

靶向流感病毒表面糖蛋白的小分子抑制剂研究进展

江圆敏[#], 张继伟[#], 贾瑞芳, 贾惠楠, 张莹, 刘新泳^{*}, 展鹏^{*}

(山东大学药学院药物化学研究所, 化学生物学教育部重点实验室, 山东 济南 250012)

摘要: 血凝素和神经氨酸酶是流感病毒表面两种重要的糖蛋白, 分别在流感病毒生命周期的侵入和释放阶段发挥关键作用, 是药物设计的理想靶标。随着对流感病毒神经氨酸酶和血凝素的结构及功能的深入研究以及药物发现技术的不断发展, 针对这两个靶标的新型抑制剂被陆续发现。本综述精选近几年的代表性案例, 从药物化学角度总结了抗流感病毒表面糖蛋白小分子抑制剂的研究进展, 期望为新型高效抗流感病毒药物的研发提供参考。

关键词: 流感病毒; 神经氨酸酶; 血凝素; 药物设计; 小分子抑制剂

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3254-16

Recent advances in small-molecule inhibitors targeting influenza virus glycoproteins

JIANG Yuan-min[#], ZHANG Ji-wei[#], JIA Rui-fang, JIA Hui-nan, ZHANG Ying,
LIU Xin-yong^{*}, ZHAN Peng^{*}

(Key laboratory of Chemical Biology (Ministry of Education), Department of Medicinal Chemistry,
School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Hemagglutinin and neuraminidase, two important glycoproteins on the surface of influenza virus, play a considerable role in the entry and release stage of the viral life cycle, respectively. With in-depth investigation of influenza virus glycoproteins and the continuous innovation of drug discovery strategies, a new generation of glycoproteins inhibitors have been continuously discovered. From the point of view of medicinal chemistry, this review summarizes the current advances in seeking small-molecule inhibitors targeting influenza virus glycoproteins, hoping to provide valuable guidance for future development of novel antiviral drugs.

Key words: influenza virus; neuraminidase; hemagglutinin; drug design; small-molecule inhibitor

季节性流感是严重的公共卫生问题。它的传染性强、传播速度快, 通常患者会患有发热、头晕乏力、全身酸痛等症状, 严重的并发症常见于婴儿、老人或慢性病患者 (如继发性细菌感染、继发性细菌性肺炎等)。流感病毒是引发流感疫情的罪魁祸首。流感病毒是一种正黏病毒科 RNA 包膜负链的 RNA 病毒, 基于其核蛋白和基质蛋白的不同, 可分为多种亚型 (甲型、乙型、

丙型、丁型)^[1,2]。其中甲型流感病毒是引发流感大流行的主要病原体。不同亚型流感病毒的交替流行每年仍造成全世界多达 500 万例的严重病例及 29~65 万例呼吸道损伤所致的死亡^[3], 严重损害人类的生命健康。

流感病毒侵入宿主的生命周期通常可以分为几个阶段^[4]: 病毒的附着与进入、病毒基因组的复制、病毒蛋白的转录、新合成的病毒粒子的释放以及蛋白质的翻译。病毒表面存在两种丰富的糖蛋白 (图 1): 神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 和血凝素 (hemagglutinin, HA), HA 在感染初始阶段负责与宿主细胞唾液酸的结合, 在病毒摄取到核内体后, 负责病毒和细胞膜的融合^[5,6]。NA 在感染结束阶段负责裂解宿主细胞唾液酸

收稿日期: 2023-02-05; 修回日期: 2023-02-27.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773574); 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 E-mail: xinyongl@sdu.edu.cn; zhanpeng1982@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0109

与血凝素之间的糖苷键, 确保子代病毒从被感染的细胞中释放出来^[7]。鉴于NA与HA在流感病毒毒力和发病机制中的重要作用, 其已成为抗流感药物研发的重要靶标。本文精选了近些年研究实例, 从药物化学的角度综述了靶向流感病毒膜表面糖蛋白的小分子抑制剂研究进展(图2)。

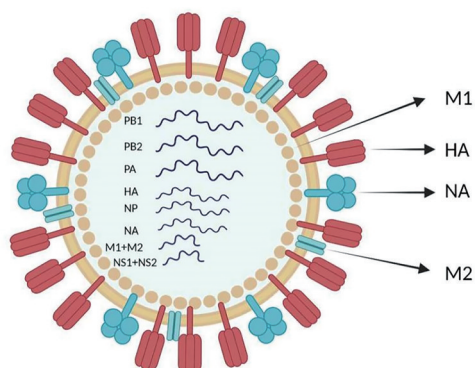


Figure 1 Simplified structure of influenza virus

1 NA抑制剂

NA又称唾液酸酶, 广泛分布于流感病毒包膜外表面, 由病毒RNA的第六节段负责编码^[8,9]。NA是一个四聚体结构, 包括头部催化部位、茎区、非极性跨膜

区和胞内区^[7]。NA的主要功能是裂解HA与宿主细胞唾液酸受体之间的糖苷键, 促进子代病毒颗粒的释放。

NA头部催化部位高度保守, 是药物设计的理想靶位, 目前已上市的4种神经氨酸酶抑制剂均作用在此催化位点, 包括扎那米韦(1)、奥司他韦(2)、帕拉米韦(3)和拉尼米韦辛酸酯(4)(图3)。在4种NA抑制剂中, 仅有奥司他韦是临床一线治疗的口服药物。但是临床上已经出现对该药严重耐药的突变株, 例如H1N1或H5N1的H274Y突变株和H3N2-E119V突变株, 严重限制了其临床疗效^[10]。因此, 如何提高NA抑制剂的抗病毒活性和克服耐药性成为研究热点。下文对有助于提高NA抑制剂抗耐药性及抗病毒活性的新策略进行了总结。

1.1 基于多位点结合策略的奥司他韦衍生物

1.1.1 靶向150腔的奥司他韦衍生物

NA共有11个亚型, 依据其一级结构序列和进化关系可分为两组: 第一组(group-1)包括N1、N4、N5和N8; 第二组(group-2)包括N2、N3、N6、N7和N9; 此外, 最近在蝙蝠体内发现的N10和N11由于缺乏唾液酸酶活性, 所以暂时被归为未分类的第三组(group-3)^[11]。在group-1 NAs中, 由147-152残基组成的柔性150-loop通常采用开放构象, 而在group-2 NAs中, 150-loop

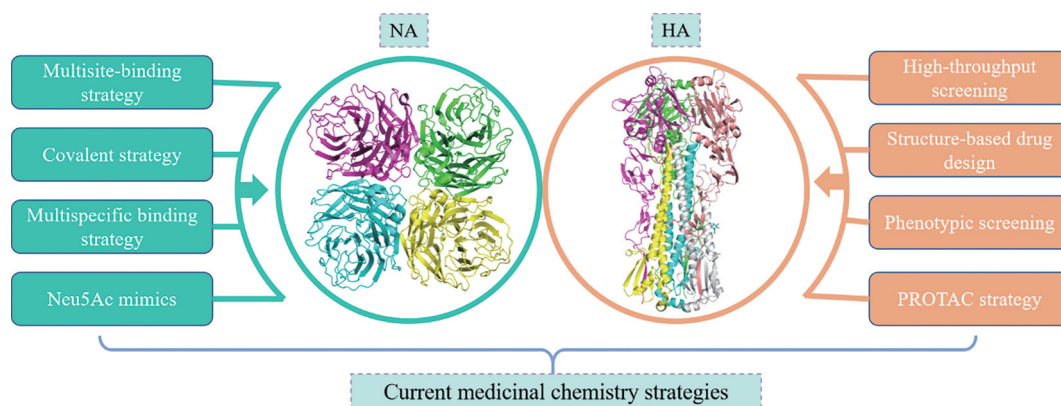


Figure 2 Overview of drug discover strategies in the development of novel influenza virus neuraminidase (NA) and hemagglutinin (HA) inhibitors

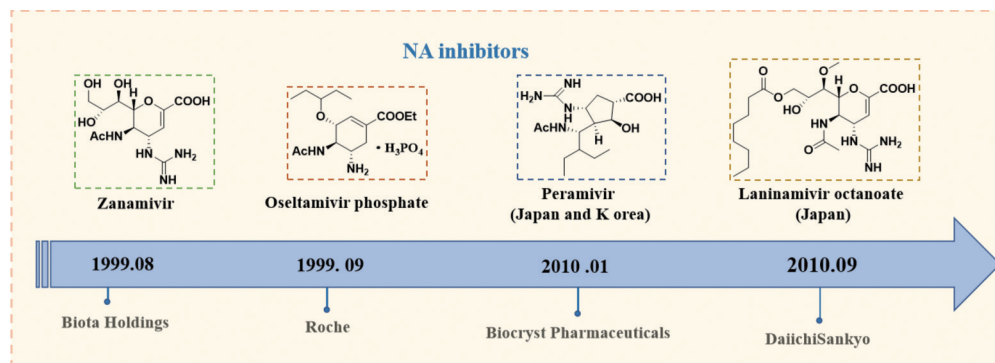


Figure 3 Chemical structures of zanamivir, oseltamivir phosphate, peramivir and laninamivir octanoate

始终是闭合的。由于两组 NAs 150-loop 的不寻常构造,使得 group-1 NAs 催化中心附近存在一个新型腔体 150 腔,而 group-2 NAs 不存在这个腔。同时,与 NA 催化中心紧邻的还有一个 430-loop,催化中心通过它与 430 腔连通。因此,靠近催化中心的 150 腔和 430 腔为开发新的抗流感病毒药物提供了广阔的空间^[12-15]。

近几年,基于多位点结合策略,本课题组一直致力于探索针对神经氨酸酶 150 腔的最适配基团。晶体结构表明,150 腔主要由疏水氨基酸组成,在朝向 150 腔的奥司他韦的氨基上引入空间体积合适的疏水基团,进而与周围的氨基酸残基建立广泛的疏水作用,可显著提高 NA 抑制剂活性^[14]。

2018 年,本课题组张健等^[16,17]在前期发现的先导化合物 **5** (图 4) 的基础上,保留优势基团苄基不变,对苯环末端的取代基进行了系统的结构修饰,最终发现了化合物 **6** (图 4),其对 group-1 NAs (H5N1 和 H5N8) 的抑制活性 ($IC_{50} = 0.96, 1.89 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均优于奥司他韦 ($IC_{50} = 26.6, 8.9 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),更重要的是,其对耐药株 H5N1-H274Y NA 的抑制活性 ($IC_{50} = 32.81 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较奥司他韦提升了 85 倍。此化合物具有可接受的口服生物利用度 ($F = 10.30\%$),且急性毒性低、体内抗 H5N2、H5N6、H5N8 毒株活性强 ($EC_{50} = 0.03, 0.52, 0.056 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、代谢稳定性高 ($t_{1/2} > 145 \text{ min}$,在人肝微粒体中 $CL < 9.6 \text{ min}$;在人血浆中 $CL > 120 \text{ min}$)。

分子动力学模拟表明,N2 中闭合的 150-loop 可能由于受到引入的配体的影响进而形成开放构象。2018 年,本课题组张健等^[18]通过在化合物 **5** 的苄基对位引入苯基和烷基取代的含氮基团,发现了一系列广谱 NA 抑制剂,其中化合物 **7** (图 4) 对 NA 的抑制活性最好,其对 09N1、N2、N6 和 N9 亚型的 IC_{50} 值分别为 0.55、0.35、1.26、1.791 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,是奥司他韦的 6.8~12.5 倍,对 N1-H274Y 和 N2-E119V 耐药突变亚型的抑制活性 ($IC_{50} = 387.07 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 也优于奥司他韦 ($IC_{50} = 1\ 630 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在细胞水平的抗病毒实验中,**7** 对 H5N1、H5N2、H5N6 和 H5N8 毒株的抗病毒活性 ($EC_{50} = 0.47, 0.012, 0.17, 0.61 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均稍稍优于奥司他韦 ($EC_{50} = 0.63, 0.07, 1.05, 1.22 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。成药性评价显示,**7** 在小鼠体内代谢稳定性高 ($t_{1/2} > 145 \text{ min}$,在人肝微粒体中 $CL < 9.6 \text{ min}$;在人血浆中 $CL > 120 \text{ min}$),体外鸡胚成纤维 (CEFs) 细胞毒性 ($CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和小鼠体内急性毒性低,值得进一步开发。

2019 年,本课题组贾瑞芳等^[19]采用分子杂合策略,通过修饰奥司他韦的 C-1 位羧基和 C-5 位氨基,设计合成了一系列新型的同时靶向 NAs 催化中心、150 腔和 430 腔的三位点结合型奥司他韦衍生物。虽然大部分

三位点结合型化合物的抑酶活性大幅下降,但偶然发现靶向 150 腔的化合物 **8** (图 4) 具有显著的抑酶活性与抗病毒活性,对 H5N1 和 H5N1-H274Y NAs 的 IC_{50} 值为 0.044 和 1.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,均优于奥司他韦 ($IC_{50} = 0.067, 2.45 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对 H5N1 和 H5N2 毒株的 EC_{50} 值为 0.66 和 0.48 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,稍优于奥司他韦 ($EC_{50} = 0.82, 0.17 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外,**8** 在最大测试浓度下未表现出明显的细胞毒性 ($CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CEF 细胞)。以此研究为基础,进一步修饰奥司他韦的 C-5 位氨基设计合成了一系列含苯氧基取代的奥司他韦衍生物^[20],其中化合物 **9** (图 4) 的抑酶活性较好。作为特异性 group-1 NAs 抑制剂,**9** 对 H1N1、H5N1 和 H5N1-H274Y NAs 的 IC_{50} 值分别为 0.28、0.089 和 0.33 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,此外,**9** 体外细胞毒性低 ($CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CEF 细胞; $CC_{50} > 200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞),在小鼠体内未表现出急性毒性。

2021 年,本课题组鞠翰等^[21]基于前期的研究基础和 NA-NAIs 结构生物学新信息,针对 150-腔的入口通道区域 (关键残基 T439 和 D151) 和底部区域 (由 S145 和 V116 封闭),运用了多位点结合和骨架跃迁等策略发现了一系列高活性的奥司他韦衍生物,其中含二苯并[b,d]噻吩取代的化合物 **10** (图 5) 对 NA 的抑制作用与抗病毒活性最强,对 H1N1、H5N1 和 H5N8 NAs 的 IC_{50} 值分别为 0.73、0.27、0.63 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, EC_{50} 值分别为 0.02、0.34、0.57 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时 **10** 对 H1N1-H274Y 耐药酶具有优于奥司他韦的抑制活性 (**10**: $IC_{50} = 3.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;奥司他韦: $IC_{50} = 8.7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。分子动力学模拟显示,**10** 能够同时占据 NA 的活性中心和 150 腔,其稠合三环侧链如预期一样可以伸入 150 腔。初步成药性评价显示,**10** 代谢稳定性高 ($t_{1/2} > 145 \text{ min}$,在人肝微粒体中 $CL < 9.6 \text{ min}$),对细胞色素 P450 酶抑制作用弱 ($IC_{50} > 58.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),成药性良好,口服生物利用度 ($F = 13.7\%$) 高于奥司他韦 ($F = 4.3\%$)。

基于前期发现的先导化合物 **5**,鞠翰等^[22]围绕联苯侧链进行了化学空间的深度探索和迭代结构优化,发现了化合物 **11** 和 **12** (图 5),其对几种 group-1 NAs 的抑制活性较奥司他韦均有几十倍提高。值得注意的是,这两种化合物对奥司他韦耐药的 H1N1-H274Y 和 H5N1-H274Y NA 亚型同样展现出极强的抑酶活性 (**11**: $IC_{50} = 510, 520 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; **12**: $IC_{50} = 1070, 610 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。 **11** 和 **12** 对 H5N1、H5N8 及 H1N1 毒株也表现出与奥司他韦相当的抗流感病毒活性 (**11**: $EC_{50} = 7.28, 0.71, 0.04 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **12**: $EC_{50} = 4.4, 0.57, 0.05 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。初步成药性评价显示,**11** 和 **12** 具有良好的人肝微粒体代谢稳定性 (**11**: $t_{1/2} > 120.5 \text{ min}$; **12**: $t_{1/2} > 145 \text{ min}$)、细胞色素

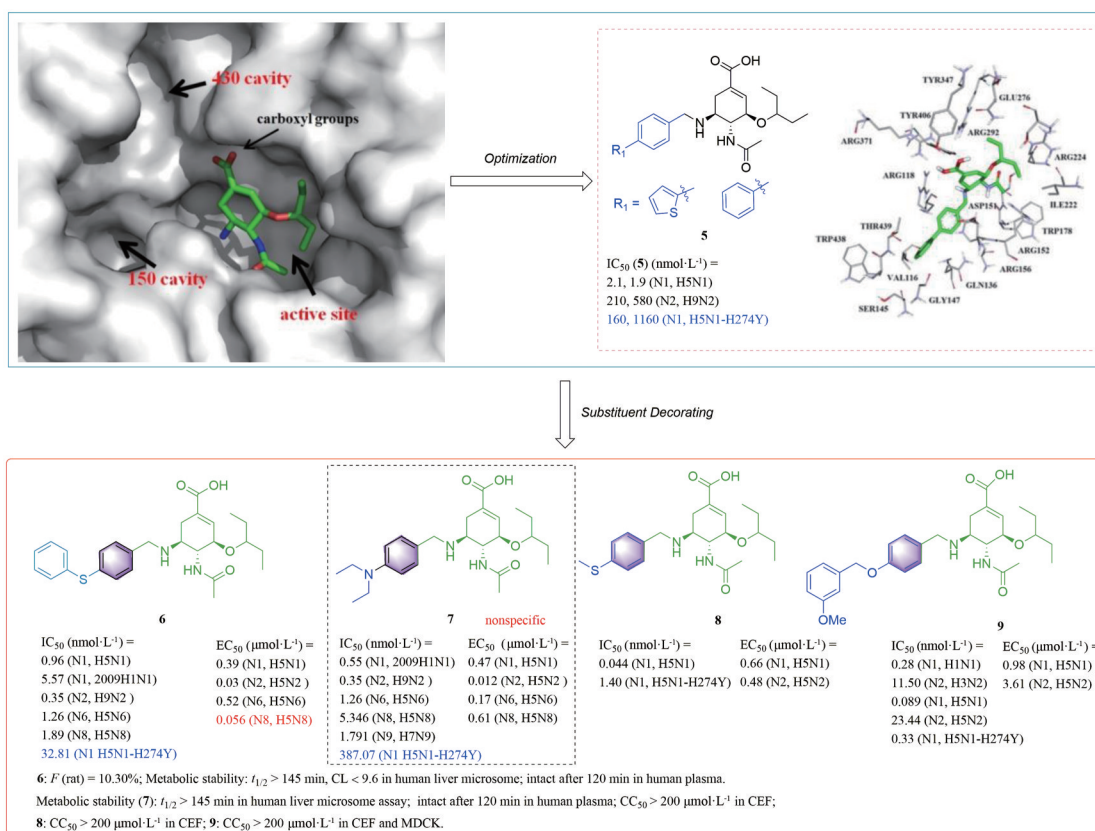


Figure 4 Representative structures of group-1-specific influenza NAs inhibitors (5, 6, 8, 9) and nonspecific NAs inhibitor (7) targeting 150-cavity

P450酶抑制作用弱 (11: IC₅₀ > 20.7 μmol·L⁻¹; 12: IC₅₀ > 28.9 μmol·L⁻¹) 及细胞毒性低 (CC₅₀ > 250 μmol·L⁻¹, CEF细胞) 等特点。

2021年, Wang等^[23]设计合成了一系列靶向150腔入口周围的极性氨基酸残基的1,2,3-三氮唑奥司他韦衍生物, 其中化合物13(图6)最有效, 其对H12N5和H3N2的IC₅₀值分别为0.045和0.019 μmol·L⁻¹, 对H1N1和H3N2毒株的EC₅₀值分别为11.53和7.65 nmol·L⁻¹, 且对H3N2-E119V耐药酶表现出良好的抑制活性(IC₅₀ = 0.79 nmol·L⁻¹)。更重要的是, 他们获得了13与N5 NA复合物的晶体结构(PDB code: 7E6Q), 三氮唑基团和末端的苯环可以伸入150腔中, 这从结构生物学上证实靶向150腔引入多样性的基团与之形成额外的互补作用是提高NA抑制剂活性的有效策略。

1.1.2 靶向430-腔的奥司他韦衍生物

2018年, 鞠翰等^[24]针对430腔设计、合成了一系列C-1修饰的新型奥司他韦衍生物。它们对H5N1和H5N6毒株显示出显著的抗病毒活性。其中含缬氨酸取代的化合物14(图6)抑酶活性和抗病毒活性最强, IC₅₀值分别为0.088和0.097 μmol·L⁻¹, EC₅₀值分别为4.26和1.31 μmol·L⁻¹, 与奥司他韦相当(IC₅₀ = 0.023、

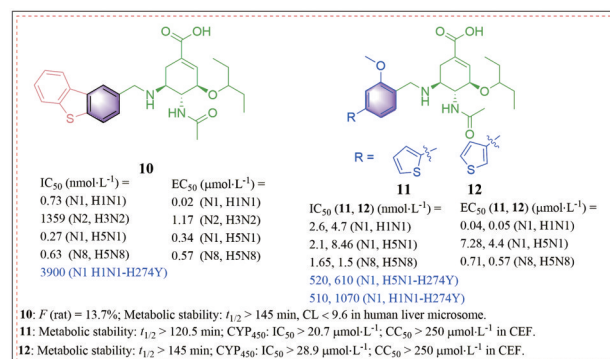


Figure 5 Chemical structures of inhibitors 10–12 targeting 150-cavity

0.014 5 μmol·L⁻¹; EC₅₀ = 1.35、0.73 μmol·L⁻¹)。鸡胚模型实验表明, 尽管14抑制H5N1毒株的活性没有奥司他韦显著, 但抑制H5N6毒株的活性强于奥司他韦。

2020年, 鞠翰等^[25]继续针对430腔, 运用铜催化叠氮炔环加成(CuAAC)反应设计合成了一系列1,2,3-三氮唑奥司他韦衍生物, 其中化合物15~18(图6)对H5N1、H5N2和H5N6毒株均显示出较强的NA抑制作用。以16的广谱抑酶及抗流感活性最为显著, IC₅₀值分别为0.12、0.049和0.16 μmol·L⁻¹, EC₅₀值分别为2.45、0.43和

2.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但是均略弱于奥司他韦。在鸡胚模型实验中, **16** 的抗 H9N2 病毒作用与奥司他韦类似 (80% 存活率)。

1.2 基于底物结构的 Neu5Ac 模拟物

1969 年由 Meindl 和 Tuppy^[26] 报道的 2,3-二脱氢-2-脱氧-N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac2en, **19**) (图 7) 是第一个作为 Neu5Ac 衍生物的 NA 抑制剂, 它可以抑制包括细菌、病毒和哺乳动物在内的各种生物体的 NA 活性, 这种 Neu5Ac 衍生物在当时被认为是过渡态类似物。然而, 最新的分子动力学模拟表明, 它并不是真正的过渡态类似物而是 α -Neu5Ac 衍生物^[27]。

2016 年, Sriwilajaroen 等^[28] 基于 **19** 的结构优化设计合成了一系列 GUN 衍生物, GUN 衍生物具有碱性的 C4 胍基侧链和庞大的 C6 亲水疏水基侧链, 特异性与神经氨酸酶结合, 对禽流感 N1-N9 以及人流感 N1、N1pdm09、N2 甚至是奥司他韦耐药株都有抑制活性。其中化合物 **20** (图 7) 对 viN2 具有良好的 NA 抑制作用, IC_{50} 值为 13.63 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 活性与奥司他韦 (6.94 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 以及扎那米韦 (11.51 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相当。更重要的是, 具有 C6 庞大亲水疏水基团侧链的 GUN 衍生物似乎并不容易产生抗性, 具体机制需进一步研究。

2016 年, Wu 等^[29] 通过结构生物学研究发现, N2 中的 E119 氨基酸突变后会导致奥司他韦和扎那米韦与周围关键氨基酸所形成的氢键的丧失, 而 I222 的取代也导致了奥司他韦疏水环境的改变, 显著影响了奥司他韦的结合。当这种取代同时发生时, N2 对 NA 抑制

剂的敏感性严重降低。同时, 他们发现了奥司他韦和扎那米韦的杂合体 **21** (图 7), 其结构中包含一个碱性胍基, 对上述两种突变株的活性得到提升。分子对接表明, **21** 特异性靶向于 NA 活性位点, 与 NA 活性位点之间增加的氢键相互作用将抑制剂固定在活性位点内。同时, **21** 在 NA 活性位点的母核结构可以进行灵活的局部调整, 很可能是其抗耐药性提升的原因。

2017 年, Li 等^[30] 设计合成了一系列酰基胍基奥司他韦类似物, 具有良好的 NA 抑制作用, 尤其是一些化合物对奥司他韦耐药株 (H259Y 突变体) 也具有显著的抑制作用。其中化合物 **22** 和 **23** (图 7) 最有效, 抑制 H259Y 突变体的 IC_{50} 值分别为 30.5 和 14.5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相较于奥司他韦分别提高了 5 倍和 11 倍。此外, 细胞水平的抗病毒实验表明, **22** 和 **23** 对 H259Y 突变体的 EC_{50} 值为 7.18 和 23.02 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 相较于奥司他韦分别提高了 20 倍和 6 倍, 且细胞毒性很低 ($\text{CC}_{50} > 1\ 000\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, CEF 细胞)。分子对接表明, **22** 和 **23** 的结合模式与奥司他韦并不相同, 它们在活性位点的构象是扭曲的, 但新形成的氢键以及 **23** 的侧链与 NA 的 150 腔、430 腔附近区域之间的疏水作用, 很可能弥补了其结合能的损失。

2020 年, Wang 等^[31] 基于结构优化设计合成了一系列含吡啶基的奥司他韦衍生物, 其中化合物 **24** (图 7) 具有较强的 NA 抑制作用, 对 H5N1 亚型的 IC_{50} 值为 320 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与奥司他韦活性相当 (210 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。MDCK 细胞病变保护实验表明, **24** 对流感病毒 H1N1 有

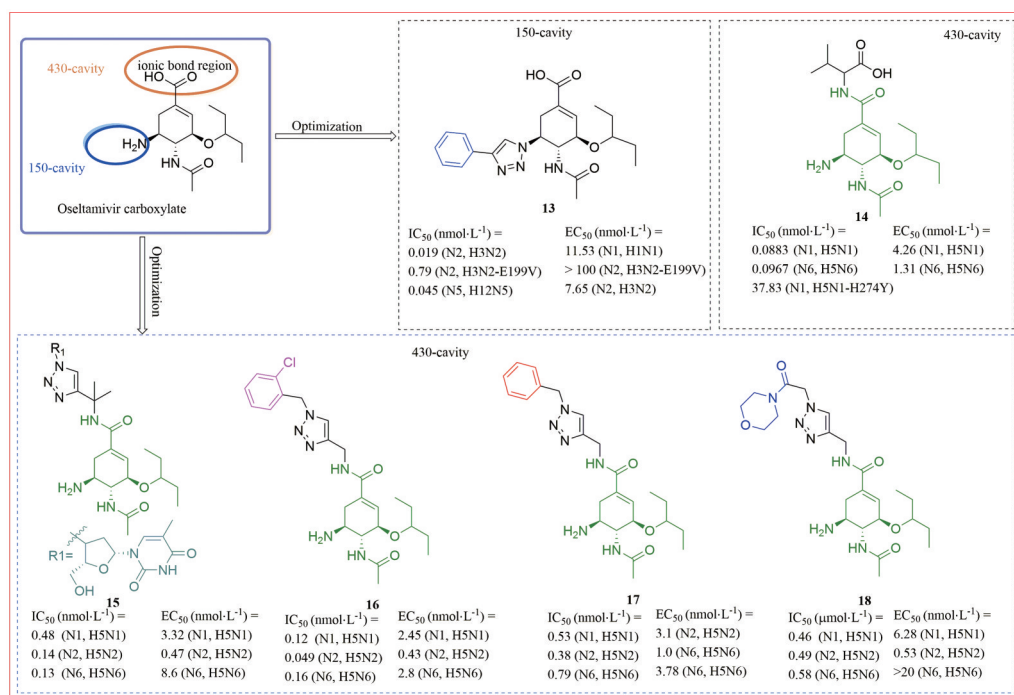


Figure 6 Chemical structures of the 150-cavity-targeting inhibitor **13** and the 430-cavity targeting inhibitors **14**–**18**

较强的抑制作用 [EC_{50} (A/PR/8/1934) = $12.68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; EC_{50} (A/LiaoNing-ZhenXing/1109/2010) = $14.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$], 且细胞毒性很低 ($CC_{50} > 10\,000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。分子对接也表明, **24** 的吡啶基与 R118 和 Y406 形成的新氢键是保持活性的关键因素。此外, **24** 在大鼠肝微粒体、人肝微粒体和人血浆中均具有较高的稳定性 (鼠: $t_{1/2} > 145 \text{ min}$, 人: $t_{1/2} > 145 \text{ min}$, 在人肝微粒体中 $CL < 9.6 \text{ min}$; 在人血浆中 $CL > 120 \text{ min}$), 值得进一步研究。

1.3 基于共价策略的 NA 抑制剂

2013 年, Vavricka 等^[32] 基于机制研究提出了神经氨酸酶的共价抑制概念, 这个概念源于他们证实了流感神经氨酸酶的保守位点 Y406 可能作为亲核试剂的关键催化残基。据此发现了第一个神经氨酸酶共价抑制剂, 即含氟取代的唾液酸衍生物 **25**, 对甲型、乙型流感病毒神经氨酸酶均具有较强的抑制活性 (A/r09N1: $IC_{50} = 226 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B/Lee/40: $IC_{50} = 56.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。晶体学研究也表明, **25** (图 8) 与 Y406 确实形成了牢固的

共价键。

同时, Kim 等^[33] 报道了一类与 **25** 结构骨架相同的特异性流感神经氨酸酶的共价抑制药物: FeqGuDFSA 衍生物 (**26**) (图 8), 它通过在神经氨酸酶中形成一个稳定的共价中间体来发挥作用。DFSA 衍生物 (**26**) 具有高效的酶抑制活性以及优异的抗病毒活性, 抗病毒水平与扎那米韦相当甚至优于扎那米韦 ($EC_{50} = 1 \sim 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外, DFSA 衍生物 (**26**) 对扎那米韦或奥司他韦耐药酶仍表现出良好抑制作用, IC_{50} 分别为 $44 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (H1N1-H275Y) 和 $17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (H1N9-E119G)。即使在小鼠动物模型中疗效也与扎那米韦相当。

1.4 基于多特异性结合策略的 NA 抑制剂

理性药物设计的理论基础为“一药一靶 (one target: one drug, 1T1D)”——即确定一个靶点, 寻求一个能与该靶点的结合并增强或抑制其功能的分子。过去几十年以来, 1T1D 方法一直占据药物设计主导地位,

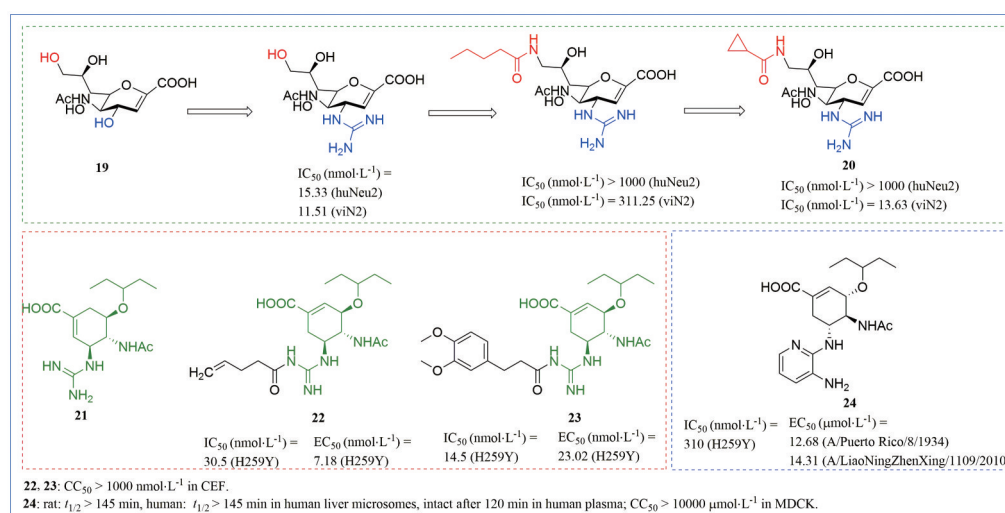


Figure 7 Chemical structures of Neu5Ac derivatives

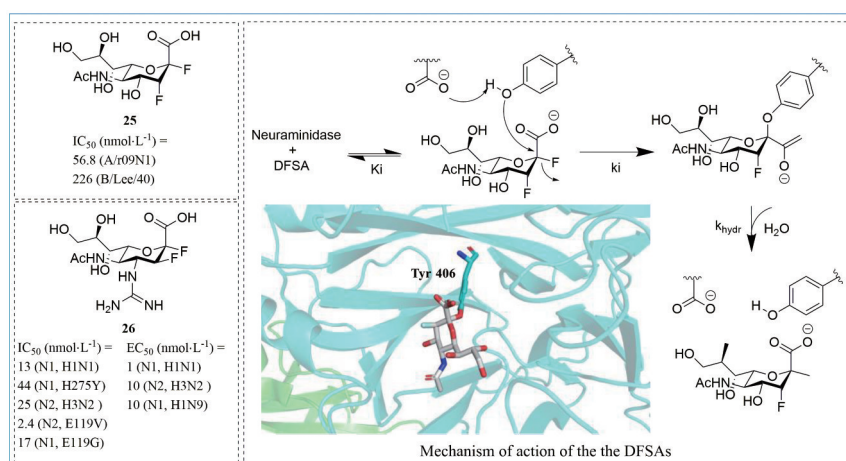


Figure 8 Chemical structures and mechanisms of covalent NA inhibitors (PDB code: 4H52)

但目前多特异性药物概念的提出,造就了新一波浪潮^[34,35]。多特异性药物可以和多个实体结合,增加与多个生物靶标结合的机会,常见的多特异性药物有抗体偶联药物、抗体募集分子 (antibody-recruiting molecules, ARMs) 和靶向蛋白质降解药物^[36]。当前,多特异性结合策略逐渐被应用于NA抑制剂领域。

1.4.1 基于ARMs的NA抑制剂

抗体募集分子 (ARMs) 是一种双功能分子,它能介导致病因子 (如蛋白质、病毒、细胞) 和抗体之间的三元复合物的生成 (图9)。ARMs诱导的抗体调节导致了免疫介导的靶标破坏。一般来说,ARMs包括3个结构域,分别是抗体结合端 (ABT)、靶标结合端 (TBT) 和 Linker。TBT结构域和 Linker结构域的修饰促使了靶向细菌、病毒和癌细胞的ARMs的发现,如在抗肿瘤领域及HIV gp120领域也有应用^[37,38]。

2020年, Liu等^[39]设计并合成了一种双功能小分子 (27) (图10), 它由扎那米韦与高免疫性半抗原二硝基苯结合组成 (图10), 特异性靶向游离病毒和被病毒感染细胞表面的神经氨酸酶, 具有较高的亲和力 (H1N1: $K_d = 0.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, H3N2: $K_d = 1.1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 能抑制病毒的释放, 并通过免疫介导清除游离病毒和被病毒感染的细胞 (H1N1: $\text{EC}_{50} = 1.7 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, H3N2: $\text{EC}_{50} = 7.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对于轻度感染的小鼠经鼻内或腹腔注射单剂量的药物就可以彻底根除甲型、乙型流感病毒,

对于严重感染的小鼠在接种后3天仍然有效。这种基于抗体募集的NA抑制剂为治疗流感病毒感染提供了新途径。

1.4.2 基于PROTAC策略的NA降解剂

靶向蛋白质降解是药物利用细胞自身的泛素蛋白酶系统或溶酶体靶向降解目标蛋白质的一大类技术,按具体作用原理可分为近10种不同的技术路线。其中,蛋白水解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimeria, PROTAC) 已成为药物研发中发展最快且最具优势和市场的蛋白降解技术路径。PROTAC概念由 Craig Crews等^[40]于2001年率先提出,该类异双功能分子的一端连接结合靶蛋白的配体,一端连接E3连接酶的配体,中间通过合适的 Linker相连。PROTAC通过泛素蛋白酶系统来实现降解靶蛋白的作用 (图11)。相比传统小分子抑制剂,PROTAC可让非药物靶点 (undruggable) 转变为可行药物靶点 (druggable), 并可以克服现有药物耐药性等问题^[36]。PROTAC策略逐渐应用于抗病毒药物领域。2019年, Wispelaere等^[41,42]首次报道了一个能有效降解HCV蛋白酶的PROTACs分子,该类分子具有抑制和蛋白降解的双功能,在细胞感染模型中能够有效抑制HCV ($\text{EC}_{50} = 748 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时可以克服病毒变异,解决了传统的 telaprevir 的耐药性问题,为克服病毒耐药性提供了新策略。

2022年, Xu等^[43]基于PROTAC策略设计合成了一系

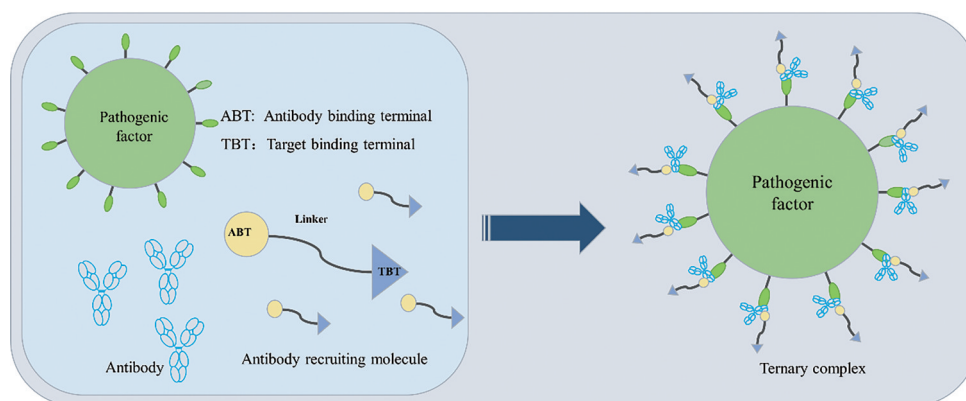


Figure 9 Mechanism of antibody recruitment

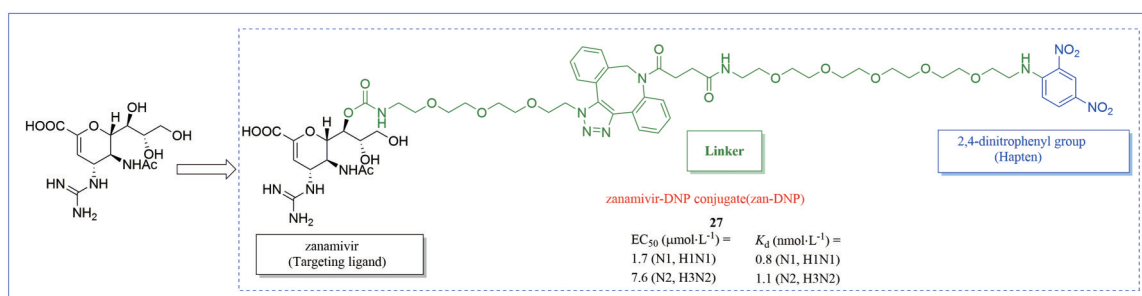


Figure 10 Chemical structure of zanamivir-DNP conjugate

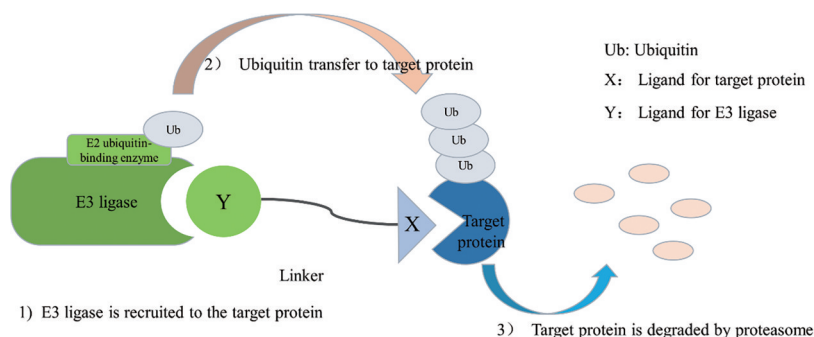


Figure 11 Mechanism of PROTAC strategy

列基于奥司他韦结构的新型 PROTAC 分子。其中化合物 **28** (图 12) 显著抑制 H1N1 毒株 ($EC_{50} = 0.33 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。实验结果表明, 招募了 E3 连接酶 VHL 的 **28** 不仅可以剂量依赖性地抑制 H1N1-H274Y 突变株 (NP 蛋白和 mRNA 水平显著降低), 同时也可以依赖泛素-蛋白酶途径, 在 10 或 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的剂量下显著诱导 NA 降解。这种新机制的 PROTAC 分子有望在流感的治疗中发挥重要作用。

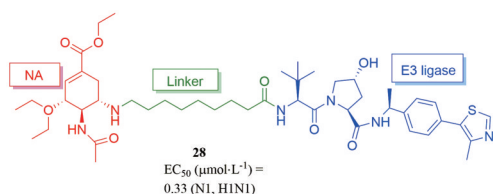


Figure 12 Chemical structure of compound 28

1.4.3 胆固醇缀合型 NA 抑制剂

耐药性成为奥司他韦临床药效受限制的主要因素, 而扎那米韦耐药性并不显著, 但是较差的药代动力学性质和鼻腔给药的方式限制了其进一步的应用。2021 年, Lv 等^[44]发现对扎那米韦的 C9 位酯化可以改善扎那米韦的药代动力学性质。胆固醇可以与血浆脂蛋白和白蛋白结合, 与其结合的核酸或多肽均表现出显著改善的药代动力学特性。基于此, 他们通过将扎那米韦与胆固醇结合开发出了一系列新型 NA 抑制剂。其中化合物 **29** (图 13) 对 H1N1-H275Y 突变株具有显著的抗病毒活性 ($EC_{50} = 22.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 与扎那米韦相当 ($EC_{50} = 26.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 显著优于奥司他韦 ($EC_{50} = 2\ 606.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。由于胆固醇结构的引入, **29** 的脂溶性增加, 相较于扎那米韦 ($t_{1/2} = 0.3 \text{ h}$), 其血浆半衰期延长 ($t_{1/2} = 7.6 \text{ h}$), 可作为长效的 NA 抑制剂。这种胆固醇偶联法有望成为提高小分子抗病毒活性和药代动力学性质的通用策略。

1.5 其他类

2020 年, Li 等^[45]基于前期发现总结的药效团模型, 设计合成了一系列新型酰肼 NA 抑制剂, 并对其进行

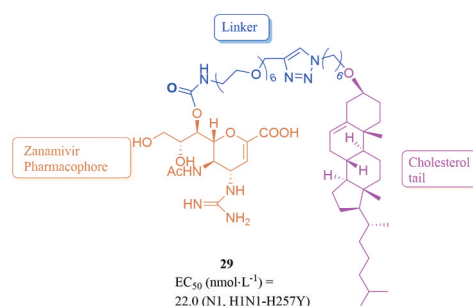


Figure 13 Chemical structure of compound 29

了体外 NA 活性抑制评价实验。其中化合物 **30** (图 14) 活性最高, IC_{50} 值为 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 显著优于奥司他韦 ($IC_{50} = 17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。分子对接发现, 酰肼基团可以很好地与 NA 活性位点的 R371 和 R292 残基结合, 吗啉环也可以延伸到 NA 的 430 腔中, 为进一步的结构优化提供了有价值的信息。

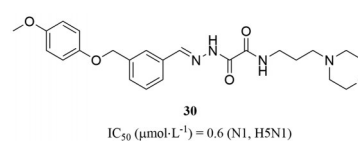


Figure 14 Chemical structure of compound 30

2 HA 抑制剂

HA 是广泛存在于流感病毒膜表面的一种重要糖蛋白。成熟的 HA 通常以同源三聚体形式存在, HA 最初作为一个前体 HA0 被表达, 它随后被蛋白酶水解切割成功能性的两个亚基 HA1 和 HA2, 并通过一个单一的二硫键连接^[46]。成熟的 HA1-HA2 复合物由两个结构域组成: 由 HA1 组成的膜远端球状头部结构域和主要由 HA2 和一些 HA1 残基组成的膜近端茎部结构域, 其中茎部结构域还包含了一个融合肽 (fusion peptide, FP)。当病毒与唾液酸受体结合后, 病毒将通过内吞作用进入宿主细胞, 暴露于酸性 pH 的条件下, 从而触发 HA 蛋白发生不可逆的构象变化, 导致其从融合前构象转变为低 pH 发夹结构。随后, 病毒继续发生 FP 的

暴露和HA2的“环到螺旋”转变,最终导致病毒和宿主内体膜的融合^[47,48]。

HA的高度多样性是阻止HA抑制剂开发的一个主要阻碍。迄今为止,已知的HA亚型有18种(H1~H18),可分为2个组,分别为group-1和group-2。第1组包括H1、H2、H5、H6、H8、H9、H11、H12、H13、H16、H17和H18,而第2组包括H3、H4、H7、H10、H14和H15^[49]。其中,H1~H16被认为是活性HA亚型,而H17和H18仅在蝙蝠中发现且缺乏结合唾液酸化聚糖的能力,被认为只是HA样蛋白^[50]。

所有16种活性HA亚型的唾液酸受体结合位点(receptor-binding sites, RBS)均位于HA1亚基的球状头部结构域中。RBS相对较浅,在不同HA亚型中差异较大,由所谓的“底板”构成:在16种活性HA亚型中保守的4种氨基酸Y93、W153、H183和Y195。这些氨基酸被4个区域包围,即130-loop、150-loop、190-helix和220-loop。尽管在所有HA亚型中这些元素始终都在,但它们的长度和附近氨基酸的组成则因病毒亚型而异。同时,HA的RBS小而浅,而且HA对唾液酸(SA)的单价结合亲和力较低^[51]。HA与细胞表面密集分布的SA的多价作用是介导病毒-宿主细胞黏附的主要因素^[52,53],因此,通过像NA抑制剂一样基于小分子化合物来模拟受体SA阻断病毒与受体结合的策略非常难以实现,目前尚未发现有效的小分子抑制剂。

高度保守的血凝素茎区成为开发小分子HA抑制剂的非常有吸引力的药物靶标。茎区结构域是HA的最小可变区域,针对该区域的小分子抑制剂可以通过抑制低pH环境下诱导的HA构象的重排来阻断HA发挥膜融合的作用。目前,已报道多类不同骨架的靶向茎区域的融合抑制剂,主要包括group-1/group-2特异性HA抑制剂和广谱流感病毒融合抑制剂。

2.1 Group-1 特异性 HA 抑制剂

2.1.1 基于配体结构的药物设计

2.1.1.1 BMY27709 及其衍生物 早在1996年, Luo等^[54]报道了一种对H1和H2亚型流感病毒具有选择性抑制活性的水杨酰胺类化合物BMY27709 (**31**) (图15), EC_{50} 值为3~8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分离出的**31**耐药株在HA2亚基的110位氨基酸残基由苯丙氨酸突变为丝氨酸,同时,**31**能够抑制流感病毒诱导的红细胞溶血,证明了它可以阻断血凝素的膜融合功能。随后,该课题组为快速探讨构效关系,采用了平行合成构建化合物库的方法。其中,含有取代环己烷的化合物**32** (图15)的抗病毒活性最强($EC_{50} = 0.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[55,56]。

基于此,2011年, Tang等^[57]进一步探讨了化合物**31**芳酰胺区域的构效关系,发现一系列新型高效芳基

磺酰胺类血凝素抑制剂,代表化合物为**33**和**34** (图15) (EC_{50} 值分别为210和86 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。特别是,**34**的代谢稳定性显著改善(HLM: $\text{CL} = 6.6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, MLM: $\text{CL} = 37.2 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$),值得进一步开发。

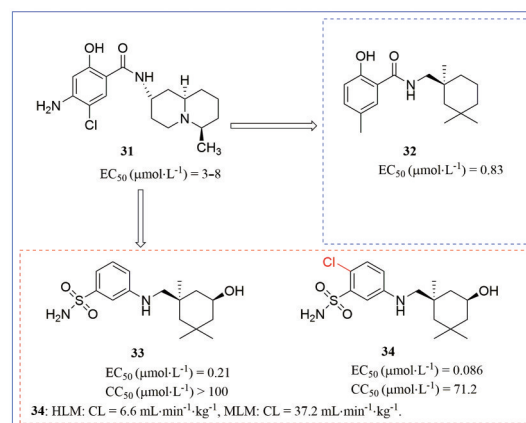


Figure 15 Chemical structures of **31** (BMY27709) and its derivatives

2.1.1.2 CL-385319 及其衍生物 1999年, Plotch等^[58]报道了一种N-取代的哌啶类衍生物CL-385319 (**35**) (图16)对group-1流感病毒的侵入具有明显的抑制作用,对A/FM/47 (H1N1)及A/WSN/33 (H1N1)毒株的 EC_{50} 分别为0.31和0.94 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。机制实验证明,**35**可以阻断低pH诱导的HA对蛋白酶水解的敏感性。2011年, Liu等^[59]发现**35**可以有效抑制高致病性H5N1流感病毒的感染, EC_{50} 值为27.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。分子对接表明,**35**可能与HA2茎区的结合空腔结合,HA1中具有M24A突变或HA2中具有F110S突变的假病毒对**35**具有抗性,表明空腔区域中的这两个残基可能对**35**结合至关重要。这些发现表明,**35**可以作为优秀的抗H5N1甲型流感病毒先导化合物。基于低聚噻吩与HA2侧链的残基F110和M24具有更强的 π - π 相互作用, Zhu等^[60]在上述研究的基础上,合成了一系列针对HA的新型低聚噻吩化合物,其中**36** (图16)对H5亚型甲型流感病毒的抗病毒活性最强, EC_{50} 值为0.029 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,是阳性药物**35**的1000倍。

2017年, Leiva等^[61]考虑到**31**的苯甲酰胺基团被苯胺基团取代后仍保留高效的抗流感病毒活性,他们以**35**为先导,设计合成了两种以苯胺为基本骨架的流感病毒group-1特异性HA抑制剂,并探讨了构效关系。发现化合物**37** (图16)的抗H1N1亚型流感病毒活性最强, EC_{50} 值分别为4.6和1.7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但对H3N2亚型流感病毒则未表现出抑制活性。机制实验证明,**37**可以干扰低pH诱导的膜融合过程。结合病毒耐药性、HA相互作用及分子动力学模拟研究表明,化合物

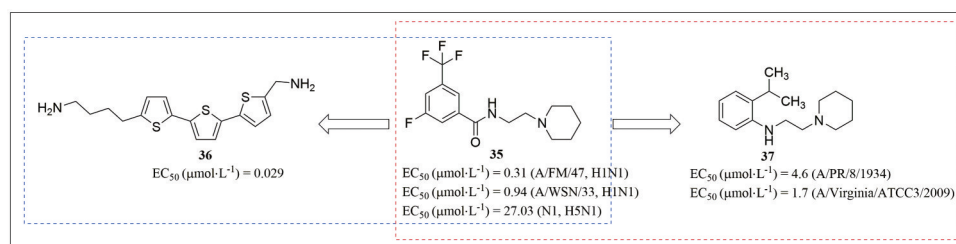


Figure 16 Chemical structures of 35 (CL-385319) and its derivatives

37在A/PR/8/34和A/Vigan/ATCC3/2009中的结合位点与叔丁基对苯二酚(见2.2.1.1叔丁基对苯二酚及其衍生物)一致。

2.1.2 高通量筛选及基于靶标结构的药物设计

2014年, 基于假病毒的高通量筛选模型, Basu等^[62]发现了几种能抑制流感病毒膜融合的 group-1 特异性 HA 抑制剂。其中氨基烷基苯酚醚化合物 38 和磺酰胺类化合物 39 (图 17) 具有显著的抗病毒活性 (EC₅₀ 值为 0.3~5.9 μmol·L⁻¹), 活性与奥司他韦相当, 细胞毒性低 (CC₅₀ > 200 μmol·L⁻¹), 且与奥司他韦表现出协同抗病毒效应。2017年, Basu等^[63]进一步研究了 39 的抗病毒机制。38 和 39 能与 HA 蛋白以非重叠的方式结合, 进一步的鸡红细胞溶血实验、单克隆抗体 C179 的竞争抑制实验及突变分析实验表明, 这两个化合物结合在 HA 蛋白三聚体的茎区, 从而抑制 HA 介导的融合过程。

2015年, White等^[64]利用表达海肾荧光素酶的重组 H1N1 流感病毒模型进行高通量筛选, 发现了一些能够选择性抑制流感病毒膜融合的 group-1 特异性 HA 抑制剂。其中二羟基草酰胺类化合物 40 (图 17) 对 H1 亚型流感病毒具有良好的活性, EC₅₀ 值为 80 nmol·L⁻¹; 但对 H3 亚型流感病毒和 B 型流感病毒无效。40 直接结合 HA 蛋白的茎区区域, 稳定低酸性环境诱导融合过程中所需的构象变化, 从而阻断了流感病毒的侵入。

2016年, Lai等^[65]对 50 240 种结构多样的化合物库进行高通量筛选, 发现两种具有良好抗病毒活性的金刚烷乙酰胺类化合物 41 和磺酰胺类化合物 42 (图 17), 抑制假病毒 H5N1 的 EC₅₀ 值分别为 0.022 和 0.083 μmol·L⁻¹。41 和 42 也通过抑制低 pH 诱导的 HA 构象变化从而抑制流感病毒侵入。突变分析实验表明, M592L 突变株对 42 的敏感性显著降低, group-1 型 HA 中 M592 残基在该类小分子与 HA 的结合中发挥关键作用。

2019年, Van Dongen等^[66]利用基于 AlphaLISA 技术构建的高通量筛选方法, 从一个含约 50 万个化合物的多样性化合物库中筛选出苯基哌啶化合物 43 (图 18), 进一步修饰得到化合物 44 (图 18), 44 与 HA 的相互作用增强, 对 group-1 型的 HA 具有选择性抑制作用, EC₅₀ 值为 0.012~0.066 μmol·L⁻¹。此外, 44 具有良

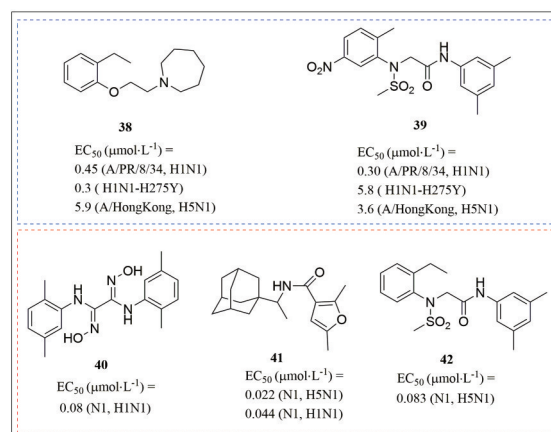


Figure 17 Chemical structures of compounds 38-42

好的口服生物利用度 ($F = 30\%$), 可保护小鼠免于 H1N1 A/Puerto Rico/8/34 的致命性危害。晶体学实验证明, 44 作用于 HA 茎部 HA1-HA2 界面的一个高度保守的疏水位点, 同时, group-2 型 HAs 的 HA1 N38 处存在糖基化位点, 可能导致 44 与 group-2 型 HA 结合时由于空间位阻而丧失对 group-2 型 HA 的活性, 从而表现出 group-1 亚型选择性抑制作用。

与此同时, 该课题组还利用前期发现的中和抗体 P7 肽构建了一种荧光偏振探针 (FP)^[67]。他们利用该探针对一个含有 72 000 个小分子的化合物库进行高通量筛选得到苯基吗啉类化合物 45 (图 19)。其 S 构型对 H1N1 毒株具有较好的抑制活性, EC₅₀ 值为 0.50~1.9 μmol·L⁻¹。结构生物学表明, 45 能与 HA 茎部的抗体结合口袋结合, 同时, 由于其仅占据了该结合口袋的一小部分, 还有进一步修饰的空间。

2020年, Hussein等^[68]基于对一种含 19 200 个小分子的化合物库进行基于 A549 细胞的高通量筛选, 发现了一类新型 4-氨基哌啶类 HA 抑制剂, 其中化合物 46 (图 19) 对 A/H1N1/Puerto Rico/8/34 毒株的抑制活性最显著 (EC₅₀ = 0.07 μmol·L⁻¹), 毒性较低 (CC₅₀ = 274.3 μmol·L⁻¹)。该课题组进一步研究了该化合物与 H5 HA 的晶体结构^[69]。发现 46 与 44 和 45 一样, 它们都通过广泛的疏水作用结合在融合肽附近的抗体结合口袋。基于此, 该课题组^[70]主要集中在 46 的异丙基和

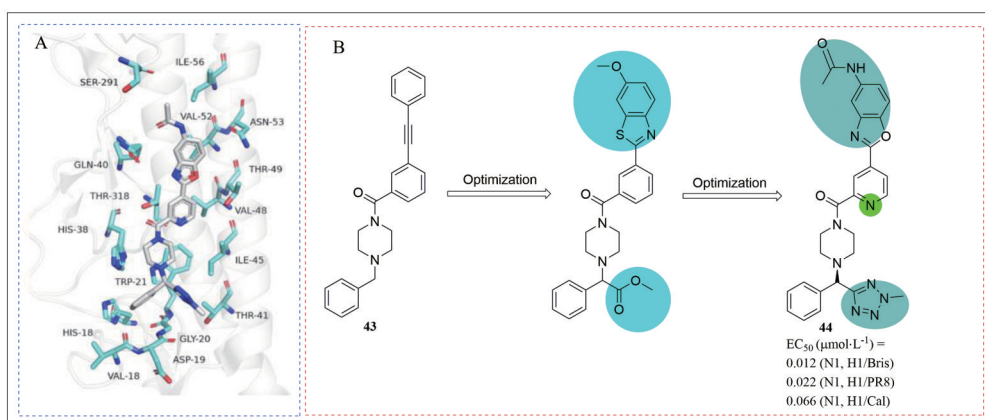


Figure 18 A: The crystal structure of **44** in complex with influenza H5 HA (PDB code: 6CFG). B: Chemical structures of **43** and **44**

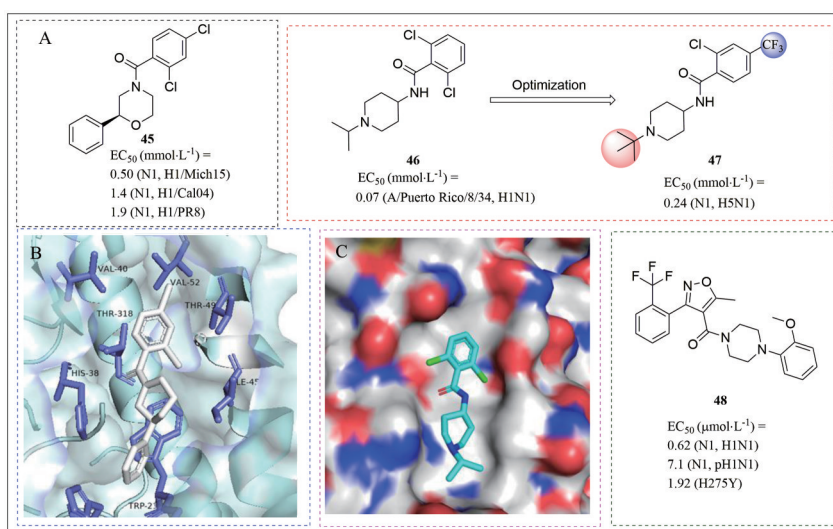


Figure 19 A: Chemical structures of group-1 HA inhibitors based on high-throughput screening (**45**–**48**). B: The crystal structure of **45** in complex with influenza H1 HA (PDB code: 6WCR). C: The crystal structure of **46** in complex with influenza H5 HA (PDB code: 6VMZ)

苯环位置进行改造, 其中化合物 **47** (图 19) 的抗病毒活性最强, 对 H5N1 毒株的 EC₅₀ 值为 0.24 μmol·L⁻¹。且与奥司他韦具有协同抗病毒活性 (较单一用药活性提升了近 5 倍)。更显著的是, **47** 在小鼠体内具有良好的代谢稳定性 [*t*_{1/2} (plasma) = 1.53 h, *t*_{1/2} (liver) = 2.47 h]。

Kim 等^[71] 构建了绿色荧光蛋白标记的重组流感病毒的高通量筛选方法, 进而发现了一个具有良好抗病毒活性的苯基哌嗪类化合物 **48** (图 19), 其对几类 H1N1 亚型流感病毒 (EC₅₀ = 0.62~7.1 μmol·L⁻¹) 和 NA-H275Y 突变型流感病毒 (EC₅₀ = 1.92 μmol·L⁻¹) 的活性显著优于奥司他韦 (EC₅₀ (H1N1) = 2.17~1 323 μmol·L⁻¹, EC₅₀ (H275Y) = 1 302 μmol·L⁻¹)。机制实验证明, **48** 可以抑制病毒引起的红细胞溶血及保护 HA 在低 pH 环境下免受胰蛋白酶的消化。在小鼠模型中, **48** 可以保护小鼠不受 pH1N1 rK09 的感染。

2.2 Group-2 特异性 HA 抑制剂

2.2.1 基于配体结构的药物设计

2.2.1.1 叔丁基对苯二酚及其衍生物 与 group-1 型特异性 HA 抑制剂相比, 已报道的 group-2 型特异性抑制剂更少。这可能与以下因素有关: 首先, group-2 型 IAV 体内研究的模型不太普遍; 其次, 与 group-1 型相比, 内在变异可能使 group-2 型中的可靶向性结合口袋更少。正因如此, 新型 group-2 型特异性 HA 抑制剂的研发值得进一步关注^[72]。

研究发现小分子叔丁基对苯二酚 (TBHQ) (**49a**) (图 20) 可以阻止 HA 介导的融合来特异性抑制 group-2 型 IAV, 但由于其潜在的氧化还原反应以及与宿主蛋白质的共价作用, 被认为是一类非特异性结合分子^[72,73]。Antanasijevic 等^[74] 对其进行了构效关系研究, 其中甲氧基取代的化合物 **49b** (图 20) 表现出增强的抗病毒活性 (EC₅₀ 值为 0.6 μmol·L⁻¹), 氧化还原反应性降低, 抗病毒活性约是 TBHQ 的 10 倍。

2.2.1.2 氮杂螺环酰胺类衍生物 2010年, Vanderlinden等^[75]报道了一类氮杂螺环酰胺类化合物, 其对H3N2亚型流感病毒表现出明显的选择性抑制作用, 其中化合物**50**(图20)的活性最强, 抑制几类H3N2毒株的 EC_{50} 值为 $3\sim 23\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2020年, Cihan-Üstündağ等^[76]将其结构中的芳香基团替换成了咪唑基团, 得到化合物**51**(图20), 抗流感病毒活性最显著, 它有效阻断了甲型H3N2病毒的侵入, EC_{50} 值为 $1.2\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 是先导化合物**50**的4 000倍。突变分析和分子模拟表明, 该类化合物的结合口袋可能结合与TBHQ和阿比多尔相同。

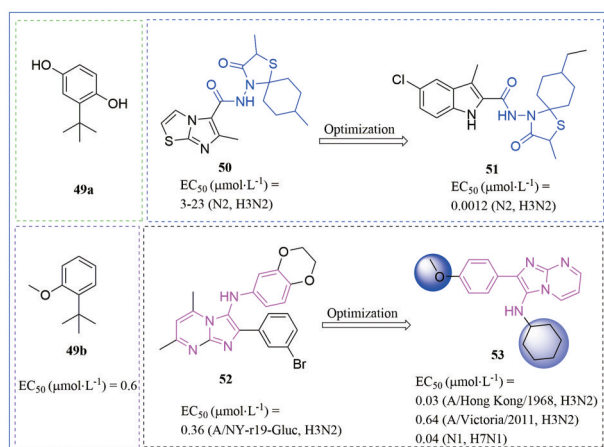


Figure 20 Chemical structures of group-2 HA inhibitors

2.2.2 基于细胞水平的表型筛选

2021年, Du等^[77]对一个由10 000个化合物组成的ChemDiv化合物库进行高通量筛选发现了咪唑并嘧啶类化合物**52**(图20), 它对group-2型HA具有选择特异性, 而对group-1型没有影响。**52**对A/NY-r19-Gluc(H3N2)毒株的 EC_{50} 值为 $0.36\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 优于阿比多尔($0.95\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但对H1N1和H5N1没有抑制活性。时间进程分析实验表明, **52**能抑制病毒感染的早期(HA介导的病毒侵入宿主的膜融合过程)。基于此, 该课题组对**52**进行了深入的结构修饰^[78], 探索了3个不同区域, 最终发现了化合物**53**(图20)强烈抑制A/Hong Kong/1968、A/Victoria/2011 H3N2及H7N1毒株(EC_{50} 分别为 0.03 、 0.64 、 $0.04\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。突变实验表明, 这些小分子以HA为靶点, 抑制了病毒的膜融合过程。分子对接表明, 化合物**53**的结合口袋与结合模式与阿比多尔基本类似。

2.3 广谱HA抑制剂

2.3.1 基于靶标结构的药物设计

阿比多尔(**54**)(图21)是一种广谱抗病毒药物, 是全球唯一获批上市(俄罗斯和中国)的HA抑制剂, 对

多种流感病毒有效。阿比多尔不良反应较低, 临床上未出现过耐药株, 但其活性仍需进一步提高。2017年, Kadam等^[79]解析了阿比多尔与H7N9和H3N2流感病毒的HA蛋白复合物的晶体结构, 证明了阿比多尔稳定HA的融合前构象的分子机制。发现阿比多尔作用于HA茎结构域上的一个疏水口袋, 距离融合肽 $16\ \text{Å}$ 。阿比多尔主要与结合位点发生疏水相互作用, 但也会诱导一些构象重排以形成原子间和原子内盐桥网络。阿比多尔通过稳定HA的预融合构象发挥抑制作用。阿比多尔-HA复合物的结构生物学信息为基于结构的药物设计奠定了基础。例如, 研究发现^[80]阿比多尔2-位的苯硫酚基是结构修饰以提高与HA蛋白的特异结合的有利位点, 据此得到的化合物**55**(图21)与H3亚型的HA蛋白的结合能力($K_d = 0.080\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)相较于阿比多尔提升了近千倍($K_d = 92\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。新引入的羟基可以通过水分子与周围的氨基酸残基建立起氢键网络, 提高了化合物的亲和力。

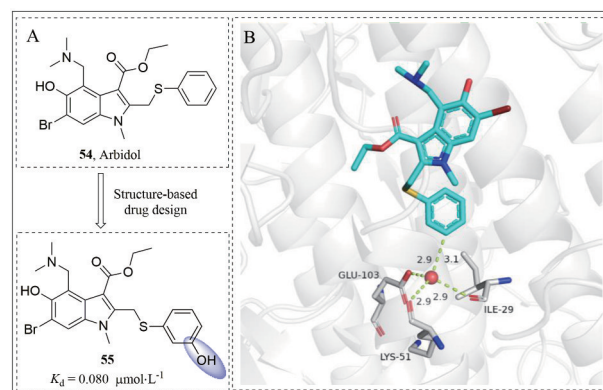


Figure 21 A: Chemical structures of arbidol and **55**. B: The crystal structure of arbidol in complex with influenza H3 HA (PDB code: 5T6N)

2.3.2 基于PROTAC策略的HA降解剂

2022年, Li等^[81]基于PROTAC策略设计合成了一系列齐墩果酸PROTAC分子。研究发现, E3连接酶类型的不同可能导致PROTAC分子具有不同的降解能力, 其中VHL具有最优的配体协同疗效, 可以使这种分子对HA蛋白的结合亲和力增加3倍($K_d = 3.18\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 提升它的促HA降解活性。此外, 在这种由VHL配体连接的PROTAC分子中, 化合物**56**(图22)具有最显著的HA降解效果($DC_{50} = 1.44\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。光交联质谱分析进一步表明, HA复合物中N15、T31和N27的交联区域是HA抑制剂的新结合位点, 为发现新型抗流感药物指明了新方向。

3 总结

流感对全球公共卫生仍然构成着重大威胁。这种

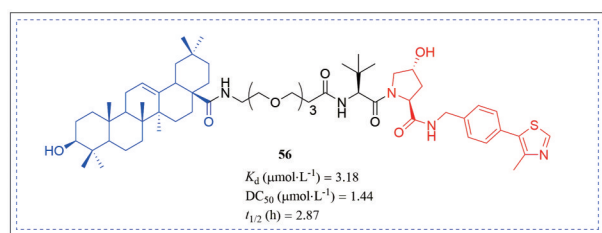


Figure 22 Chemical structure of compound 56

威胁背后的一个重要因素就是流感病毒的不可预测性。即使全球网络监测系统能实时监测病毒在人类和动物体的传播,但也很难准确预测有可能导致大流行的新病毒的出现。不同亚型流感病毒的交叉流行仍然有形成重组新型流感病毒的可能。流感病毒HA共有18种亚型,NA共有11种亚型,理论上“排列组合”可形成的流感病毒亚型多达100多种^[82]。在这种病毒迅速演变甚至导致疫情大爆发的情况下,抗病毒药物发挥了特别重要的作用。

几十年来,抗流感药物主要局限于靶向NA的药物。由于流感病毒固有的高变异性和药物的选择压力,NA耐药毒株成为公众担忧的问题。例如导致2009年流感大流行的病原体09 H1N1对奥司他韦产生的严重耐药性,大大削弱了其临床治疗效果。因此,研发新型、高效和抗耐药性的NA抑制剂一直是流感领域研究的热点。近年来该方向的研究工作主要集中在两个方面:一是发现具有新机制的NA抑制剂,如靶向共价唾液酸模拟物、多价态NA抑制剂、基于拓扑匹配策略^[83,84]的NA和HA双靶点纳米颗粒抑制剂以及PROTAC技术在NA抑制剂领域的应用等。新策略与新技术的交叉融通与广泛应用,极大促进了新型NA抑制剂的发展。然而,这些新型抑制剂往往面临药代动力学不佳等问题;二是靶向神经氨酸酶催化中心附近150-腔和430-腔对现有的NA抑制剂进行结构改造以提高抗耐药性。靶向150-腔的奥司他韦衍生物普遍具有明显的NA亚型选择性;靶向430-腔的奥司他韦衍生物往往抗病毒活性下降,这可能是由于羧基的缺失削弱了与周围精氨酸簇之间关键的氢键和静电作用。

侵入抑制剂可以兼具治疗和预防的作用,同时与其他药物联用可增强已有药物的抗病毒效力。结构生物学的发展使流感HA(特别是高度保守的茎区)成为非常有吸引力的药物靶标。但是,HA的高度多样性限制了该类抑制剂的发展。由于group-2 HA在保守茎区区域存在一个糖基化位点,这导致靶向该区域的抑制剂均为特异性的group-1抑制剂。直到最近,针对group-2 HA的小分子抑制剂才逐渐引起了研究者的注

意,特别是,阿比多尔结合口袋的确定促进了新型group-2 HA抑制剂的发现。

针对不同靶标的抗病毒化合物的组合可以提高疗效并降低病毒耐药性的发生率。NA和HA作为流感病毒生命周期不同阶段的关键糖蛋白,两类抑制剂的联合应用也会产生更有效的“鸡尾酒疗法”,为流感的防治提供新的选择。

作者贡献: 江圆敏和张继伟负责全文的撰写;贾瑞芳、贾惠楠、张莹参与了全文的修改;刘新泳和展鹏对论文进行整体的指导和修改。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Shen Z, Lou K, Wang W. New small-molecule drug design strategies for fighting resistant influenza A [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2015, 5: 419-430.
- [2] Moorthy NS, Poongavanam V, Pratheepa V. Viral M2 ion channel protein: a promising target for anti-influenza drug discovery [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2014, 14: 819-830.
- [3] Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses [J]. *Vaccine*, 2008, 26Suppl 4: D49-53.
- [4] Harrison SC. Viral membrane fusion [J]. *Virology*, 2015, 479-480: 498-507.
- [5] Zhang J, Jia R, Zhan P, et al. Advances in research on inhibitors of viral entry [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2021, 31: 680-704.
- [6] Jiang X, Zhan P, Liu X. Recent progress in the research of neuraminidase inhibitors targeting novel binding sites [J]. *Chin J Med Chem (中国药物化学杂志)*, 2013, 23: 141-147, 167.
- [7] McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, et al. Influenza virus neuraminidase structure and functions [J]. *Front Microbiol*, 2019, 10: 39.
- [8] Zhang C, Cao Y, Zhong W, et al. Establishment of a cell-based 2009 H1N1 influenza neuraminidase inhibitors evaluation system [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2010, 45: 383-387.
- [9] Varghese JN, Laver WG, Colman PM. Structure of the influenza virus glycoprotein antigen neuraminidase at 2.9 Å resolution [J]. *Nature*, 1983, 303: 35-40.
- [10] Jefferson T, Demicheli V, Rivetti D, et al. Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review [J]. *Lancet*, 2006, 367: 303-313.
- [11] Wei CJ, Crank MC, Shiver J, et al. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19: 239-252.
- [12] Russell RJ, Haire LF, Stevens DJ, et al. The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design [J]. *Nature*, 2006, 443: 45-49.
- [13] Amaro RE, Swift RV, Votapka L, et al. Mechanism of 150-cavity

- formation in influenza neuraminidase [J]. *Nat Commun*, 2011, 2: 388.
- [14] Amaro RE, Minh DD, Cheng LS, et al. Remarkable loop flexibility in avian influenza N1 and its implications for antiviral drug design [J]. *J Am Chem Soc*, 2007, 129: 7764-7765.
- [15] Durrant JD, Kochanek SE, Casalino L, et al. Mesoscale all-atom influenza virus simulations suggest new substrate binding mechanism [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6: 189-196.
- [16] Xie Y, Xu D, Huang B, et al. Discovery of N-substituted oseltamivir derivatives as potent and selective inhibitors of H5N1 influenza neuraminidase [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 8445-8458.
- [17] Zhang J, Murugan NA, Tian Y, et al. Structure-based optimization of N-substituted oseltamivir derivatives as potent anti-influenza virus agents with significantly improved potency against oseltamivir-resistant N1-H274Y variant [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 9976-9999.
- [18] Zhang J, Poongavanam V, Kang D, et al. Optimization of N-substituted oseltamivir derivatives as potent inhibitors of group-1 and group-2 influenza A neuraminidases, including a drug-resistant variant [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 6379-6397.
- [19] Jia R, Zhang J, Ai W, et al. Design, synthesis and biological evaluation of "Multi-Site" -binding influenza virus neuraminidase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 178: 64-80.
- [20] Jia R, Zhang J, Bertagnin C, et al. Discovery of highly potent and selective influenza virus neuraminidase inhibitors targeting 150-cavity [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 212: 113097.
- [21] Ju H, Murugan NA, Hou L, et al. Identification of C5-NH₂ modified oseltamivir derivatives as novel influenza neuraminidase inhibitors with highly improved antiviral activities and favorable druggability [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 17992-18009.
- [22] Ju H, Hou L, Zhao F, et al. Iterative optimization and structure-activity relationship studies of oseltamivir amino derivatives as potent and selective neuraminidase inhibitors *via* targeting 150-cavity [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 11550-11573.
- [23] Wang P, Oladejo BO, Li C, et al. Structure-based design of 5'-substituted 1, 2, 3-triazolylated oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors [J]. *RSC Adv*, 2021, 11: 9528-9541.
- [24] Ju H, Zhang J, Sun Z, et al. Discovery of C-1 modified oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 146: 220-231.
- [25] Ju H, Xiu S, Ding X, et al. Discovery of novel 1,2,3-triazole oseltamivir derivatives as potent influenza neuraminidase inhibitors targeting the 430-cavity [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 187: 111940.
- [26] Meindl P, Tuppy H. 2-Deoxy-2,3-dehydrosialic acids. II. Competitive inhibition of *Vibrio cholerae* neuraminidase by 2-deoxy-2, 3-dehydro-N-acylneuraminic acids [J]. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem*, 1969, 350: 1088-1092.
- [27] Shidmoosavee FS, Watson JN, Bennet AJ. Chemical insight into the emergence of influenza virus strains that are resistant to Relenza [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 13254-13257.
- [28] Sriwilaijaroen N, Magesh S, Imamura A, et al. A novel potent and highly specific inhibitor against influenza viral N1-N9 neuraminidases: insight into neuraminidase-inhibitor interactions [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 4563-4577.
- [29] Wu Y, Gao F, Qi J, et al. Resistance to mutant group-2 influenza virus neuraminidases of an oseltamivir-zanamivir hybrid inhibitor [J]. *J Virol*, 2016, 90: 10693-10700.
- [30] Li Z, Meng Y, Xu S, et al. Discovery of acylguanidine oseltamivir carboxylate derivatives as potent neuraminidase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25: 2772-2781.
- [31] Wang K, Lei Z, Zhao L, et al. Design, synthesis and biological evaluation of oseltamivir derivatives containing pyridyl group as potent inhibitors of neuraminidase for influenza A [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 185: 111841.
- [32] Vavricka CJ, Liu Y, Kiyota H, et al. Influenza neuraminidase operates *via* a nucleophilic mechanism and can be targeted by covalent inhibitors [J]. *Nat Commun*, 2013, 4: 1491.
- [33] Kim JH, Resende R, Wennekes T, et al. Mechanism-based covalent neuraminidase inhibitors with broad-spectrum influenza antiviral activity [J]. *Science*, 2013, 340: 71-75.
- [34] Deshaies RJ. Multispecific drugs herald a new era of biopharmaceutical innovation [J]. *Nature*, 2020, 580: 329-338.
- [35] Wang Y, Yang S. Multispecific drugs: the fourth wave of biopharmaceutical innovation [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5: 86.
- [36] Zhong X, D'Antona AM. Recent advances in the molecular design and applications of multispecific biotherapeutics [J]. *Antibodies (Basel)*, 2021, 10: 13.
- [37] Parker CG, Domaoal RA, Anderson KS, et al. An antibody-recruiting small molecule that targets HIV gp120 [J]. *J Am Chem Soc*, 2009, 131: 16392-16394.
- [38] Xu S, Ding D, Zhang X, et al. Novel targets and strategies in antiviral drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 903-916.
- [39] Liu X, Zhang B, Wang Y, et al. A universal dual mechanism immunotherapy for the treatment of influenza virus infections [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 5597.
- [40] Sakamoto KM, Kim KB, Kumagai A, et al. Protacs: chimeric molecules that target proteins to the Skp1-Cullin-F box complex for ubiquitination and degradation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98: 8554-8559.
- [41] Xu S, Ding D, Liu X, et al. Universal strategies and methodologies in broad-spectrum antiviral drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 1289-1300.
- [42] De Wispelaere M, Du G, Donovan KA, et al. Small molecule degraders of the hepatitis C virus protease reduce susceptibility to resistance mutations [J]. *Nat Commun*, 2019, 10: 3468.
- [43] Xu Z, Liu X, Ma X, et al. Discovery of oseltamivir-based novel

- PROTACs as degraders targeting neuraminidase to combat H1N1 influenza virus [J]. *Cell Insight*, 2022, 1: 100030.
- [44] Lv X, Wang P, Li C, et al. Zanamivir-cholesterol conjugate: a long-acting neuraminidase inhibitor with potent efficacy against drug-resistant influenza viruses [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 17403-17412.
- [45] Li M, Cheng LP, Pang W, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potent neuraminidase inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 1745-1750.
- [46] Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution [J]. *Nature*, 1981, 289: 366-373.
- [47] Luo M. Influenza virus entry [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 726: 201-221.
- [48] Das DK, Govindan R, Nikić-Spiegel I, et al. Direct visualization of the conformational dynamics of single influenza hemagglutinin trimers [J]. *Cell*, 2018, 174: 926-937.
- [49] Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 28403-28409.
- [50] Ma W, García-Sastre A, Schwemmle M. Expected and unexpected features of the newly discovered bat influenza A-like viruses [J]. *PLoS Pathog*, 2015, 11: e1004819.
- [51] Weis W, Brown JH, Cusack S, et al. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid [J]. *Nature*, 1988, 333: 426-431.
- [52] Takemoto DK, Skehel JJ, Wiley DC. A surface plasmon resonance assay for the binding of influenza virus hemagglutinin to its sialic acid receptor [J]. *Virology*, 1996, 217: 452-458.
- [53] Stencel-Baerenwald JE, Reiss K, Reiter DM, et al. The sweet spot: defining virus-sialic acid interactions [J]. *Nat Rev Microbiol*, 2014, 12: 739-749.
- [54] Luo G, Colonno R, Krystal M. Characterization of a hemagglutinin-specific inhibitor of influenza A virus [J]. *Virology*, 1996, 226: 66-76.
- [55] Deshpande MS, Wei J, Luo G, et al. An approach to the identification of potent inhibitors of influenza virus fusion using parallel synthesis methodology [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2393-2396.
- [56] Cianci C, Yu KL, Dischino DD, et al. pH-dependent changes in photoaffinity labeling patterns of the H1 influenza virus hemagglutinin by using an inhibitor of viral fusion [J]. *J Virol*, 1999, 73: 1785-1794.
- [57] Tang G, Lin X, Qiu Z, et al. Design and synthesis of benzenesulfonamide derivatives as potent anti-influenza hemagglutinin inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 603-607.
- [58] Plotch SJ, O'Hara B, Morin J, et al. Inhibition of influenza A virus replication by compounds interfering with the fusogenic function of the viral hemagglutinin [J]. *J Virol*, 1999, 73: 140-151.
- [59] Liu S, Li R, Zhang R, et al. CL-385319 inhibits H5N1 avian influenza A virus infection by blocking viral entry [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660: 460-467.
- [60] Zhu Z, Yao Z, Shen X, et al. Oligothiophene compounds inhibit the membrane fusion between H5N1 avian influenza virus and the endosome of host cell [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 130: 185-194.
- [61] Leiva R, Barniol-Xicota M, Codony S, et al. Aniline-based inhibitors of influenza H1N1 virus acting on hemagglutinin-mediated fusion [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 98-118.
- [62] Basu A, Antanasijevic A, Wang M, et al. New small molecule entry inhibitors targeting hemagglutinin-mediated influenza A virus fusion [J]. *J Virol*, 2014, 88: 1447-1460.
- [63] Basu A, Komazin-Meredith G, McCarthy C, et al. Molecular mechanism underlying the action of influenza A virus fusion inhibitor MBX2546 [J]. *ACS Infect Dis*, 2017, 3: 330-335.
- [64] White KM, De Jesus P, Chen Z, et al. A potent anti-influenza compound blocks fusion through stabilization of the prefusion conformation of the hemagglutinin protein [J]. *ACS Infect Dis*, 2015, 1: 98-109.
- [65] Lai KK, Cheung NN, Yang F, et al. Identification of novel fusion inhibitors of influenza A virus by chemical genetics [J]. *J Virol*, 2015, 90: 2690-2701.
- [66] van Dongen MJP, Kadam RU, Juraszek J, et al. A small-molecule fusion inhibitor of influenza virus is orally active in mice [J]. *Science*, 2019, 363: eaar6221.
- [67] Yao Y, Kadam RU, Lee CD, et al. An influenza A hemagglutinin small-molecule fusion inhibitor identified by a new high-throughput fluorescence polarization screen [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117: 18431-18438.
- [68] Hussein AFA, Cheng H, Tundup S, et al. Identification of entry inhibitors with 4-aminopiperidine scaffold targeting group-1 influenza A virus [J]. *Antiviral Res*, 2020, 177: 104782.
- [69] Antanasijevic A, Durst MA, Cheng H, et al. Structure of avian influenza hemagglutinin in complex with a small molecule entry inhibitor [J]. *Life Sci Alliance*, 2020, 3: e202000724.
- [70] Gaisina IN, Peet NP, Cheng H, et al. Optimization of 4-aminopiperidines as inhibitors of influenza A viral entry that are synergistic with oseltamivir [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 3120-3130.
- [71] Kim JI, Lee S, Lee GY, et al. Novel small molecule targeting the hemagglutinin stalk of influenza viruses [J]. *J Virol*, 2019, 93: e00878-19.
- [72] Bodian DL, Yamasaki RB, Buswell RL, et al. Inhibition of the fusion-inducing conformational change of influenza hemagglutinin by benzoquinones and hydroquinones [J]. *Biochemistry*, 1993, 32: 2967-2978.
- [73] Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, et al. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 17736-17741.

- [74] Antanasijevic A, Hafeman NJ, Tundup S, et al. Stabilization and improvement of a promising influenza antiviral: making a painless [J]. *ACS Infect Dis*, 2016, 2: 608-615.
- [75] Vanderlinden E, Göktas F, Cesur Z, et al. Novel inhibitors of influenza virus fusion: structure-activity relationship and interaction with the viral hemagglutinin [J]. *J Virol*, 2010, 84: 4277-4288.
- [76] Cihan-Üstündağ G, Zopun M, Vanderlinden E, et al. Superior inhibition of influenza virus hemagglutinin-mediated fusion by indole-substituted spirothiazolidinones [J]. *Bioorg Med Chem*, 2020, 28: 115130.
- [77] Du R, Cheng H, Cui Q, et al. Identification of a novel inhibitor targeting influenza A virus group-2 hemagglutinins [J]. *Antiviral Res*, 2021, 186: 105013.
- [78] Alqarni S, Cooper L, Galvan Achi J, et al. Synthesis, optimization, and structure-activity relationships of imidazo[1,2-a]pyrimidines as inhibitors of group-2 influenza A viruses [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 14104-14120.
- [79] Kadam RU, Wilson IA. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug arbidol [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114: 206-214.
- [80] Wright ZVF, Wu NC, Kadam RU, et al. Structure-based optimization and synthesis of antiviral drug arbidol analogues with significantly improved affinity to influenza hemagglutinin [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 3744-3748.
- [81] Li H, Wang S, Ma W, et al. Discovery of pentacyclic triterpenoid PROTACs as a class of effective hemagglutinin protein degraders [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 7154-7169.
- [82] Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11 [J]. *Trends Microbiol*, 2014, 22: 183-191.
- [83] Nie C, Stadtmüller M, Yang H, et al. Spiky nanostructures with geometry-matching topography for virus inhibition [J]. *Nano Lett*, 2020, 20: 5367-5375.
- [84] Nie C, Stadtmüller M, Parshad B, et al. Heteromultivalent topology-matched nanostructures as potent and broad-spectrum influenza A virus inhibitors [J]. *Sci Adv*, 2021, 7: eabd3803.