准。将获得的高质量序列与同一代 DMSO 孔对照毒株的基因组进行比对,进而确定 3CLpro

上的氨基酸突变位点。

1.8 真核表达质粒的构建

真核表达质粒经限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Xba* I 酶切后,与 HCoV-OC43 3CLpro 基因序列在 T4 连接酶作用下 16 °C 连接过夜。将连接产物转化至 TOP10 感受态细胞,涂在含有 Amp (100 µg/mL) 抗性的 LB 培养板上,培养过夜后挑取单克隆并送测序。通过测序验证基因序列正确后,使用质粒小提试剂盒提取 HCoV-OC43 3CLpro 真核表达质粒 DNA,设计点突变引物(表 1)进行 PCR,PCR 反应体系:10×PCR Buffer for KOD-Plus-Neo 5 µL, dNTPs (2 mmol/L) 5 µL, MgSO₄ (25 mmol/L) 3 µL, 上、下游引物(10 µmol/L)各 1 µL, DNA 模板 1–2 µL, KOD-Plus-Neo (1 U/µL) 1 µL, ddH₂O 补足 50 µL。PCR 反应条件:94 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 30 s, 68 °C 3 min 30 s, 34 次循环; 72 °C 5 min。通过胶回收实验检验质粒大小并纯化 PCR 产物,将产物转化到 TOP10 感受态细胞中,并涂在含有 Amp 抗性的培养板上培养过夜,挑取单克隆并测序验证点突变是否构建成功。

1.9 细胞转染

为了避免邻孔荧光的相互干扰,选择黑色透明底部的 96 孔细胞培养板进行实验。使用多聚赖氨酸提前将 96 孔板进行包被,将 HEK-293T 细胞以 2×10^4 cell/孔的密度铺在 96 孔板进行培养,12 h 后细胞完全贴壁且密度达到 90% 时进行转染。确定 Flip GFP 活细胞酶活实验条

表 1 HCoV-OC43 3CLpro 真核表达质粒点突变引物

Table 1 Point mutation primers for HCoV-OC43 3CLpro eukaryotic expression plasmid

Mutation	Prime (5'→3')
D65G	Forward: CCAGCAGCGGTTTCACAGTGCTGTTCGACAG
	Reverse: CAGCACTGTGAAACCGCTGCTGGTCACC
L165V	Forward: GCACCAGGTGGAGCTGTCCACAGGGT
	Reverse: GCTCCACCTGGTGCATGTACACGAAGTT
I300T	Forward: GCAGCTGGCCGGCACCAAGCTGCAGG
	Reverse: CTGCAGCTTGGTGCCGGCCAGCTGCT

件时,将 Lipofectamine 200 与质粒(HCoV-OC43 3CLpro 表达质粒与报告质粒比分别为 1、2、3, pCAGGS 与报告质粒比为 2, 质粒总量为 100 ng) 分别稀释至 Opti-MEM 培养基中,再将两管溶液混合至同一管内,轻轻混匀,室温静置 15 min,之后将转染体系加入细胞孔内,混匀继续培养,4–6 h 后将转染的细胞上清更换为新鲜的 2% FBS 的 DMEM 培养基继续培养。

检测 IC_{50} 时,将转染试剂 Lipofectamine 2000 和质粒(HCoV-OC43 3CLpro 表达质粒与报告质粒比为 2, 质粒总量为 100 ng)分别稀释至 Opti-MEM 培养基中,再将两管溶液混合至同一管内,轻轻混匀,室温静置 15 min,之后将转染体系加入细胞孔内,混匀继续培养。转染 4–6 h 后将转染孔的细胞上清换成含有不同药物浓度的 2% FBS 的 DMEM 培养基。

1.10 Flip GFP 荧光成像

确定 Flip GFP 和活细胞酶活实验条件时,分别在 24、48 和 72 h 检测转染细胞孔的 GFP/mCherry 荧光值。

检测 IC_{50} 时,转染的细胞培养 48 h 后,将细胞上清更换为 PBS。使用多功能微孔板检测仪分别在 GFP (激发光 580 nm, 发射光 630 nm) 和 mCherry (激发光 485 nm, 发射光 530 nm) 对 96 孔板进行扫描。根据 GFP/mCherry 的荧光值计算抑制率^[21],并采用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行绘图。

1.11 HCoV-OC43 耐药株与野生型毒株体外生长竞争实验

将 RD 细胞 2×10^4 cell/孔的密度铺在 48 孔板,24 h 后将细胞培养基更换为 2% FBS 的 DMEM 培养基。将野生型毒株与耐药毒株以 1:9 和 9:1 的比例混合(MOI=0.01),感染 RD 细胞。分别在 0、6、12、24、36 和 48 h 收集上清,提取上清 RNA,随后对 RNA 进行 NGS 测序。

1.12 蛋白质结构预测与对接

根据 HCoV-OC43 3CLpro 氨基酸序列,使用 Alphafold3 (<https://alphafoldserver.com/>)对其结构进行预测。将 HCoV-OC43 3CLpro 结构与 FB2001 分子通过 DiffDock v1.1.3 人工智能平台(软件和许可证分别来自 <https://github.com/gcorso/DiffDock> 和 <https://github.com/gcorso/DiffDock/blob/main/LICENSE>)进行虚拟对接,对接参数选择默认参数,对接程序在中国科学院武汉病毒研究所分析测试中心服务器运行,对接的结果通过 PyMOL v2.5.4 软件进行可视化分析。

2 结果与分析

2.1 HCoV-OC43 传代与耐药株筛选结果

为了得到 HCoV-OC43 对 FB2001 的耐药株,选择 HCoV-OC43 易感的 RD 细胞,将 HCoV-OC43 在含有一定浓度 FB2001 的培养基中进行连续传代,每一代 3 个谱系(L1–L3)并连续传 20 代。在连续传代的过程中,根据病毒产生的细胞病变效应,将 FB2001 的浓度逐渐增加(图 1A)。选择第 14、17、20 代分别进行间接免疫荧光试验检测其耐药表型,结果表明在同一浓度 FB2001 存在的情况下,筛选的耐药株感染的细胞个数比 HCoV-OC43 野生型毒株多(图 1B)。例如,在 0.25 $\mu\text{mol/L}$ FB2001 的条件下,HCoV-OC43 野生型毒株的增殖几乎被完全抑制,而耐药株在细胞中仍能良好复制。该结果表明 HCoV-OC43 在 FB2001 持续存在的压力下,已经出现了明显的耐药表型。随着传代次数的增加,耐药的程度也在不断增加(图 1C)。

为了分析耐药相关的氨基酸突变位点,对 P5、P10、P14、P17、P20 耐药株进行全基因组 NGS 测序,发现病毒第 10 代开始在 3CLpro 上出现 D65G 和 L194P 突变,随着药物压力持续增加,L165V 和 I300T 突变逐渐出现,并且 D65G、L165V 和 I300T 突变频率也在逐渐增加

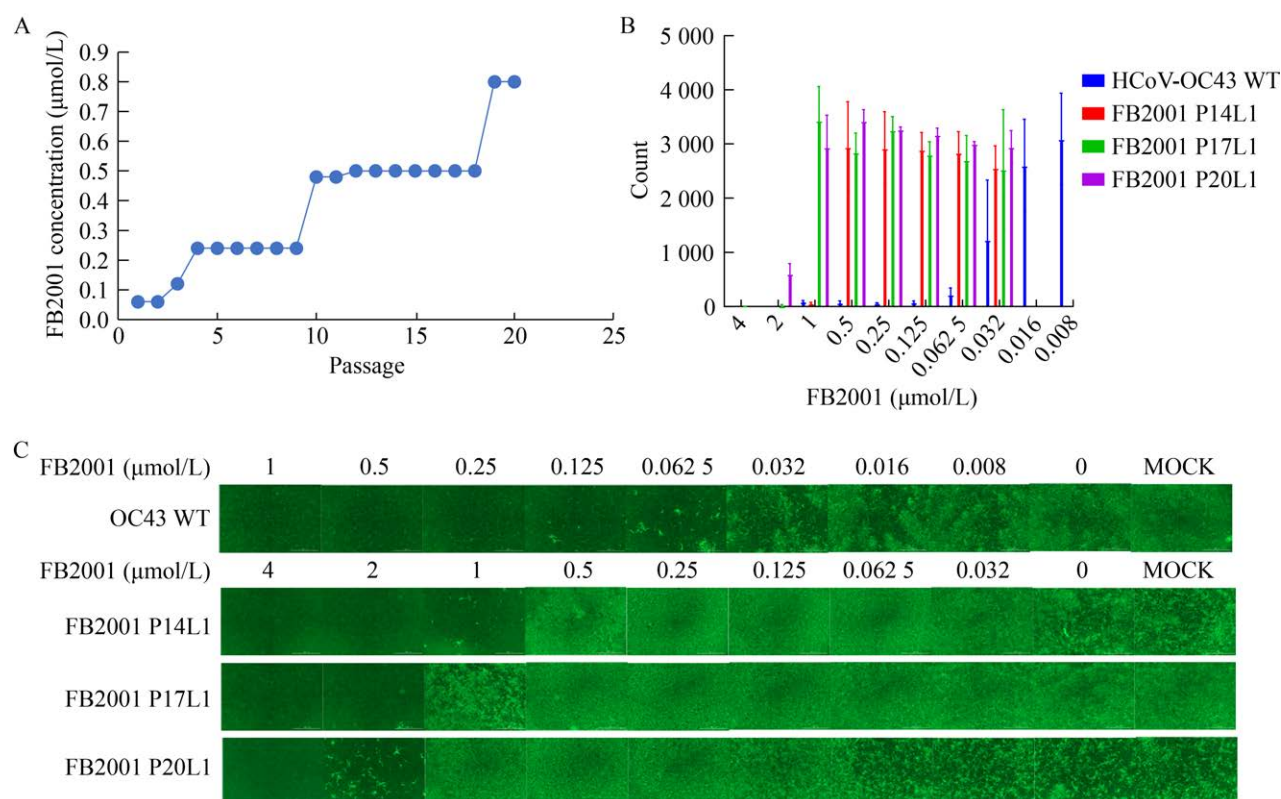


图 1 耐药株筛选方案及耐药表型 A: 耐药株筛选方案。B: 将野生毒株与耐药株以 MOI=0.01 感染 RD 细胞, 培养 48 h 后进行间接免疫荧光检测, 使用荧光成像仪进行拍照, 使用 Image J 软件处理图片计算病毒感染细胞的个数。C: HCoV-OC43 野生毒株与耐药株 P14、P17、P20 在不同浓度 FB2001 下的免疫荧光图。

Figure 1 Drug resistant strain screening scheme and drug resistant phenotype. A: Drug resistant strain screening scheme. B: Wild strains and drug-resistant strains were infected with RD cells at MOI=0.01, and indirect immunofluorescence detection was performed after culture for 48 hours. Fluorescence imager was used to take photos, and Image J software was used to process the images to calculate the number of virus-infected cells. C: Immunofluorescence of wild HCoV-OC43 strain and drug-resistant strains P14, P17 and P20 at different concentrations of FB2001.

(表 2)。除了 3CLpro 基因出现突变外, FB2001 P17 和 FB2001 P20 耐药株在基因组的其他位置也存在突变, 主要突变(突变频率在 90%以上)发生在 S 蛋白 T1100K、E 蛋白 V78L 及 NSP3 I360L [耐药株全基因组突变位点及频率数据已提交至国家微生物科学数据中心(<https://nmdc.cn/resource/attachment/detail/NMDCX0001745>), 登录号 NMDCX0001745]。其中 S 蛋白 T1100K 突变在 FB2001 P17L1 上的频率为 100%, 但在

FB2001 P20L1 上却未检测到, 说明该位点在传代过程中得到了回复。E 蛋白 V78L 突变发生在 P20 的频率比 P17 高, 说明该突变可能是在药物的压力下积累产生。E 蛋白作为冠状病毒的结构蛋白, 其在病毒的生命周期发挥关键功能, 并且 E 蛋白可以自组装成寡聚体, 能够作为离子通道发挥功能, 在调节宿主细胞的离子平衡和微环境中发挥重要作用^[22]。NSP3 作为最大的非结构蛋白, 其作用主要包括多蛋白加

表 2 耐药株在 3CLpro 上的基因表型及频率
Table 2 Gene phenotype and frequency of drug-resistant strains on 3CLpro (%)

Passage	D65G	L165V	L194P	I300T
FB2001 L1				
P20	99.9	88.7	99.7	99.5
P17	98.9	12.1	98.9	83.8
P14	99.2	—	99.7	—
P10	24.0	—	81.0	—
FB2001 L2				
P20	99.3	—	98.5	98.8
P17	97.7	—	98.0	—
P14	98.9	—	99.4	—
P10	11.7	—	92.0	—
FB2001 L3				
P20	—	—	—	—
P17	41.6	14.2	79.3	—
P14	36.0	—	89.5	—
P10	—	—	91.3	—

—表示此处未检测到突变。

“—” indicates that no mutation was detected here.

工、复制-转录复合物形成、新生病毒 RNA 运输及先天免疫拮抗作用等^[23]。NSP3 编码的残基可以折叠成多个结构域，其中 I360L 位于其 Mac1 结构域。Mac1 是一种 ADP-核糖基水解酶，可以水解 ADP 核糖基化宿主蛋白，用于抗病毒感染^[24]。这些突变位点对适应株耐药类型的明确贡献尚不清晰，值得后续进一步研究。

2.2 HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP 体系构建

为了验证 HCoV-OC43 3CLpro 上这些氨基酸突变的耐药功能，通过建立 HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP 体系研究突变蛋白在细胞内对 FB2001 的敏感性变化。Tan 等^[21]报道了 3CLpro Flip GFP 体系，该体系由 3CLpro 表达质粒和报告质粒构成，根据其报道的 Flip GFP 体系，将表达蛋白酶的质粒中的基因序列通过使用 *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶酶切以及 T4

连接酶连接的方法插入 HCoV-OC43 3CLpro 基因序列，经测序验证基因序列的准确性后在该质粒上进行点突变构建待研究的突变蛋白表达质粒。

HCoV-OC43 3CLpro 真核表达体系(图 2A)，将 3CLpro 表达质粒与报告质粒共转染至 HEK-293T 细胞，培养一段时间后，在荧光成像仪下观察其荧光情况。报告质粒编码 GFP β 1-9、 β 10-11 和 mCherry 三个组分。mCherry 可以正常表达，但 β 10-11 通过 K5/E5 卷曲螺旋进行平行取向，这种取向阻碍了其与 β 1-9 的关联，导致 GFP 不会被表达。表达蛋白酶的质粒产生 3CLpro，切割 3CLpro 底物 K5 和 β 11 之间的连接基序(linker)，使 β 10-11 转变为反平行构型，与 β 1-9 结合，从而恢复 GFP 荧光信号。

为了确定表达 3CLpro 的质粒与报告质粒的比例及培养时间，设置表达 3CLpro 与报告质粒比分别为 1、2 和 3 三组实验，并分别在 24、48 和 72 h 检测其荧光强度。同时，设置一组 pCAGGS 质粒与报告质粒比为 2 的实验作为阴性参照。结果表明 Flip GFP 系统实验组的荧光强度与阴性参照的荧光强度具有明显差异(图 2B)。因此，我们从中选择 HCoV-OC43 3CLpro 表达质粒与报告质粒的质粒比为 2，并在转染 48 h 后检测的条件进行后续实验。

2.3 HCoV-OC43 3CLpro 突变位点在 Flip GFP 系统中的酶活水平验证

为了验证筛选到的 3CLpro 氨基酸突变的耐药特征，使用 Lipofectamine 2000 将表达 3CLpro 质粒和报告质粒共转染到 HEK-293T 细胞中，转染 4–6 h 后将细胞上清更换为含有不同浓度梯度 FB2001 的 2% FBS 的 DMEM 培养基，继续培养 48 h 后检测其荧光强度。根据 GFP/mCherry 的荧光值计算其抑制率，并在 GraphPad Prism 10.1.2 中拟合曲线。结果显示 3CLpro WT、D65G、L165V、I300T 和 D65G+L165V 对 FB2001 的半

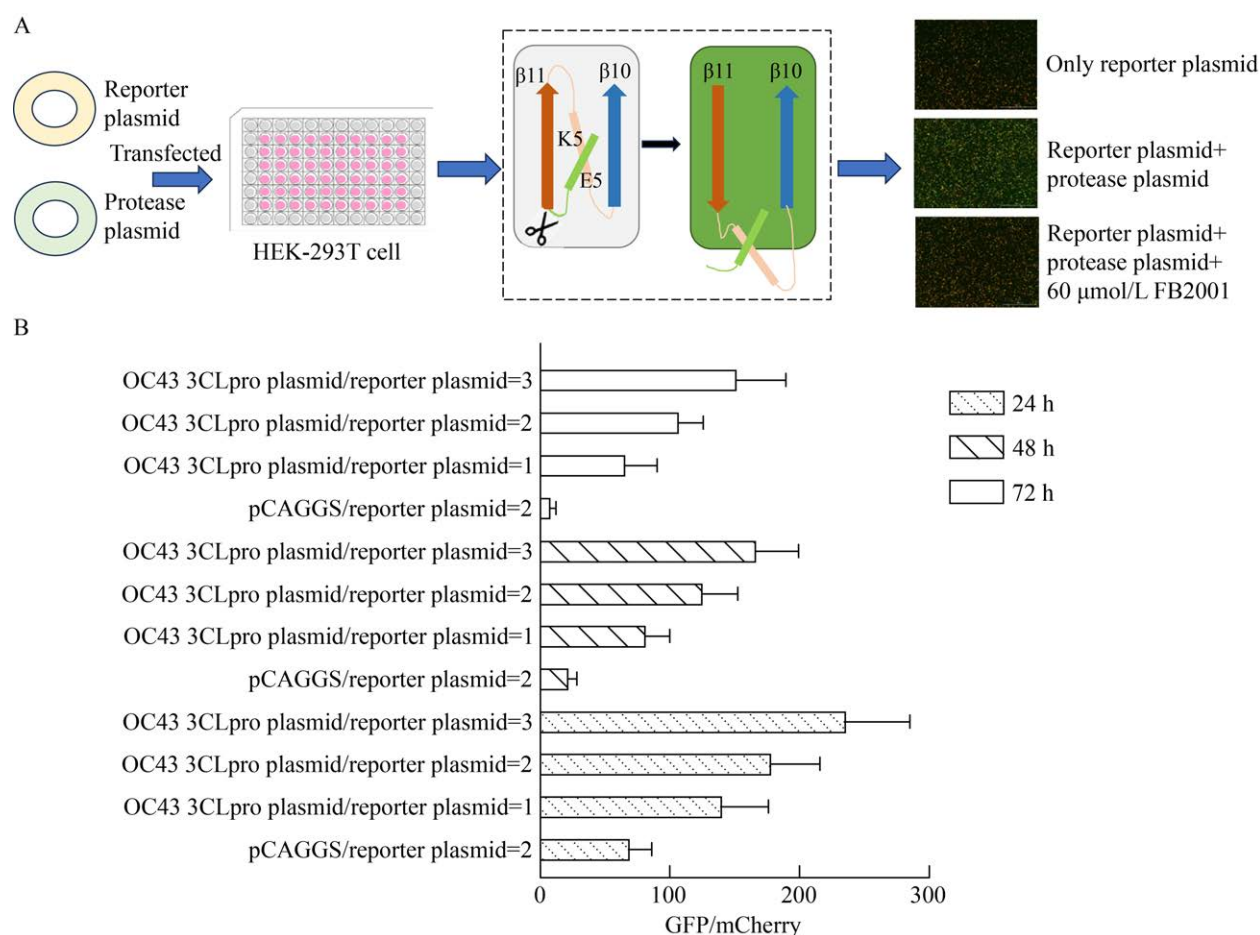


图 2 HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP 体系构建 A: Flip GFP 体系示意图; B: 不同 3CLpro 质粒与报告质粒的质粒比及时间条件下 GFP/mCherry 的荧光强度。

Figure 2 Construction of HCoV-OC43 3CLpro Flip GFP system. A: Flip GFP system diagram; B: Fluorescence intensity under different plasmid ratios and time conditions of expressing 3CLpro plasmid and reporter plasmid.

数抑制浓度(IC_{50})分别 8.18、21.77、36.16、23.55 和 26.81 $\mu\text{mol/L}$ (图 3)。D65G、L165V、I300T 和 D65G+L165V 突变蛋白的 IC_{50} 为野生型 IC_{50} 的 2.66、4.42、2.87、3.27 倍, 这表明这几个突变位点都会造成 3CLpro 对 FB2001 一定程度的耐药, 其中 L165V 的耐药程度最高, 并且在病毒传代后期高浓度 FB2001 压力下产生和积累, 说明 L165V 是造成病毒耐药的关键氨基酸突变。

2.4 HCoV-OC43 3CLpro L165V 突变蛋白与 FB2001 的结合模式分析

FB2001 与 nirmatrelvir 为拟肽类蛋白酶抑

制剂, 其 P1 位均为 γ -内酰胺环(图 4A), 目前关于 3CLpro 耐 nirmatrelvir 的报道有很多, 但对 FB2001 耐药机制相关的报道甚少。为了进一步了解 HCoV-OC43 3CLpro 突变蛋白对 FB2001 耐药的机制, 使用 Alphafold3 根据 HCoV-OC43 3CLpro 氨基酸序列预测 HCoV-OC43 3CLpro WT 和 L165V 突变蛋白的蛋白结构, 随后使用 DiffDock v1.1.3 人工智能平台将 HCoV-OC43 3CLpro WT 和 HCoV-OC43 3CLpro L165V 分别与 FB2001 分子进行分子对接。Alphafold3 预测的 HCoV-OC43 3CLpro 与 FB2001

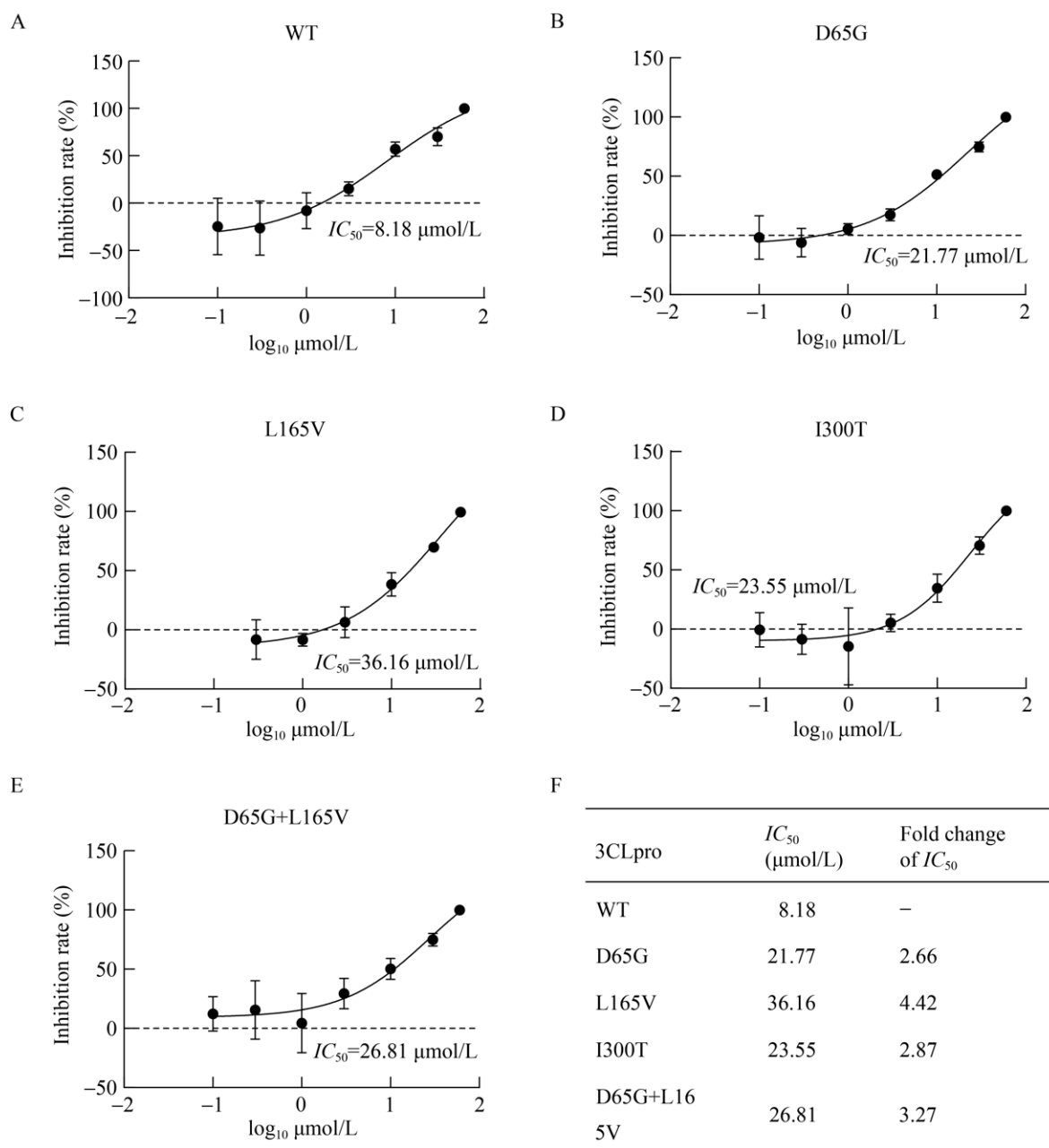


图3 HCoV-OC43 3CLpro 在胞内酶活水平的 IC_{50} A: HCoV-OC43 3CLpro WT 在 FB2001 上的 IC_{50} ; B: HCoV-OC43 3CLpro D65G 在 FB2001 上的 IC_{50} ; C: HCoV-OC43 3CLpro L165V 在 FB2001 上的 IC_{50} ; D: HCoV-OC43 3CLpro I300T 在 FB2001 上的 IC_{50} ; E: HCoV-OC43 3CLpro D65G+L165V 在 FB2001 上的 IC_{50} ; F: 与 WT 相比各突变蛋白 IC_{50} 增加的倍数。

Figure 3 IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro at intracellular enzyme activity level. A: IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro WT against FB2001; B: IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro D65G against FB2001; C: IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro L165V against FB2001; D: IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro I300T against FB2001; E: IC_{50} of HCoV-OC43 3CLpro D65G+L165V against FB2001; F: Multiple of increased IC_{50} of each mutant protein compared to WT.

对接的结构(图 4B、4C)显示, C145 同样与 FB2001 醛基弹头共价结合, 同时 FB2001 的 P1 位 γ -内酰胺环与蛋白酶 S1 位的 H163、E166 和 H172 形成氢键。在 3CLpro 与 FB2001 结合口袋中, 第 165 位亮氨酸的侧链异丁基朝向 3CLpro 活性口袋外侧, 但当第 165 位亮氨酸突变为缬氨酸时, 缬氨酸的异丙基朝向了 3CLpro 活性口袋内侧, 增大了活性口袋的空间位阻, 导致 FB2001 的 P1 位 γ -内酰胺环与 S1 口袋中的 E166 和 H172 之间氢键距离增大, 从而与催化中心亲和力和力下降导致 3CLpro L165V 突变蛋白对 FB2001 出现耐药。

2.5 体外生长竞争试验分析 HCoV-OC43 耐药株的生长竞争能力

为了探究 HCoV-OC43 耐药传代适应株在野生株存在下的生长竞争能力, 将 HCoV-OC43 WT 毒株和 FB2001 P20L1 耐药株以 1:9 或 9:1 比例(MOI=0.01)混合, 在无药物存在的 RD 细胞上进行培养。分别在 0、6、12、24、36、48 h 收集上清进行 NGS 测序, 结果表明, D65G、L165V、L194P 和 I300T 突变比例在 12 h 后均开始下降, 逐渐被 WT 毒株取代(图 5)。当 HCoV-OC43 WT 毒株和 FB2001 P20L1 耐药株以 1:9 比例混合时, 两者的生长竞争在 36 h 达到平衡, 此时 WT 毒株占主要地位(占比 60%以上)(图 5A–5D)。当 HCoV-OC43 WT 毒株和 FB2001 P20L1 耐药株以 9:1 比例混合时, 在 36 h 时 FB2001 P20L1 耐药株已全部被 WT 毒株所取代(图 5E–5H)。实验表明, FB2001 P20L1 在与 HCoV-OC43 野生株的生长竞争中不具有生长竞争优势。

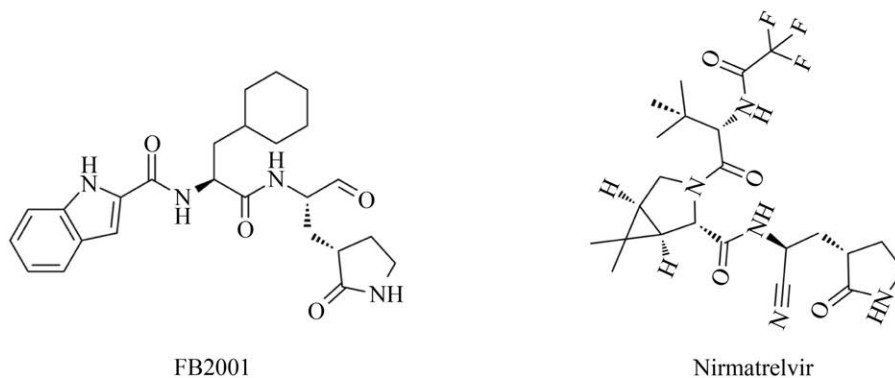
3 讨论

HCoV-OC43 作为一种季节性冠状病毒, 其感染一般使人体出现轻微的流感症状, 但在

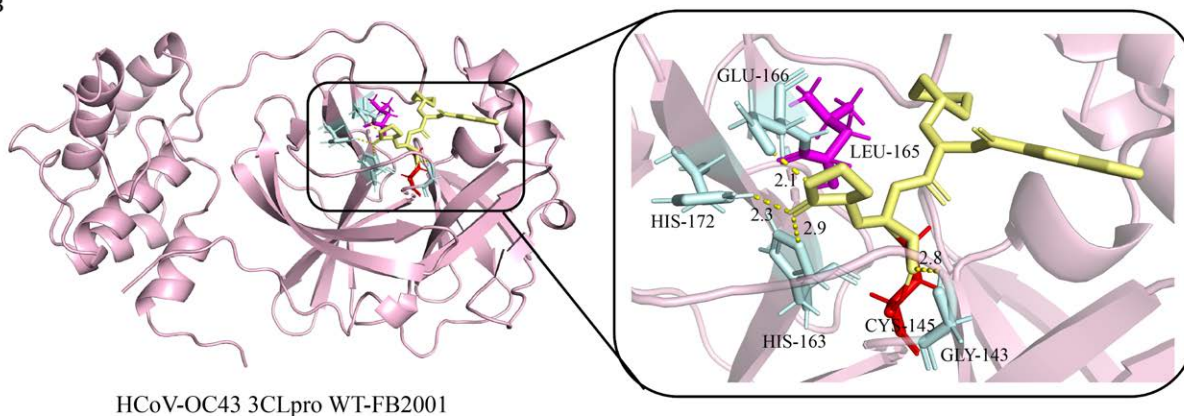
婴幼儿、老人和其他免疫缺陷患者中仍有较大几率发展为肺炎甚至脑炎^[3,25], 因此易感人群要积极预防和治疗。此外, 临床上对相关肺炎病例进行基因型检测时, 发现了 2 例新的 HCoV-OC43 基因型^[26], 其传播和病理特征尚不清晰, 面对快速变异的冠状病毒亟须储备广谱的抗冠状病毒药物。前期研究已发现 3CLpro 抑制剂 FB2001 对 β 冠状病毒和 α 冠状病毒的 3CLpro 具有广谱抑制活性, 但冠状病毒对 FB2001 的耐药特征还有待阐明^[27]。由于冠状病毒 3CLpro 功能和结构高度保守, 其成为广谱靶点的同时, 也存在对抑制剂产生交叉耐药的统一。本研究即探讨 HCoV-OC43 在长期 FB2001 压力下如何发生适应性突变, 并结合已知的冠状病毒 3CLpro 耐药特点, 分析共性耐药机制。

自 2022 年 paxlovid 作为首款 3CLpro 抑制剂获批以来, 已有多篇研究报道了病毒可对其活性成分——nirmatrelvir 产生耐药^[28–30]。Duan 等^[13]基于复合物晶体结构系统研究了 3CLpro 的分子机制, 发现其 3CLpro 通过 2 种进化途径来抵御 nirmatrelvir, 其中代表性的 E166V 突变通过改变与 P1 位氢键模式产生耐药性。拟肽类化合物是蛋白酶抑制剂的重要一类, 这类化合物通过模拟蛋白酶自身底物结构从而竞争性酶活性口袋结合, 达到抑制效果, nirmatrelvir、simnotrelvir、FB2001 和 GC376 均属于此类抑制剂。这些拟肽类抑制剂的 P1 位点具有共同的 γ -内酰胺环结构, 原因在于冠状病毒 3CLpro 对底物 P1 位具有高度选择性^[19,31–32]。在 RD 细胞中, 随着 FB2001 药物压力的增加, HCoV-OC43 逐渐进化为对 FB2001 具有一定耐药性的株系, 通过 NGS 测序发现其 3CLpro 序列上出现 D65G、L165V、L194P 和 I300T 氨基酸突变位点。其他冠状病毒 3CLpro M165V 的耐药机制

A



B



C

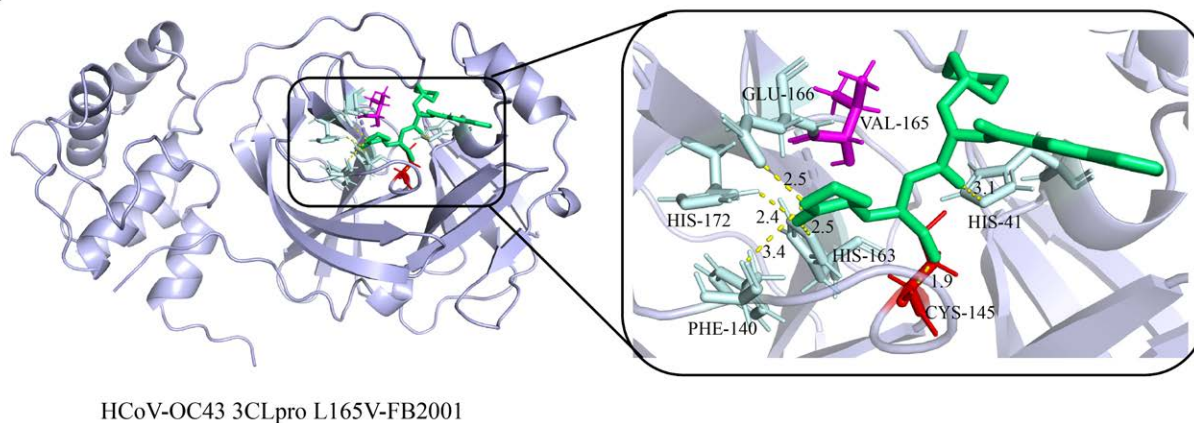


图 4 HCoV-OC43 3CLpro WT 和 L165V 蛋白与 FB2001 分子对接分析 A: FB2001 与 nirmatrelvir 分子结构式; B: AlphaFold3 预测的 HCoV-OC43 3CLpro 结构与 FB2001 分子对接; C: AlphaFold3 预测的 HCoV-OC43 3CLpro-L165V 结构与 FB2001 分子对接。

Figure 4 Molecular docking analysis of HCoV-OC43 3CLpro WT and L165V proteins with FB2001. A: FB2001 and nirmatrelvir molecular structure formula; B: The HCoV-OC43 3CLpro structure predicted by AlphaFold3 was docked with the FB2001 molecule; C: The HCoV-OC43 3CLpro-L165V structure predicted by AlphaFold3 was docked with the FB2001 molecule.

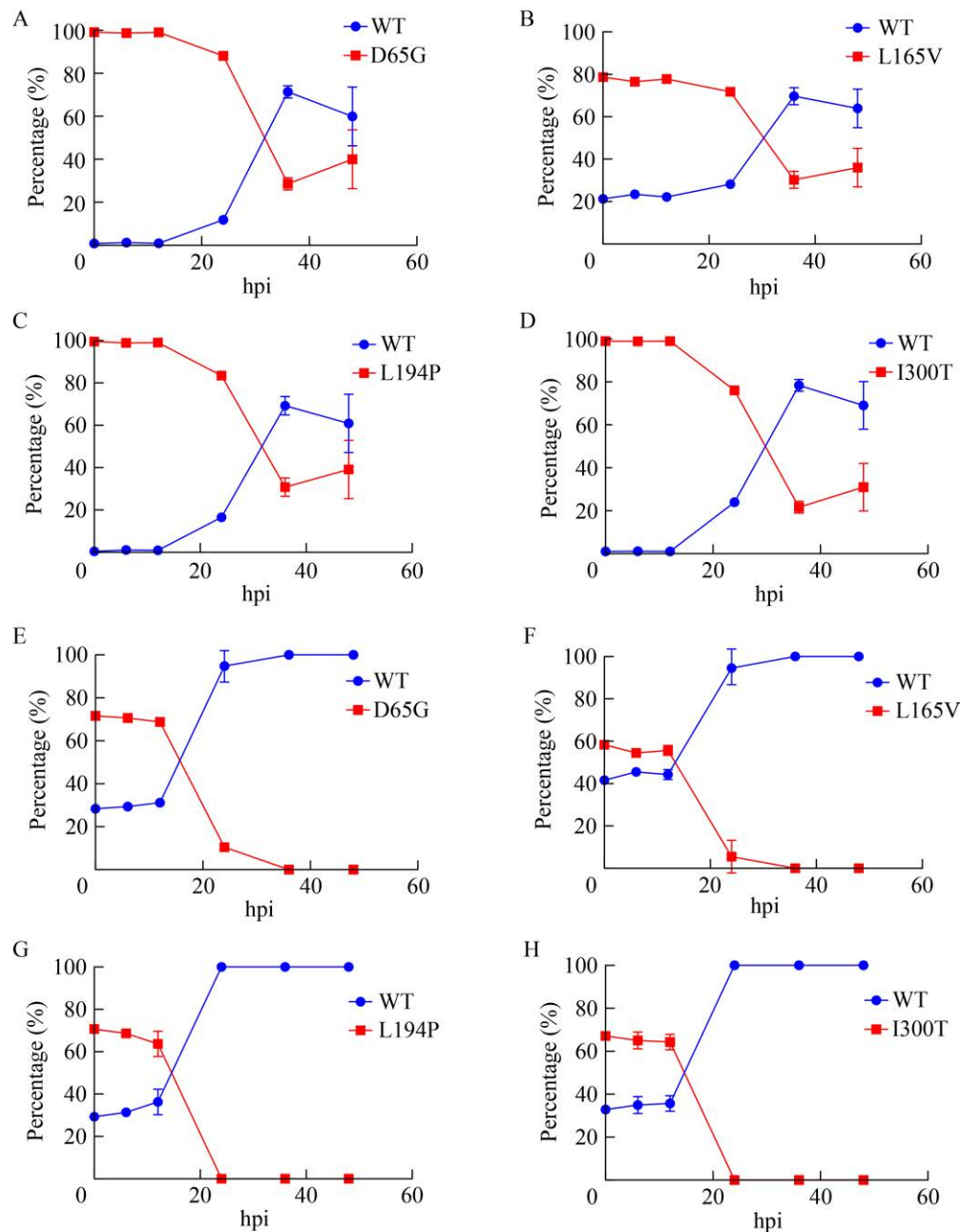


图5 HCoV-OC43 WT 毒株与 FB2001 P20L1 耐药株在无药物压力下生长竞争试验 A-D: HCoV-OC43 WT 毒株与 FB2001 P20L1 耐药株以 1:9 比例混合后共培养, D65G (A)、L165V (B)、L194P (C)和 I300T (D)突变频率变化。E-H: HCoV-OC43 WT 株与 FB2001 P20L1 耐药株以 9:1 比例混合后共培养, D65G (E)、L165V (F)、L194P (G)和 I300T (H)突变频率变化。

Figure 5 Competition experiment of growth between HCoV-OC43 WT strain and FB2001 P20L1 resistant strain without drug pressure. A-D: HCoV-OC43 WT strain and FB2001 P20L1 resistant strain were mixed in a 1:9 ratio and co-cultured. The frequency of mutations of D65G (A), L165V (B), L194P (C), and I300T (D) was monitored. E-H: HCoV-OC43 WT strain and FB2001 P20L1 resistant strain were mixed in a 9:1 ratio and co-cultured, and the frequency of mutations of D65G (E), L165V (F), L194P (G), and I300T (H) was monitored.

已较为清晰^[16], 而 D65G 与 L194P 的耐药机制尚不清晰^[29,33]。I300T 在全球流感数据共享倡议组织(Global Initiative on Sharing All Influenza Data, GISAID)数据库中未被报道。HCoV-OC43 3CLpro L165V 在 P17 开始出现, 突变频率为 12.1%和 14.2%。Flip GFP 结果表明 D65G、L165V、I300T 突变均会导致 3CLpro 对 FB2001 的耐药, 其中 L165V 导致 3CLpro 的耐药程度最高(4.42 倍)。L165V 突变蛋白与 FB2001 的分子虚拟对接表明 165 位亮氨酸突变为缬氨酸时, 该位置氨基酸的侧链残基由嵌入在基团中的异丁基变为指向活性口袋的缬氨酸的异丙基, 占据活性口袋的空间位阻, 导致药物分子与蛋白酶之间的亲和力下降。这与已报道的 3CLpro E166V 对 nirmatrelvir 的耐药机制类似, 表明 3CLpro 上 S1 附近位点的突变会对含有 γ -内酰胺环结构的抑制剂产生较大影响。进一步的体外生长竞争试验结果表明, FB2001 P20L1 耐药株在与 HCoV-OC43 WT 生长竞争中会处于劣势地位并逐渐被野生毒株取代, 这一结论与 3CLpro E166V 造成的病毒适应性减弱的结论一致^[34], 表明该 OC43 耐药株在自然条件下具有较低的传播扩散风险。

4 结论

在体外 FB2001 药物压力下生长的 HCoV-OC43 逐渐表现出对 FB2001 的耐药性, 其 3CLpro 基因上出现 D65G、L165V、L194P 和 I300T 氨基酸突变; 经过 Flip GFP 体系验证, 以上氨基酸突变均会导致 3CLpro 对 FB2001 产生抗性, 其中 L165V 突变产生的抗性最强; L165V 突变蛋白与 FB2001 分子虚拟对接结果表明, 突变氨基酸通过其侧链占据活性口袋的空间位阻从而使 FB2001 与蛋白酶之间的亲和力降低; 生长竞争试验结果表明, 耐药株在与野生

型 HCoV-OC43 生长竞争中处于劣势地位并被野生型 HCoV-OC43 取代; 以上结果与已报道的 3CLpro 的研究结果一致, 表明冠状病毒主蛋白酶对 P1 位为 γ -内酰胺环的拟肽抑制剂具有耐药共性机制。本研究结果表明冠状病毒 3CLpro 在耐药机制上存在相似性, 为未来广谱抗冠状病毒药物的研发提供思路和科学依据。

作者贡献声明

陈露: 执行实验, 撰写初稿; 尚卫娟: 执行实验; 张磊硕: 实验设计; 肖庚富: 项目设计与构思; 刘文: 稿件修改; 张宇旻: 项目设计与构思, 稿件修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] CUI J, LI F, SHI ZL. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2018, 17(3): 181-192.
- [2] JACOMY H, TALBOT PJ. Vacuolating encephalitis in mice infected by human coronavirus OC43[J]. *Virology*, 2003, 315(1): 20-33.
- [3] NILSSON A, EDNER N, ALBERT J, TERNHAG A. Fatal encephalitis associated with coronavirus OC43 in an immunocompromised child[J]. *Infectious Diseases*, 2020, 52(6): 419-422.
- [4] YANG HT, RAO ZH. Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2021, 19(11): 685-700.
- [5] MELO-FILHO CC, BOBROWSKI T, MARTIN HJ, SESSIONS Z, POPOV KI, MOORMAN NJ, BARIC RS, MURATOV EN, TROPSHA A. Conserved coronavirus proteins as targets of broad-spectrum antivirals[J]. *Antiviral Research*, 2022, 204: 105360.
- [6] JIANG XR, SU HX, SHANG WJ, ZHOU F, ZHANG Y, ZHAO WF, ZHANG QM, XIE H, JIANG L, NIE TQ, YANG FP, XIONG MY, HUANG XX, LI MJ, CHEN P, PENG SP, XIAO GF, JIANG HL, TANG RH, ZHANG LK, SHEN JS, XU YC. Structure-based development and preclinical evaluation of the SARS-CoV-2 3C-like protease inhibitor simnotrelvir[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 6463.

- [7] WEIL T, LAWRENZ J, SEIDEL A, MÜNCH J, MÜLLER JA. Immunodetection assays for the quantification of seasonal common cold coronaviruses OC43, NL63, or 229E infection confirm nirmatrelvir as broad coronavirus inhibitor[J]. *Antiviral Research*, 2022, 203: 105343.
- [8] DIETZ J, MÜLLHAUPT B, BUGGISCH P, GRAF C, PEIFFER K-H, MATSCHENZ K, SCHATTENBERG JM, ANTONI C, MAUSS S, NIEDERAU C, DISCHER T, TRAUTH J, DULTZ G, SCHULZE ZUR WIESCH J, PIECHA F, KLINKER H, MÜLLER T, BERG T, NEUMANN-HAEFELIN C, BERG CP, et al. Long-term persistence of HCV resistance-associated substitutions after DAA treatment failure[J]. *Journal of Hepatology*, 2023, 78(1): 57-66.
- [9] RHEE SY, KASSAYE SG, JORDAN MR, KOUAMOU V, KATZENSTEIN D, SHAFFER RW. Public availability of HIV-1 drug resistance sequence and treatment data: a systematic review[J]. *The Lancet Microbe*, 2022, 3(5): e392-e398.
- [10] HIROTSU Y, KOBAYASHI H, KAKIZAKI Y, SAITO A, TSUTSUI T, KAWAGUCHI M, SHIMAMURA S, HATA K, HANAWA S, TOYAMA J, MIYASHITA Y, OMATA M. Multidrug-resistant mutations to antiviral and antibody therapy in an immunocompromised patient infected with SARS-CoV-2[J]. *Med*, 2023, 4(11): 813-824.e4.
- [11] MOGHADASI SA, HEILMANN E, KHALIL AM, NNABUIFE C, KEARNS FL, YE CJ, MORAES SN, COSTACURTA F, ESLER MA, AIHARA H, von LAER D, MARTINEZ-SOBRIDO L, PALZKILL T, AMARO RE, HARRIS RS. Transmissible SARS-CoV-2 variants with resistance to clinical protease inhibitors[J]. *Science Advances*, 2023, 9(13): eade8778.
- [12] FLYNN JM, HUANG QYJ, ZVORNICANIN SN, SCHNEIDER-NACHUM G, SHAQRA AM, YILMAZ NK, MOQUIN SA, DOVALA D, SCHIFFER CA, BOLON DNA. Systematic analyses of the resistance potential of drugs targeting SARS-CoV-2 main protease[J]. *ACS Infectious Diseases*, 2023, 9(7): 1372-1386.
- [13] DUAN YK, ZHOU H, LIU X, IKETANI S, LIN MM, ZHANG XY, BIAN QC, WANG HF, SUN HR, HONG SJ, CULBERTSON B, MOHRI H, LUCK MI, ZHU Y, LIU XC, LU YC, YANG XN, YANG KL, SABO Y, CHAVEZ A, GOFF SP, RAO ZH, HO DD, YANG HT. Molecular mechanisms of SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir[J]. *Nature*, 2023, 622(7982): 376-382.
- [14] IKETANI S, MOHRI H, CULBERTSON B, HONG SJ, DUAN YK, LUCK MI, ANNAVJHALA MK, GUO YC, SHENG ZZ, UHLEMANN AC, GOFF SP, SABO Y, YANG HT, CHAVEZ A, HO DD. Multiple pathways for SARS-CoV-2 resistance to nirmatrelvir[J]. *Nature*, 2022, 613(7944): 558-564.
- [15] KISO M, YAMAYOSHI S, IIDA S, FURUSAWA Y, HIRATA Y, URAKI R, IMAI M, SUZUKI T, KAWAOKA Y. *In vitro* and *in vivo* characterization of SARS-CoV-2 resistance to ensitrelvir[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 4231.
- [16] ZHANG LJ, XIE XP, LUO HN, QIAN RT, YANG Y, YU HT, HUANG J, SHI PY, HU Q. Resistance mechanisms of SARS-CoV-2 3CLpro to the non-covalent inhibitor WU-04[J]. *Cell Discovery*, 2024, 10: 40.
- [17] LAU SKP, LEE P, TSANG AKL, YIP CCY, TSE H, LEE RA, SO LY, LAU YL, CHAN KH, WOO PCY, YUEN KY. Molecular epidemiology of human coronavirus OC43 reveals evolution of different genotypes over time and recent emergence of a novel genotype due to natural recombination[J]. *Journal of Virology*, 2011, 85(21): 11325-11337.
- [18] SHANG WJ, DAI WH, YAO C, XU L, TAO XM, SU HX, LI J, XIE X, XU YC, HU M, XIE D, JIANG HL, ZHANG LK, LIU H. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the main protease inhibitor FB2001 against SARS-CoV-2[J]. *Antiviral Research*, 2022, 208: 105450.
- [19] DAI WH, ZHANG B, JIANG XM, SU HX, LI J, ZHAO Y, XIE X, JIN ZM, PENG JJ, LIU FJ, LI CP, LI Y, BAI F, WANG HF, CHENG X, CEN XB, HU SL, YANG XN, WANG J, LIU X, XIAO GF, JIANG HL, RAO ZH, ZHANG LK, XU YC, YANG HT, LIU H. Structure-based design of antiviral drug candidates targeting the SARS-CoV-2 main protease[J]. *Science*, 2020, 368(6497): 1331-1335.
- [20] ZHANG YM, SUN Y, XIE YC, SHANG WJ, WANG Z, JIANG HL, SHEN JS, XIAO GF, ZHANG LK. A viral RNA-dependent RNA polymerase inhibitor VV116 broadly inhibits human coronaviruses and has synergistic potency with 3CLpro inhibitor nirmatrelvir[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2023, 8: 360.
- [21] TAN HZ, HU YM, WANG J. FlipGFP protease assay for evaluating *in vitro* inhibitory activity against SARS-CoV-2 Mpro and PLpro[J]. *STAR Protocols*, 2023, 4(2): 102323.
- [22] CAO YP, YANG R, LEE I, ZHANG WW, SUN JN, WANG W, MENG XF. Characterization of the SARS-CoV-2 E protein: sequence, structure, viroporin, and inhibitors[J]. *Protein Science*, 2021, 30(6): 1114-1130.
- [23] QIN B, LI ZH, TANG KM, WANG TY, XIE YB, AUMONIER S, WANG MT, YUAN SF, CUI S. Identification of the SARS-unique domain of SARS-CoV-2 as an antiviral target[J]. *Nature Communications*, 2023, 14: 3999.
- [24] LI X, SONG YC. Targeting SARS-CoV-2 nonstructural protein 3: function, structure, inhibition, and perspective in drug discovery[J]. *Drug Discovery Today*, 2024, 29(1): 103832.
- [25] MORFOPOULOU S, BROWN JR, DAVIES EG, ANDERSON G, VIRASAMI A, QASIM W, CHONG WK, HUBANK M, PLAGNOL V, DESFORGES M, JACQUES TS, TALBOT PJ, BREUER J. Human coronavirus OC43 associated with fatal encephalitis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2016, 375(5): 497-498.
- [26] ZHANG ZY, LIU WK, ZHANG SN, WEI PL, ZHANG L, CHEN DH, QIU SY, LI XB, ZHAO JX, SHI YX, ZHOU R, WANG YQ, ZHAO JC. Two novel human coronavirus OC43 genotypes circulating in hospitalized children with pneumonia in China[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2022, 11(1): 168-171.
- [27] 谢东, 胡敏, 姚成. 3C样蛋白酶抑制剂博福特韦的研发实践和策略[J]. *药学进展*, 2023, 47(7): 494-498.
- XIE D, HU M, YAO C. Research and development practice and strategy of 3C-like protease inhibitor Bofutrelvir[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2023, 47(7): 494-498 (in Chinese).
- [28] IKETANI S, HONG SJ, SHENG J, BAHARI F,

- CULBERTSON B, ATANAKI FF, ADITHAM AK, KRATZ AF, LUCK MI, TIAN RX, GOFF SP, MONTAZERI H, SABO Y, HO DD, CHAVEZ A. Functional map of SARS-CoV-2 3CL protease reveals tolerant and immutable sites[J]. *Cell Host & Microbe*, 2022, 30(10): 1354-1362.e6.
- [29] OU J, LEWANDOWSKI EM, HU YM, LIPINSKI AA, ALJASSER A, COLON-ASCANIO M, MORGAN RT, JACOBS LMC, ZHANG XJ, BIKOWITZ MJ, LANGLAIS PR, TAN HZ, WANG J, CHEN Y, CHOY JS. A yeast-based system to study SARS-CoV-2 Mpro structure and to identify nirmatrelvir resistant mutations[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(8): e1011592.
- [30] HEILMANN E, COSTACURTA F, MOGHADASI SA, YE CJ, PAVAN M, BASSANI D, VOLLAND A, ASCHER C, WEISS AKH, BANTE D, HARRIS RS, MORO S, RUPP B, MARTINEZ-SOBRIDO L, von LAER D. SARS-CoV-2 3CL^{Pro} mutations selected in a VSV-based system confer resistance to nirmatrelvir, ensitrelvir, and GC376[J]. *Science Translational Medicine*, 2023, 15(678): eabq7360.
- [31] YANG HT, YANG MJ, DING Y, LIU YW, LOU ZY, ZHOU Z, SUN L, MO LJ, YE S, PANG H, GAO GF, ANAND K, BARTLAM M, HILGENFELD R, RAO ZH. The crystal structures of severe acute respiratory syndrome virus main protease and its complex with an inhibitor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2003, 100(23): 13190-13195.
- [32] JIN ZM, DU XY, XU YC, DENG YQ, LIU MQ, ZHAO Y, ZHANG B, LI XF, ZHANG LK, PENG C, DUAN YK, YU J, WANG L, YANG KL, LIU FJ, JIANG RD, YANG XL, YOU T, LIU XC, YANG XN, et al. Structure of M^{Pro} from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors[J]. *Nature*, 2020, 582(7811): 289-293.
- [33] DENG XF, StJOHN SE, OSSWALD HL, O'BRIEN A, BANACH BS, SLEEMAN K, GHOSH AK, MESECAR AD, BAKER SC. Coronaviruses resistant to a 3C-like protease inhibitor are attenuated for replication and pathogenesis, revealing a low genetic barrier but high fitness cost of resistance[J]. *Journal of Virology*, 2014, 88(20): 11886-11898.
- [34] ZHOU YY, GAMMELTOFT KA, RYBERG LA, PHAM LV, TJØRNELUND HD, BINDERUP A, DUARTE HERNANDEZ CR, FERNANDEZ-ANTUNEZ C, OFFERGAARD A, FAHNØE U, PETERS GHJ, RAMIREZ S, BUKH J, GOTTWEIN JM. Nirmatrelvir-resistant SARS-CoV-2 variants with high fitness in an infectious cell culture system[J]. *Science Advances*, 2022, 8(51): eadd7197.