

· 生物技术与方法 ·

# 新型三明治样荧光偏振筛选模型在新型冠状病毒主蛋白酶小分子抑制剂筛选中的应用

闫浩浩<sup>1#</sup>, 闫千千<sup>1#</sup>, 戚海燕<sup>1</sup>, 刘志成<sup>1</sup>, 刘晓丽<sup>1</sup>, 刘晓平<sup>1</sup>, 李霓<sup>2</sup>, 陈云雨<sup>1</sup>

1 皖南医学院 药物筛选与评价研究所, 安徽 芜湖 241002

2 中国医学科学院-北京协和医学院 药物研究所 天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 北京 100050

闫浩浩, 闫千千, 戚海燕, 刘志成, 刘晓丽, 刘晓平, 李霓, 陈云雨. 新型三明治样荧光偏振筛选模型在新型冠状病毒主蛋白酶小分子抑制剂筛选中的应用. 生物工程学报, 2022, 38(6): 2352-2364.

YAN HH, YAN GG, QI HY, LIU ZC, LIU XL, LIU XP, LI N, CHEN YY. Identifying SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a novel sandwich-like fluorescence polarization screening assay. Chin J Biotech, 2022, 38(6): 2352-2364.

**摘要:** 新型冠状病毒主蛋白酶 (main protease, Mpro) 通过水解多聚蛋白质体 (polyprotein) 调控病毒基因组 RNA 复制, 且人体不存在其同源蛋白酶, 这使 Mpro 成为抗新型冠状病毒药物开发的理想靶标之一。本研究基于荧光偏振技术 (fluorescence polarization, FP) 和生物素-亲和素反应 (biotin-avidin system, BAS) 原理, 成功地建立了三明治样荧光偏振筛选模型用于 Mpro 小分子抑制剂的快速筛选。通过对天然产物化合物库进行高通量筛选, 发现了漆树酸 (anacardic acid, AA) 是 Mpro 的竞争型抑制剂, 1,2,3,4,6-*O*-五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-*O*-pentagalloylglucose, PGG) 是 Mpro 的混合型抑制剂, 且已报道的部分抑制剂是非特异性 Mpro 小分子抑制剂。文中建立的三明治样荧光偏振筛选模型具有良好的简便性、灵敏性和稳定性, 初步证实了漆树酸和 PGG 是一类新型苗头化合物, 建立科学严谨的活性评价体系对于抗新型冠状病毒药物的筛选与发现是至关重要的。

**关键词:** 新型冠状病毒; 主蛋白酶抑制剂; 荧光偏振; 高通量筛选; 漆树酸; 五没食子酰葡萄糖

**Received:** December 27, 2021; **Accepted:** February 21, 2022; **Published online:** February 24, 2022

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (81703546); Natural Science Foundation of Anhui Province, China (1808085QH265); University Natural Science Research Project of Anhui Province, China (KJ2019ZD30, KJ2021A0839, YJS20210549); The Young Talent Project of Wannan Medical College, China (wyqnyx202104)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this study

**Corresponding author:** CHEN Yunyu. Tel: +86-553-3932414; E-mail: chenyunyu1984@163.com

**基金项目:** 国家自然科学基金 (81703546); 安徽省自然科学基金 (1808085QH265); 安徽省高等学校自然科学研究项目 (KJ2019ZD30, KJ2021A0839, YJS20210549); 皖南医学院青年骨干人才项目 (wyqnyx202104)

# Identifying SARS-CoV-2 main protease inhibitors by a novel sandwich-like fluorescence polarization screening assay

YAN Haohao<sup>1#</sup>, YAN Gangan<sup>1#</sup>, QI Haiyan<sup>1</sup>, LIU Zhicheng<sup>1</sup>, LIU Xiaoli<sup>1</sup>, LIU Xiaoping<sup>1</sup>, LI Ni<sup>2</sup>, CHEN Yunyu<sup>1</sup>

1 Institute for Drug Screening and Evaluation, Wannan Medical College, Wuhu 241002, Anhui, China

2 State Key Laboratory of Bioactive Substances and Function of Natural Medicine, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China

**Abstract:** SARS-CoV-2 main protease (Mpro) is responsible for polyprotein cleavage to release non-structural proteins (nsps) for viral genomic RNA replication, and its homologues are absent in human cells. Therefore, Mpro has been regarded as one of the ideal drug targets for the treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19). In this study, we first combined the fluorescence polarization (FP) technique with biotin-avidin system (BAS) to develop a novel sandwich-like FP screening assay for quick discovery of SARS-CoV-2 Mpro inhibitors from a natural product library. With this screening assay, anacardic acid (AA) and 1,2,3,4,6-*O*-pentagalloylglucose (PGG) were found to be the competitive inhibitor and mixed-type inhibitor targeting Mpro, respectively. Importantly, our results showed that the majority of the reported Mpro inhibitors are promiscuous cysteine inhibitors that are not specific to Mpro. In summary, this novel sandwich-like FP screening assay is simple, sensitive, and robust, which is ideal for large-scale screening. Natural products AA and PGG will be the promising lead compounds for generating more potent antiviral agents targeting Mpro, and the stringent hit validation at the early stage of drug discovery is urgently needed.

**Keywords:** SARS-CoV-2; main protease inhibitor; fluorescence polarization; high-throughput screening; anacardic acid; pentagalloylglucose

目前, 导致严重急性呼吸综合征的新型冠状病毒 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引发了新冠肺炎 (coronavirus disease 2019, COVID-19) 的全球大流行, 严重危害人类的生命健康。虽然通过灭活疫苗、重组蛋白质疫苗、5 型腺病毒活载体疫苗和 mRNA 疫苗的接种有效地降低了 COVID-19 重症发病率, 但奥密克戎 (omicron) 变异株的全球蔓延使其传染性升高和疫苗保护力下降, 全球 COVID-19 确诊病例数量再度迎来爆炸式增长因此, 积极开发抗新型冠状病毒药物刻不容缓<sup>[1-4]</sup>。

SARS-CoV-2 是单股正链 RNA 病毒, 与 SARS-CoV 同属  $\beta$ -冠状病毒。SARS-CoV-2 主要通过刺突糖蛋白 (spike glycoprotein) S1 亚基的受体结合域 (receptor-binding domain, RBD) 识别宿主细胞表面的受体血管紧张素转化酶 2 (angiotensin converting enzyme 2, ACE2) 侵入宿主细胞。当宿主细胞摄入病毒基因组 RNA 后, 核糖体翻译的多聚蛋白质体 (polyprotein) pp1a 和 pp1ab 将在自剪切作用产生的主蛋白酶 (main protease, Mpro) 和木瓜样蛋白酶 (papain-like protease, PLpro) 的协同水解作用

下产生 16 个非结构蛋白质 (non-structural proteins, nsps)。其中, Mpro 在多聚蛋白质体上含有 11 个酶切位点, 负责加工 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 以及复制-转录复合物的其他亚基, 调控病毒基因组 RNA 复制<sup>[5-7]</sup>。Mpro 是具有同源二聚体结构特征的半胱氨酸蛋白酶, 其对多聚蛋白质体的水解过程是 SARS-CoV-2 生命周期与病毒基因组 RNA 复制中的关键步骤。由于 Mpro 在致病性冠状病毒中进化保守, 不易突变, 且人体缺乏其同源蛋白酶, 这使 Mpro 成为广谱抗冠状病毒药物开发的理想靶标之一<sup>[6-9]</sup>。

中医药被誉为“国之瑰宝”, 其治疗瘟疫病已有两千余年历史, 以“清肺排毒汤”“达原饮”“莲花清瘟胶囊”等为代表的中药名方在 COVID-19 疫情防控中发挥了重要作用<sup>[10-11]</sup>。传统中药虽疗效显著, 具有多组分、多靶点等药理学特点, 但对其药效学物质基础及药理机制尚缺少深入的研究<sup>[12]</sup>。2021 年 12 月 5 日, 本实验室首次基于荧光偏振技术 (fluorescence polarization, FP) 和生物素-亲和素反应 (biotin-avidin system, BAS) 原理, 成功地建立了三明治样荧光偏振筛选模型用于 Mpro 小分子抑制剂的高通量筛选<sup>[13]</sup>。为了深入阐明中药抗疫的物质基础与药理机制, 本研究利用已建立的三明治样荧光偏振筛选模型, 对传统中药来源的天然产物化合物库进行高通量筛选, 以期获得新型苗头化合物, 为抗新型冠状病毒药物的研究与开发奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试剂

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Rosetta (DE3) 感受态细胞、蛋白质标准分子量购自 TransGen

Biotech 公司; 蛋白胨、琼脂粉、酵母粉购自 Oxide 公司; 氨苄西林、异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (isopropyl  $\beta$ -D-thiogalactoside, IPTG)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO)、二硫苏糖醇 (1,4-dithiothreitol, DTT) 购自 Aladdin 公司; HisTrap<sup>TM</sup> 层析柱购自 Cytiva 公司; 全黑半底 96 孔板购自 PerkinElmer 公司; 亲和素 (avidin) 购自 Sigma-Aldrich 公司; 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 底物 [FRET substrate: MCA-AVLQSGFR-Lys(Dnp)-Lys-NH<sub>2</sub>,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ : 320/405 nm]、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 与生物素 (biotin) 标记的荧光探针 [FITC-S-Biotin: FITC-AVLQSGFRKK-Biotin,  $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$ : 485/535 nm]、FITC-AVLQ 购自吉尔生化 (上海) 有限公司; 天然产物化合物库 (1 000 库容)、GC-376、漆树酸 (anacardic acid, AA)、1,2,3,4,6-O-五没食子酰葡萄糖 (1,2,3,4,6-O-pentagalloylglucose, PGG)、银杏酸 (ginkgolic acid)、白花丹素 (plumbagin)、依布硒琳 (ebselen)、黄芩素 (baicalein)、杨梅素 (myricetin)、氯喹 (chloroquine)、马尼地平 (manidipine)、沙奎那韦 (saquinavir) 购自 TargetMol 公司; 其他试剂为国产分析纯试剂。

#### 1.1.2 仪器

超净工作台购自苏净安泰公司; 细菌振荡培养箱购自上海知楚仪器有限公司; 超声波细胞粉碎仪购自宁波新芝生物科技股份有限公司; 蛋白质电泳仪购自 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机购自艾本德公司; AKTA Pure 购自 Cytiva 公司; 凝胶成像系统购自杭州申花科技有限公司; 多功能酶标仪购自 BioTek 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 新型冠状病毒主蛋白酶的原核表达、分离纯化与酶活性测定

将含有重组质粒 pET-21a-Mpro 的 *E. coli* Rosetta (DE3) 甘油菌以固体培养基划线法复

苏后,挑取单菌落接种至 50 mL 含 100  $\mu\text{g/mL}$  氨苄西林抗性的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 h 后,将其标识为工作种子批。按照 2% 接种比率,将工作种子批转接至 1 L 含氨苄西林抗性的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}\text{C}$  培养 7 h 后,加入 0.2 mmol/L IPTG,30  $^{\circ}\text{C}$  诱导 8 h。以超声波细胞粉碎仪破碎诱导的菌体,裂解上清液按照参考文献所述的方法进行 Mpro 的分离纯化与酶活性测定<sup>[14]</sup>。根据 Mpro 水解反应的酶动力学曲线,计算其比活力 (U/mg)、米氏常数 (Michaelis constant,  $K_m$ ) 与催化常数 (catalytic number,  $k_{\text{cat}}$ ) 值。

### 1.2.2 三明治样荧光偏振筛选模型的应用

按照参考文献[13]所述的三明治样荧光偏振筛选模型的优化与建立方案,将 47  $\mu\text{mol/L}$  Mpro 以 FP 缓冲液 (10 mmol/L Tris, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L DTT, pH 8.0) 稀释至 400 nmol/L,以 29  $\mu\text{L/孔}$  加入到全黑半底 96 孔板中。天然产物化合物库的贮存库以 DMSO 稀释至 1.0 mg/mL 即为次级库,再以 1  $\mu\text{L/孔}$  加入次级库到上述 96 孔板中,室温孵育 35 min。待化合物孵育结束后,以 20  $\mu\text{L/孔}$  加入 60 nmol/L 荧光探针反应液,室温孵育 20 min。上述各反应孔再以 10  $\mu\text{L/孔}$  继续加入 300 nmol/L 亲和素反应液,室温孵育 5 min。设置检测温度为 25  $^{\circ}\text{C}$ ,激发光波长为 485 nm,发射光波长为 535 nm,以多功能酶标仪检测毫偏值 (millipolarization unit, mP)。在上述三明治样荧光偏振筛选模型中,苗头化合物 (hit) 表现较高的 mP 值,非活性化合物则表现较低的 mP 值。

在每轮筛选中,阳性孔设置为 Mpro (400 nmol/L, 29  $\mu\text{L/孔}$ )+GC-376 (0.5 mmol/L, 1  $\mu\text{L/孔}$ )+荧光探针 (60 nmol/L, 20  $\mu\text{L/孔}$ )+亲和素 (300 nmol/L, 10  $\mu\text{L/孔}$ ),排布在第 12 排 A 至 C 孔,阳性孔 mP 值变化范围为 180 $\pm$ 10;阴

性孔设置为 Mpro (400 nmol/L, 29  $\mu\text{L/孔}$ )+DMSO (1  $\mu\text{L/孔}$ )+荧光探针 (60 nmol/L, 20  $\mu\text{L/孔}$ )+亲和素 (300 nmol/L, 10  $\mu\text{L/孔}$ ),排布在第 12 排 D 至 F 孔,阴性孔 mP 值变化范围为 (30 $\pm$ 5);背景孔设置为 FITC-AVLQ (20 nmol/L, 60  $\mu\text{L/孔}$ ),排布在第 12 排 G 至 H 孔,背景孔 mP 值变化范围为 (30 $\pm$ 5)。

在 3 次初筛实验中,按照公式 (1) 计算化合物的抑制率。若其抑制率大于 50%,即可判断其为候选苗头化合物。其经倍比稀释后,再进行第二轮复筛。苗头化合物的抑制率计算公式如下:

$$\text{Hit inhibition (\%)} = \frac{\mu_{\text{Hit}} - \mu_{\text{N}}}{\mu_{\text{P}} - \mu_{\text{N}}} \times 100\% \quad (1)$$

式中  $\mu_{\text{Hit}}$  代表苗头化合物孔 mP 值的平均值, $\mu_{\text{N}}$  代表阴性对照孔 mP 值的平均值, $\mu_{\text{P}}$  代表阳性对照 (GC-376) 孔 mP 值的平均值。

### 1.2.3 漆树酸与 PGG 的抑制活性、抑制机制及抑制常数值测定

将 20 mmol/L 漆树酸以含 400 nmol/L Mpro 的 FP 缓冲液稀释至 100、80、40、20、10、5  $\mu\text{mol/L}$ ,以 30  $\mu\text{L/孔}$  加入到全黑半底 96 孔板中,室温孵育 35 min。再将 60 nmol/L 荧光探针反应液以 20  $\mu\text{L/孔}$  加入到上述各反应孔中,室温孵育 20 min 后,以 10  $\mu\text{L/孔}$  继续加入 300 nmol/L 亲和素反应液,室温孵育 5 min,以多功能酶标仪检测 mP 值。通过漆树酸在上述测试浓度中的抑制率,以 GraphPad Prism 8.0 绘制其量效曲线,计算其在三明治样荧光偏振筛选模型中的半数抑制浓度值 (half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )。同法检测在不含 DTT 条件下,漆树酸在上述筛选模型中的  $\text{IC}_{50}$  值。

将 50 mmol/L PGG 以含 400 nmol/L Mpro 的 FP 缓冲液稀释至 100  $\mu\text{mol/L}$ ,以 2 倍倍比稀释法,共稀释 6 个浓度梯度 (100–1.56  $\mu\text{mol/L}$ )。按照上述方法,检测 PGG 在含有和不含 DTT

条件下, 其在上述筛选模型中的  $IC_{50}$  值。

将 20 mmol/L 漆树酸以 800 nmol/L Mpro 稀释至 0、4、8、12  $\mu\text{mol/L}$ , 同时设定 FRET 底物的工作浓度为 10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$ , 按照参考文献所述的方法计算漆树酸的抑制常数 (inhibitory constant,  $K_i$ )<sup>[15]</sup>。

将 50 mmol/L PGG 以 800 nmol/L Mpro 稀释至 0、3、6、12  $\mu\text{mol/L}$ , 同法计算 PGG 的  $K_i$  值。

#### 1.2.4 其他已报道化合物抑制活性的确证

将银杏酸、白花丹素、依布硒啉、黄芩素、杨梅素、氯喹、马尼地平、沙奎那韦以 2 倍倍比稀释法稀释后, 在含有 DTT 条件下, 按照 1.2.3 所述的化合物抑制活性测定方法, 计算上述化合物在三明治样荧光偏振筛选模型中的  $IC_{50}$  值, 确证其抑制活性。

## 2 结果与分析

### 2.1 新型冠状病毒主蛋白酶的原核表达、分离纯化与酶活性测定

工程菌经 IPTG 诱导后, 在 Mpro 理论分子

量 34 kDa 处有明显的蛋白质表达条带。考虑到多聚组氨酸标签融合表达在 Mpro 羧基端, 故此菌体裂解上清液以 HisTrap<sup>TM</sup> 亲和层析柱进行了分离纯化。纯化的 Mpro 经 SDS-PAGE 后, 以考马斯亮蓝法染色, 在相对分子量 34 kDa 处有单一的蛋白质条带, 纯度达 90% (图 1A)。纯化的 Mpro 经浓缩、透析和定量后, 其浓度达 1.6 mg/mL。FRET 实验结果表明, 纯化的 Mpro 具有良好的酶活性, 其比活力不低于 40 000 U/mg (图 1B)。通过图 1C 拟合的米氏方程, 计算其  $K_m$  值为 12.78  $\mu\text{mol/L}$ , 最大反应速度 (maximal velocity,  $V_{max}$ ) 值为 154.3  $\Delta\text{RFU/s}$ ,  $k_{cat}$  值为 0.142/s, 专一性常数 ( $k_{cat}/K_m$ ) 值为 11 111 L/(mol·s)。高活性 Mpro 的制备为高灵敏三明治样荧光偏振筛选模型的建立奠定了实验基础。

### 2.2 三明治样荧光偏振筛选模型的基本原理与应用

三明治样荧光偏振筛选模型的基本原理概述如下: 以荧光探针 FITC-S-Biotin (FITC-AVLQSGFRKK-Biotin) 作为新型冠状病毒 Mpro 的水解底物, 基于荧光偏振技术和生物素-

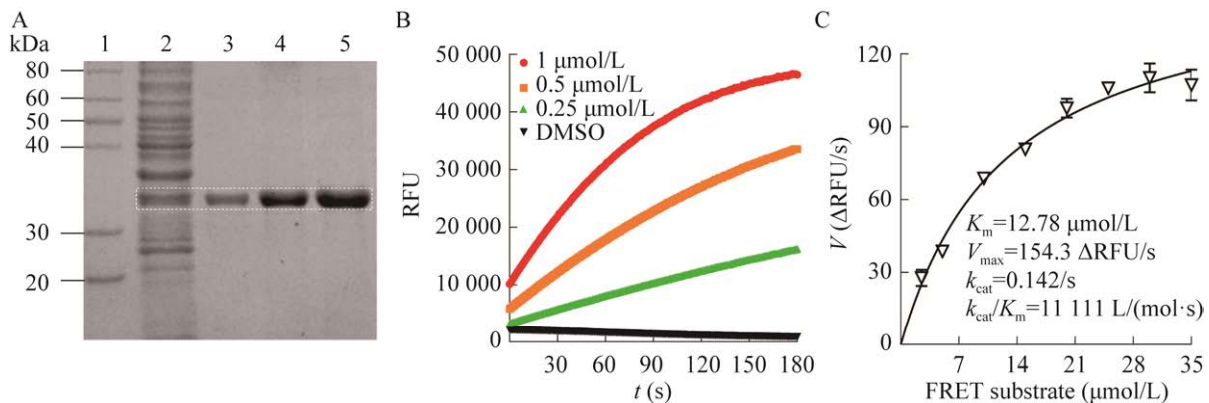


图 1 新型冠状病毒主蛋白酶的原核表达、分离纯化与酶活性测定

Figure 1 Production and enzymatic activity analysis of SARS-CoV-2 main protease (Mpro). (A) Production of SARS-CoV-2 Mpro in *E. coli* cells. According to the published protocols<sup>[14]</sup>, the purified Mpro was assessed using the SDS-PAGE assay, and then the gel was stained by coomassie brilliant blue (CBB). 1: protein marker; 2: total cell proteins; 3–5: purified Mpro band (34 kDa). (B, C) Enzymatic activity analysis of purified Mpro. The specific activity and enzymatic parameters of purified Mpro were determined by the FRET assay, and all experiments were carried out in triplicate according to the reference<sup>[14]</sup>.

亲和素反应原理,建立 Mpro 小分子抑制剂三明治样荧光偏振筛选模型。活性化合物 (bioactive compound) 可以抑制 Mpro 对 FITC-S-Biotin 的水解作用,故此 FITC-S-Biotin 可与亲和素结合,分子量增大,旋转速度变慢,在三明治样荧光偏振筛选模型中表现较高的 mP 值;非活性化合物 (inactive compound) 由于不能抑制 Mpro 对 FITC-S-Biotin 的水解作用,将切割 FITC-S-Biotin 产生分子量较小的 FITC-AVLQ 片段,旋转速度加快,在三明治样荧光偏振筛选模型中则表现较低的 mP 值。上述筛选模型主要由高活性 Mpro、荧光探针 FITC-S-Biotin

与亲和素组成,故此命名为三明治样荧光偏振筛选模型 (图 2)。

已建立的三明治样荧光偏振筛选模型的 Z 因子值为 0.85, 信号本底变异系数值 (coefficient of variation, CV) 为 2.89, 其使用时主要包括 3 步操作,且每轮筛选时间约为 1 h,具有操作简便,灵敏可靠,经济廉价等优点。其主要操作方法如图 3A 所示:首先,将 400 nmol/L Mpro 与天然产物 (1 mg/mL) 室温孵育 35 min。再加入荧光探针 (FP tracer: FITC-S-Biotin) 进行 20 min 水解反应后,继续加入亲和素孵育 5 min,终止其水解反应,以多功能酶标仪检测 mP 值。为

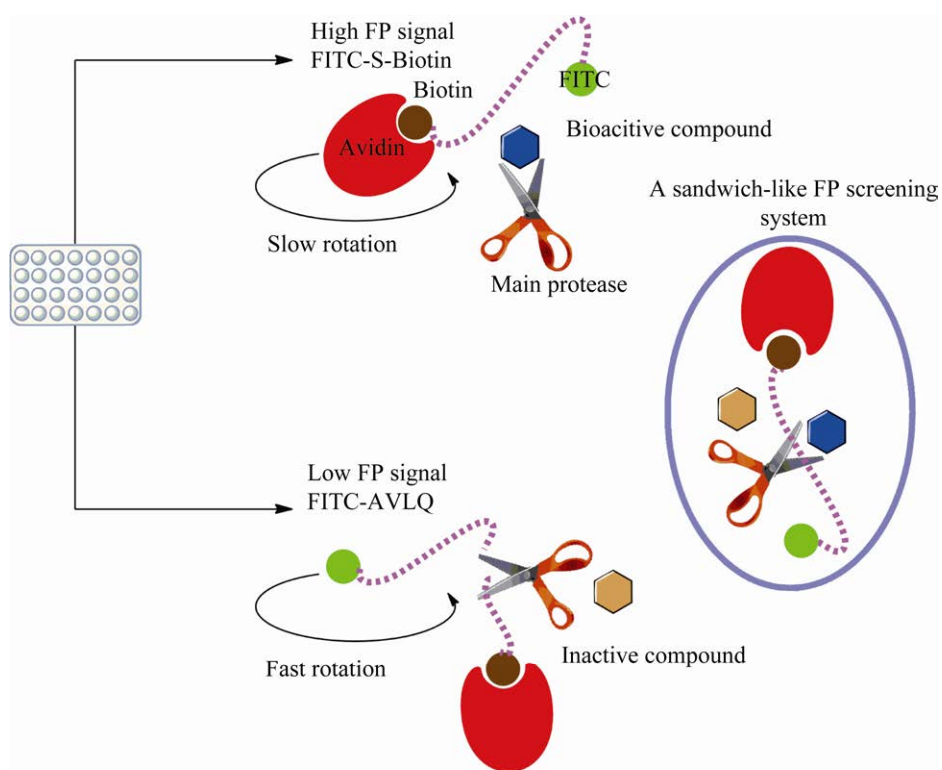


图 2 三明治样荧光偏振筛选模型的基本原理<sup>[13]</sup>

Figure 2 Basic principle of the sandwich-like FP screening assay for rapid discovery of Mpro inhibitors<sup>[13]</sup>. As described in reference<sup>[13]</sup>, incubation of FP tracer (FITC-S-Biotin, purple dashed line) with Mpro (scissor) and subsequent addition of avidin (red crescent) produced a FP signal that was proportional to the relative amount of cleaved and uncleaved FP tracer. The uncleaved FP tracer produced a high mP value upon binding to avidin because of the exciting of bioactive compounds (blue hexagon), whereas the cleaved, a small FITC-AVLQ fragment that cannot bind to avidin produced a low mP value because of the exciting of inactive compounds (yellow hexagon).



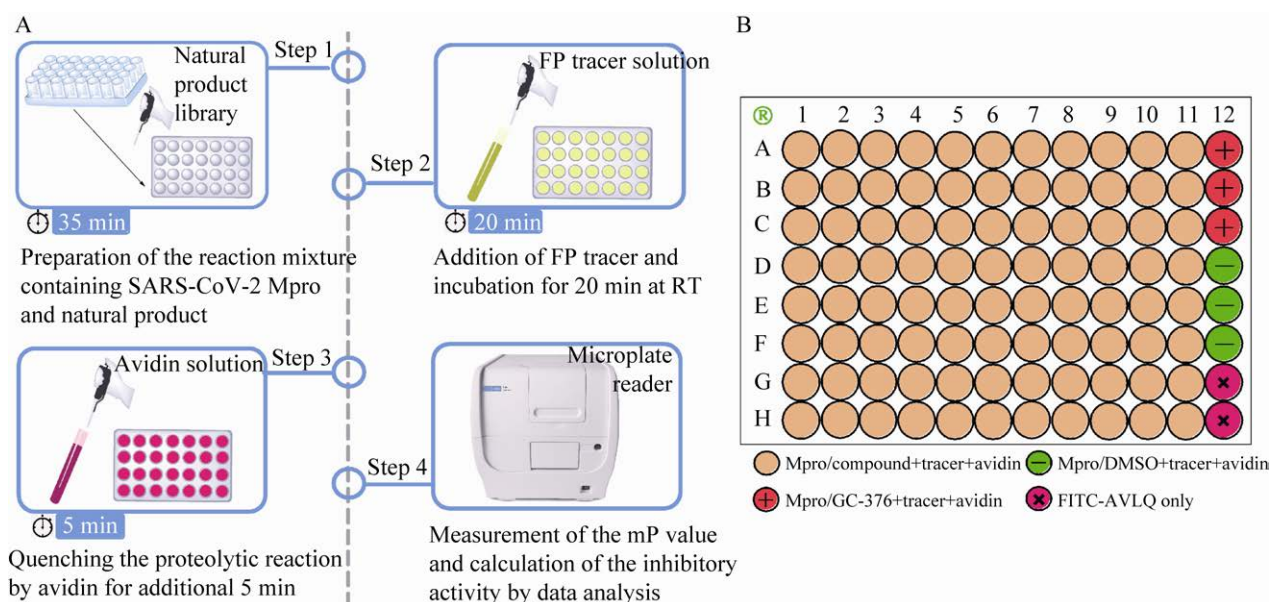


图3 三明治样荧光偏振筛选模型的应用

Figure 3 Application of the sandwich-like FP screening assay for the discovery of Mpro inhibitors. (A) The basic protocols of the sandwich-like FP screening assay. Briefly, 30  $\mu\text{L}$  sample of 400 nmol/L Mpro was incubated with natural product (1 mg/mL, 1  $\mu\text{L}$ /well) for 35 min at room temperature (RT) in a black 96-well microplate. Later, 20  $\mu\text{L}$  sample of 60 nmol/L FP tracer was added and incubated for 20 min at RT. After quenching by avidin (300 nmol/L, 10  $\mu\text{L}$ /well) for additional 5 min, the mP value was monitored by a microplate reader (BioTek). The inhibitory curve of hit compound was plotted using GraphPad Prism 8.0. (B) The natural products layout in a black 96-well microplate for high-throughput screening (HTS). The positive (GC-376), negative and background wells were highlighted.

了准确快速地筛选到苗头化合物，在每轮筛选中，应按照图 3B 所示，在全黑半底 96 孔板中进行筛选样品的排布，每个筛选板中均应包括阳性对照孔 (GC-376)、阴性对照孔和背景孔。

### 2.3 苗头化合物的抑制活性与抑制机制

利用已建立的三明治样荧光偏振筛选模型对天然产物化合物库进行高通量筛选，初筛共获得 7 个候选苗头化合物 (图 4A)。在第二轮复筛中，发现漆树酸与 PGG 对 Mpro 酶活性具有显著的抑制作用，且 DTT 对其抑制作用无明显影响。其中，漆树酸的  $\text{IC}_{50}$  值为 (12.19 $\pm$ 0.5)  $\mu\text{mol/L}$ ，PGG 的  $\text{IC}_{50}$  值为 (9.1 $\pm$ 1.9)  $\mu\text{mol/L}$  (图 4B, 4E)。林贝双倒数曲线表明，漆树酸为竞争型抑制剂，其  $K_i$  值为 1.8  $\mu\text{mol/L}$  (图 4C,

4D); PGG 为混合型抑制剂，其  $K_i$  值为 3.9  $\mu\text{mol/L}$  (图 4F, 4G)。

### 2.4 其他已报道化合物抑制活性的确证

在含有 DTT 条件下，利用已建立的三明治样荧光偏振筛选模型对已报道的 Mpro 小分子抑制剂进行抑制活性的确证。实验结果表明，GC-376、银杏酸和白花丹素在本筛选模型中的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 0.13、(11.29 $\pm$ 0.48)、(17.52 $\pm$ 1.01)  $\mu\text{mol/L}$ ，其与文献报道基本一致<sup>[15]</sup>，说明上述化合物是一类新型苗头化合物。但依布硒啉、黄芩素、杨梅素、氯喹、马尼地平和沙奎那韦在本筛选模型中均无明显的抑制活性，也与文献报道基本一致<sup>[15-16]</sup>，说明上述化合物是非特异性 Mpro 小分子抑制剂 (表 1)。

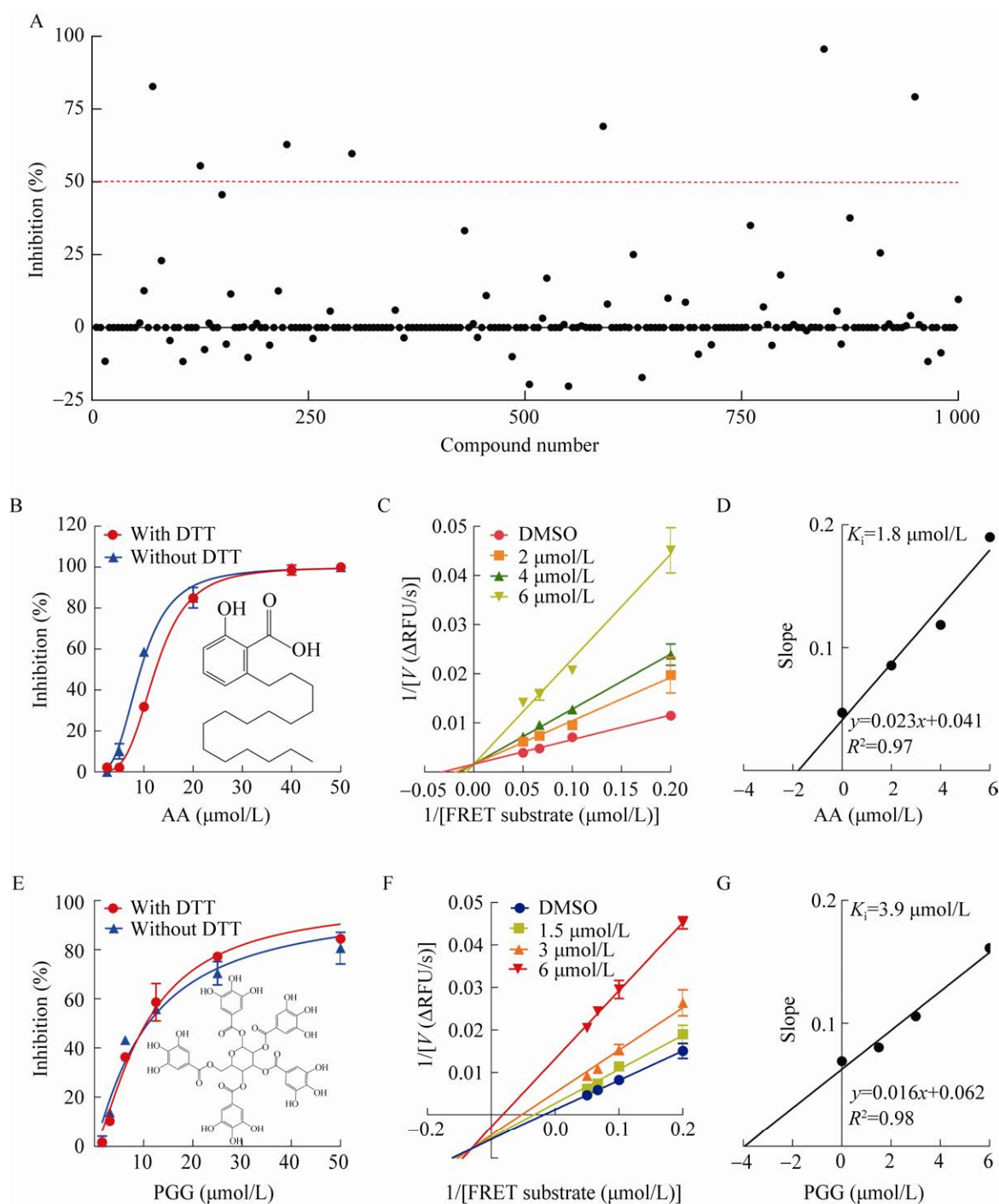


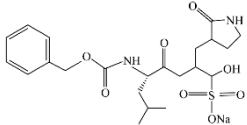
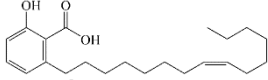
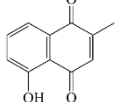
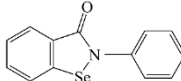
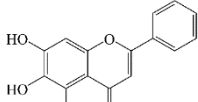
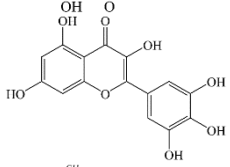
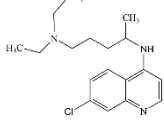
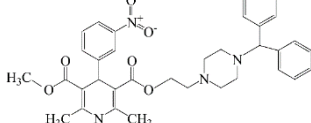
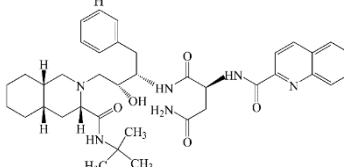
图 4 苗头化合物的抑制活性与抑制机制

Figure 4 Inhibitory activities and inhibition mechanisms of two hit compounds identified by the sandwich-like FP screening assay. (A) The layout of bioactive natural products in the sandwich-like FP screening assay. (B, E) The dose-response curves of anacardic acid (AA) and PGG in the presence or absence of DTT using the sandwich-like FP screening assay. The chemical structures of AA and PGG were showed. (C, F) The Lineweaver-Burk double-reciprocal plots for inhibition of AA and PGG on Mpro for the FRET substrate. (D, G) Determination of the  $K_i$  values of AA and PGG.



表 1 其他已报道化合物抑制活性的确证

Table 1 Validation of the reported Mpro inhibitors by the sandwich-like FP screening assay.

Compound	Chemical structure	Reported IC <sub>50</sub> (μmol/L)	Tested IC <sub>50</sub> (μmol/L)	References
GC-376		0.19	0.13	[15,17]
银杏酸 Ginkgolic acid		1.79±0.58	11.29±0.48	[15,18]
白花丹素 Plumbagin		17.1	17.52±1.01	[15,19]
依布硒啉 Ebselen		0.67±0.09	>100	[20]
黄芩素 Baicalein		0.39±0.11	>100	[21]
杨梅素 Myricetin		3.68±0.08	>100	[22]
氯喹 Chloroquine		3.9±0.2	>100	[23]
马尼地平 Manidipine		4.81±1.9	>100	[24]
沙奎那韦 Saquinavir		31.4±1.2	>100	[25]

### 3 讨论

SARS-CoV-2 感染导致的 COVID-19 疫情全球蔓延, 已被世界卫生组织 (World Health Organization, WHO) 列为国际公共卫生紧急事件 (public health emergency of international concern, PHEIC)。奥密克戎变异株的横空出世, 让本已看到抗疫胜利曙光的全球 COVID-19 疫

情再生变数。目前, 奥密克戎变异株已蔓延至全球 60 余个国家和地区, 具有高传染性、高病毒载量等特点, 并导致上市疫苗对该突变株的保护效力明显下降<sup>[26-28]</sup>。此外, 新型冠状病毒可能长期存在并不定期引发疫情, 且动物来源的未知冠状病毒也可能跨物种传播再次引发人类疫情<sup>[29-30]</sup>。因此, 积极开发广谱抗冠状病毒药物具有重要意义。鉴于 Mpro 在冠状病毒中

的进化保守,通过水解多聚蛋白质体调控病毒基因组 RNA 复制,且人体不存在其同源蛋白酶,因此 Mpro 被认为是抗新型冠状病毒药物开发的理想靶标之一。

目前已报道的 Mpro 小分子抑制剂筛选方法主要包括虚拟筛选法、FRET 筛选法、荧光素酶报告基因筛选法 (luciferase complementation assay)、绿色荧光蛋白剪切互补法 (GFP split complementation assay) 和表型筛选法等<sup>[31-36]</sup>。其中,虚拟筛选法是一种基于化合物与药物靶标间的分子对接运算为基础的药物筛选方法,虽被认为是一种高效、经济的药物高通量筛选技术,但其在实践应用中的一个突出问题是假阳性率较高,必须要以实验筛选方法验证才能确定候选苗头化合物的潜在活性。FRET 筛选法虽具有较高的筛选成本,但目前被认为是 Mpro 小分子抑制剂最主要的筛选方法。由于较多的筛选化合物或天然产物自身荧光的干扰效应可能淬灭 FRET 底物的荧光,容易产生假阳性化合物<sup>[37]</sup>。基于细胞水平的筛选法和表型筛选法还具有操作繁琐、筛选周期长、筛选成本高和稳定性差等缺点,且表型筛选法还需要在 P3 实验室操作,较大地限制了其在大规模高通量筛选中的应用。因此,积极开发简便、快速、灵敏、经济的新型 Mpro 小分子抑制剂高通量筛选模型具有重要意义。

荧光偏振技术主要基于荧光基团分子量较小,在溶液中旋转速度较快,用偏振激发光照射时,其荧光偏振程度较低,故此表现较低的 mP 值。反之,如果荧光基团与蛋白质分子结合,形成了分子量较大的荧光复合物,用偏振激发光照射时,其荧光偏振程度较高,则表现较高的 mP 值。目前,荧光偏振技术已被广泛应用于药物高通量筛选、蛋白质活性测定、药物分析、疾病诊断等研究领域<sup>[38-42]</sup>。本研究建立的

三明治样荧光偏振筛选模型与传统的 FRET 筛选法相比,底物的单孔使用量仅为 20 nmol/L,约为 FRET 筛选法中底物单孔使用量的 1/500,且操作简便,每轮筛选时间仅为 1 h,展现了良好的稳定性、灵敏性和经济性,对其他致病性病毒蛋白酶抑制剂的高效筛选也具有重要的借鉴和参考价值。另外,由于荧光偏振检测中 FITC 的发射光为 535 nm,更好地避免了部分天然产物自身荧光对筛选模型可靠性的干扰<sup>[43]</sup>,因此本筛选模型具有良好的可靠性、实用性和推广性。此外,在体外建立的 Mpro 小分子抑制剂筛选模型中,有多种因素可能对化合物的抑制活性评价产生影响,因此应用多种不同生化原理的药物筛选模型进行综合评价对 Mpro 小分子抑制剂的快速筛选也是至关重要的<sup>[16,44]</sup>。

利用所建立的三明治样荧光偏振筛选模型对天然产物化合物库进行高通量筛选,发现漆树酸与 PGG 在体外对 Mpro 酶活性具有良好的抑制作用,是一类新型 Mpro 小分子抑制剂。漆树酸也称栲如酸,是银杏叶和漆树汁液提取物的主要成分,具有抗菌、抗肿瘤、抗病毒和抗骨质疏松等广泛的药理活性<sup>[45-48]</sup>。近期已有研究证实,漆树酸抗新型冠状病毒活性的 EC<sub>50</sub> 值为 9 μmol/L<sup>[18]</sup>。本研究证实了漆树酸是新型冠状病毒 Mpro 的竞争型小分子抑制剂,可能是一类具有广阔开发前景的新型苗头化合物。但漆树酸具有一定的细胞毒性,还需要深入进行化学改造与结构优化,以提高其成药性与靶向性。此外,来源于绿茶提取物的 PGG 是传统中药五倍子、牡丹皮、赤芍和白芍等 17 种中药的主要药效成分<sup>[49]</sup>。已有研究证实,PGG 可阻断 RBD-ACE2 相互作用进而抑制新型冠状病毒侵入宿主细胞<sup>[50]</sup>。本研究证实了 PGG 对 Mpro 酶活性具有中等强度的抑制作用,是混合型 Mpro 小分子抑制剂,可能是中药抗疫的重要药效组

分之一。

综上所述,本研究利用三明治样荧光偏振筛选模型对天然产物化合物库进行高通量筛选,证实了漆树酸与 PGG 是一类新型苗头化合物,为抗新型冠状病毒药物先导化合物的筛选与发现奠定了基础。

**致谢:**感谢美国罗格斯大学药学院药物化学系王俊副教授在 Mpro 小分子抑制剂活性测定与抑制机制研究中给予的悉心指导!感谢中国医学科学院-北京协和医学院医药生物技术研究所以司书毅教授和张晶副教授在苗头化合物高通量筛选中给予的无私帮助!感谢美国佛罗里达州立大学医学院生物医学系王彦昶教授在三明治样荧光偏振筛选模型的建立与应用中给予的宝贵意见!

## REFERENCES

- [1] Cao Y, Wang J, Jian F, et al. *Omicron* escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. *Nature*, 2022, 602(7898): 657-663.
- [2] Planas D, Saunders N, Maes P, et al. Considerable escape of SARS-CoV-2 *Omicron* to antibody neutralization. *Nature*, 2022, 602(7898): 671-675.
- [3] Gao SJ, Guo HT, Luo GX. *Omicron* variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2, a global urgent public health alert!. *J Med Virol*, 2022, 94(4): 1255-1256.
- [4] Torjesen I. Covid-19: *Omicron* may be more transmissible than other variants and partly resistant to existing vaccines, scientists fear. *BMJ*, 2021, 375: n2943. DOI: 10.1136/bmj.n2943.
- [5] Medina-Enríquez MM, Lopez-León S, Carlos-Escalante JA, et al. ACE2: the molecular doorway to SARS-CoV-2. *Cell Biosci*, 2020, 10(1): 148.
- [6] Jin ZM, Wang HF, Duan YK, et al. The main protease and RNA-dependent RNA polymerase are two prime targets for SARS-CoV-2. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 538: 63-71.
- [7] Anirudhan V, Lee H, Cheng H, et al. Targeting SARS-CoV-2 viral proteases as a therapeutic strategy to treat COVID-19. *J Med Virol*, 2021, 93(5): 2722-2734.
- [8] Faheem, Kumar BK, Sekhar KVGC, et al. Druggable targets of SARS-CoV-2 and treatment opportunities for COVID-19. *Bioorg Chem*, 2020, 104: 104269.
- [9] Zhu W, Shyr Z, Lo DC, et al. Viral proteases as targets for coronavirus disease 2019 drug development. *J Pharmacol Exp Ther*, 2021, 378(2): 166-172.
- [10] Zhao ZY, Li YD, Zhou LY, et al. Prevention and treatment of COVID-19 using Traditional Chinese Medicine: a review. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153308.
- [11] Lyu M, Fan GW, Xiao GX, et al. Traditional Chinese Medicine in COVID-19. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(11): 3337-3363.
- [12] Wang WY, Xie Y, Zhou H, et al. Contribution of traditional Chinese medicine to the treatment of COVID-19. *Phytomedicine*, 2021, 85: 153279.
- [13] Yan GG, Li DS, Lin Y, et al. Development of a simple and miniaturized sandwich-like fluorescence polarization assay for rapid screening of SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 199.
- [14] 陈云雨, 付正豪, 闫干干, 等. 基于密码子优化策略的新型冠状病毒主蛋白酶在大肠杆菌中的表达条件优化与活性鉴定. *生物工程学报*, 2021, 37(4): 1334-1345.  
Chen YY, Fu ZH, Yan GG, et al. Optimization of expression conditions and determination the proteolytic activity of codon-optimized SARS-CoV-2 main protease in *Escherichia coli*. *Chin J Biotech*, 2021, 37(4): 1334-1345 (in Chinese).
- [15] 闫干干, 李东升, 戚海燕, 等. 新型冠状病毒主蛋白酶小分子抑制剂荧光共振能量转移高通量筛选模型的优化与应用. *生物工程学报*, 2022, 38(6): 1-15..  
Yan GG, Li DS, Qi HY, et al. Discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using an optimized FRET-based high-throughput screening assay. *Chin J Biotech*, 2022, 38(6): 1-15 (in Chinese).
- [16] Ma C, Tan H, Choza J, et al. Validation and invalidation of SARS-CoV-2 main protease inhibitors using the Flip-GFP and Protease-Glo luciferase assays. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(4): 1636-1651.
- [17] Vuong W, Khan MB, Fischer C, et al. Feline coronavirus drug inhibits the main protease of SARS-CoV-2 and blocks virus replication. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4282.
- [18] Chen ZN, Cui QH, Cooper L, et al. Ginkgolic acid and anacardic acid are specific covalent inhibitors of

- SARS-CoV-2 cysteine proteases. *Cell Biosci*, 2021, 11(1): 45.
- [19] Coelho C, Gallo G, Campos CB, et al. Biochemical screening for SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240079.
- [20] Jin ZM, Du XY, Xu YC, et al. Structure of M<sup>Pro</sup> from SARS-CoV-2 and discovery of its inhibitors. *Nature*, 2020, 582(7811): 289-293.
- [21] Liu HB, Ye F, Sun Q, et al. *Scutellaria baicalensis* extract and baicalein inhibit replication of SARS-CoV-2 and its 3C-like protease *in vitro*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2021, 36(1): 497-503.
- [22] Xiao T, Cui MQ, Zheng CJ, et al. Myricetin inhibits SARS-CoV-2 viral replication by targeting M<sup>Pro</sup> and ameliorates pulmonary inflammation. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 669642.
- [23] Li Z, Li X, Huang YY, et al. Identify potent SARS-CoV-2 main protease inhibitors via accelerated free energy perturbation-based virtual screening of existing drugs. *PNAS*, 2020, 117(44): 27381-27387.
- [24] Ghahremanpour MM, Tirado-Rives J, Deshmukh M, et al. Identification of 14 known drugs as inhibitors of the main protease of SARS-CoV-2. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(12): 2526-2533.
- [25] Mahdi M, Mótyán JA, Szojka ZI, et al. Analysis of the efficacy of HIV protease inhibitors against SARS-CoV-2's main protease. *Virology*, 2020, 17(1): 190.
- [26] Karim S, Karim QA. *Omicron* SARS-CoV-2 variant: a new chapter in the COVID-19 pandemic. *Lancet*, 2021, 398(10317): 2126-2128.
- [27] Callaway E. *Omicron* likely to weaken COVID vaccine protection. *Nature*, 2021, 600(7889): 367-368.
- [28] Ai J, Zhang H, Zhang Y, et al. *Omicron* variant showed lower neutralizing sensitivity than other SARS-CoV-2 variants to immune sera elicited by vaccines after boost. *Emerg Microbes Infect*, 2022, 11(1): 337-343.
- [29] Rae M. *Omicron*: a failure to act with a global focus will continue the proliferation of new variants of covid-19. *BMJ*, 2021, 375: n3095. DOI: 10.1136/bmj.n3095.
- [30] Hale VL, Dennis PM, McBride DS, et al. SARS-CoV-2 infection in free-ranging white-tailed deer. *Nature*, 2022, 602(7897): 481-486.
- [31] Loschwitz J, Jäckering A, Keutmann M, et al. Novel inhibitors of the main protease enzyme of SARS-CoV-2 identified via molecular dynamics simulation-guided *in vitro* assay. *Bioorg Chem*, 2021, 111: 104862.
- [32] Zhu W, Xu M, Chen CZ, et al. Identification of SARS-CoV-2 3CL protease inhibitors by a quantitative high-throughput screening. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2020, 3(5): 1008-1016.
- [33] Ihssen J, Faccio G, Yao CY, et al. Fluorogenic *in vitro* activity assay for the main protease M<sup>Pro</sup> from SARS-CoV-2 and its adaptation to the identification of inhibitors. *STAR Protoc*, 2021, 2(3): 100793.
- [34] Rawson JMO, Duchon A, Nikolaitchik OA, et al. Development of a cell-based luciferase complementation assay for identification of SARS-CoV-2 3CL<sup>Pro</sup> inhibitors. *Viruses*, 2021, 13(2): 173.
- [35] Froggatt HM, Heaton BE, Heaton NS. Development of a fluorescence-based, high-throughput SARS-CoV-2 3CL<sup>Pro</sup> reporter assay. *J Virol*, 2020, 94(22): e01265-e01220.
- [36] Riva L, Yuan SF, Yin X, et al. Discovery of SARS-CoV-2 antiviral drugs through large-scale compound repurposing. *Nature*, 2020, 586(7827): 113-119.
- [37] 戚海燕, 闫干干, 付正豪, 等. 新型冠状病毒主蛋白酶抑制剂的筛选方法研究进展. *生命的化学*, 2021, 41(2): 207-214.
- Qi HY, Yan GG, Fu ZH, et al. Miniaturized high-throughput screening assays for the discovery of SARS-CoV-2 main protease inhibitors. *Chem Life*, 2021, 41(2): 207-214 (in Chinese).
- [38] Lea WA, Simeonov A. Fluorescence polarization assays in small molecule screening. *Expert Opin Drug Discov*, 2011, 6(1): 17-32.
- [39] Chen YY, Fu ZH, Li DS, et al. Optimizations of a novel fluorescence polarization-based high-throughput screening assay for  $\beta$ -catenin/LEF1 interaction inhibitors. *Anal Biochem*, 2021, 612: 113966.
- [40] 牛夏忆, 韩茂椿, 李森, 等. 重组人  $\beta$ -catenin 原核表达条件的优化及生物学活性鉴定. *微生物学杂志*, 2020, 40(1): 58-66.
- Niu XY, Han MC, Li M, et al. Optimization of prokaryotic expression conditions and biological activity identification of recombinant human  $\beta$ -catenin. *J Microbiol*, 2020, 40(1): 58-66 (in Chinese).
- [41] Raysyan A, Moerer R, Coesfeld B, et al. Fluorescence

- polarization immunoassay for the determination of diclofenac in wastewater. *Anal Bioanal Chem*, 2021, 413(4): 999-1007.
- [42] Yaroslavsky AN, Feng X, Muzikansky A, et al. Fluorescence polarization of methylene blue as a quantitative marker of breast cancer at the cellular level. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 940.
- [43] Levine LM, Michener ML, Toth MV, et al. Measurement of specific protease activity utilizing fluorescence polarization. *Anal Biochem*, 1997, 247(1): 83-88.
- [44] Behnam MAM, Klein CD. Inhibitor potency and assay conditions: a case study on SARS-CoV-2 main protease. *PNAS*, 2021, 118(36): e2106095118.
- [45] Saedtler M, Förtig N, Ohlsen K, et al. Antibacterial anacardic acid derivatives. *ACS Infect Dis*, 2020, 6(7): 1674-1685.
- [46] Park M, Upton D, Blackmon M, et al. Anacardic acid inhibits pancreatic cancer cell growth, and potentiates chemotherapeutic effect by Chmp1A-ATM-p53 signaling pathway. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 71.
- [47] Zhao KX, Jia YW, Peng JX, et al. Anacardic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis *in vitro* and prevents ovariectomy-induced bone loss *in vivo*. *FASEB J*, 2019, 33(8): 9100-9115.
- [48] Hundt J, Li ZB, Liu Q. The inhibitory effects of anacardic acid on hepatitis C virus life cycle. *PLoS One*, 2015, 10(2): e0117514.
- [49] 王维聪, 王潮, 宋学英, 等. 44种中药中1,2,3,4,6-五-O-倍酰-D-葡萄糖含量的测定. *中国中药杂志*, 2008, 33(6): 656-659.  
Wang WC, Wang C, Song XY, et al. Determination of 1,2,3,4,6-penta-O-galloyl-D-glucose in forty four kinds of Chinese traditional medicines by HPLC. *China J Chin Mater Med*, 2008, 33(6): 656-659 (in Chinese).
- [50] Chen RH, Yang LJ, Hamdoun S, et al. 1,2,3,4,6-pentagalloyl glucose, a RBD-ACE2 binding inhibitor to prevent SARS-CoV-2 infection. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 634176.

(本文责编 陈宏宇)