

靶向流感病毒RNA依赖的RNA聚合酶的小分子抑制剂研究进展

贾惠楠[#], 贾瑞芳[#], 张继伟, 江圆敏, 刘传峰, 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: 流感病毒严重威胁人类的生命健康。由于流感病毒固有的高变异性, 目前上市的抗流感病毒药物已出现临床耐药突变株。因此, 亟需开发具有新靶标、新机制的抗流感药物。RNA依赖的RNA聚合酶直接负责病毒RNA的转录和复制, 在病毒的生命周期中发挥关键作用, 是抗流感药物的重要靶标。本文精选近十年典型研究实例, 从药物化学角度总结了靶向流感病毒RNA依赖的RNA聚合酶抑制剂的研究进展, 以期为研发抗流感病毒药物提供参考。

关键词: 流感病毒; 抗病毒药物; RNA依赖的RNA聚合酶; 抑制剂; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)01-0043-18

Recent advances in small-molecule inhibitors targeting influenza virus RNA-dependent RNA polymerase

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

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

Abstract: Influenza virus causes serious threat to human life and health. Due to the inherent high variability of influenza virus, clinically resistant mutant strains of currently approved anti-influenza virus drugs have emerged. Therefore, it is urgent to develop antiviral drugs with new targets or mechanisms of action. RNA-dependent RNA polymerase is directly responsible for viral RNA transcription and replication, and plays key roles in the viral life cycle, which is considered an important target of anti-influenza drug design. From the point of view of medicinal chemistry, this review summarizes current advances in diverse small-molecule inhibitors targeting influenza virus RNA-dependent RNA polymerase, hoping to provide valuable reference for development of novel antiviral drugs.

Key words: influenza virus; antiviral drug; RNA-dependent RNA polymerase; inhibitor; drug design

流感是由流感病毒引起的严重呼吸道疾病, 分为季节性 and 散发性流感两种形式, 其在全球范围内造成了较高的发病率和死亡率, 以及重大的社会经济损失。例如, 世界卫生组织 (WHO) 统计数据显示, 到目前为止 2009 年 H1N1 型病毒株在全球造成的死亡人数约 20 万^[1,2]。

流感病毒属于正黏病毒科 (Orthomyxoviridae), 是一种单股负链 RNA 病毒, 可分为多种类型 (甲、乙、丙和丁型), 其中甲型流感病毒可以感染飞鸟、家禽和人类, 是引发流感大流行的主要病原体^[3,4]。

流感病毒的生命周期可分为吸附、内吞、融合、复制、翻译、装配、出芽和释放等环节^[5]。阻断其生命周期的任何一个过程, 均可以阻断流感病毒复制。目前已批准上市的抗流感病毒药物主要包括 M2 离子通道阻滞剂 [金刚烷胺 (1, amantadine) 和金刚乙胺 (2, rimantadine)]、神经氨酸酶 (neuraminidase, NA) 抑制

收稿日期: 2023-04-11; 修回日期: 2023-07-09.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173677); 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31).

[#]共同第一作者.

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

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0449

剂 [扎那米韦 (**3**, zanamivir)、奥司他韦 (**4**, oseltamivir phosphate)、帕拉米韦 (**5**, peramivir) 和拉尼娜米韦辛酸盐 (**6**, laninamivir octanoate)] 和帽依赖性核酸内切酶 (cap-dependent endonuclease) 抑制剂巴洛沙韦 (**7**, baloxavir marboxil, BXM) (图 1), 分别作用于病毒生命周期的融合、释放和转录与复制环节。其中 M2 离子通道阻滞剂只对甲型流感病毒有效, 由于其严重的耐药性和中枢神经系统不良反应, 美国疾病预防控制中心 (CDC) 不再建议使用此类药物治疗甲型流感^[6,7]; 而一线抗流感病毒药物奥司他韦也因耐药株的出现导致临床应用受到限制, 如 N1-H274Y 突变株^[8]; 巴洛沙韦作为第一个上市的核酸内切酶抑制剂, 抗甲型和乙型流感病毒活性最强, 但也出现了 I38T 等耐药突变株^[9]。流感病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp) 主要负责病毒的转录和复制, 在其生命周期中起着关键作用, 且在各种甲型和乙型流感病毒中均高度保守^[10]。特别是, 近年来流感病毒 RdRp 复合物的结构生物学研究取得了新进展, RdRp 已成为抗流感病毒药物研发的重要靶标。本文精选了近十年典型研究实例, 从药物化学的角度总结了靶向流感病毒 RdRp 抑制剂的研究进展。

1 流感病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶的结构和功能

RdRp 是一种异源三聚体, 由聚合酶酸性蛋白 (polymerase acidic protein, PA)、聚合酶碱性蛋白 1 (polymerase basic protein 1, PB1) 和聚合酶碱性蛋白 2 (polymerase basic protein 2, PB2) 通过非共价方式结合形成 (图 2), 参与病毒的转录和复制^[11]。由于流感病毒自身不能合成转录所必需的 5'帽引物, 所以需要夺取宿主细胞 RNA 的 5'帽结构, 即“抢帽” (cap-snatching)。

在这个过程中, PB2 的帽结合区域首先与宿主细胞 mRNA 的 5'帽状结构结合, 随后 PA 从帽状结构中切割 8~14 个核苷酸, 生成 5'帽引物。产生的引物片段作为病毒转录的引物在 PB1 的催化下启动转录过程。RdRp 的三个亚基高度保守, 抑制任一部分都可以达到抑制流感病毒复制的作用^[12,13]。根据不同的作用位点, 目前的 RdRp 抑制剂主要分为 PA 抑制剂、PB1 抑制剂、PB2 抑制剂、PA-PB1 和 PB1-PB2 蛋白-蛋白相互作用抑制剂 (protein-protein interaction inhibitors, PPIs)。

2 PA 抑制剂

2.1 巴洛沙韦及其衍生物

2018 年, 首个可口服的 PA 抑制剂巴洛沙韦 (**7**) 先后在日本和美国上市。其由日本盐野义制药公司和罗氏制药公司共同研发, 用于治疗甲型和乙型流感。巴洛沙韦作为前药, 经口服后转化为活性形式巴洛沙韦酸 (**8**, baloxavir acid, BXA, 图 3), 通过抑制抢帽过程阻断病毒 mRNA 合成, 从而阻止流感病毒复制发挥抗病毒作用^[14]。

由于 PA 内切酶与 HIV 整合酶同为金属酶, 日本盐野义制药公司采用“优势骨架再定位”策略, 将 HIV 整合酶抑制剂度鲁特韦 (**9**, dolutegravir) 的双金属结合药效团骨架, 即氨甲酰吡啶酮骨架 (carbamoyl pyridone bicycle, CAB) 转移到 PA 抑制剂的设计中^[15]。研究人员以含 CAB 骨架的化合物 **10** 为先导, 基于构效关系研究 (structure-activity relationship, SAR) 对其 C (N)-1、N-3 和 C-7 位进行结构修饰合成了一系列氨甲酰吡啶酮衍生物 (图 4)。其中化合物 **11** 对 PA 的抑制活性 ($IC_{50} = 0.286 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远高于 **10** ($IC_{50} = 68.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对甲型 H1N1 ($EC_{50} = 0.0816 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和乙型 ($EC_{50} =$

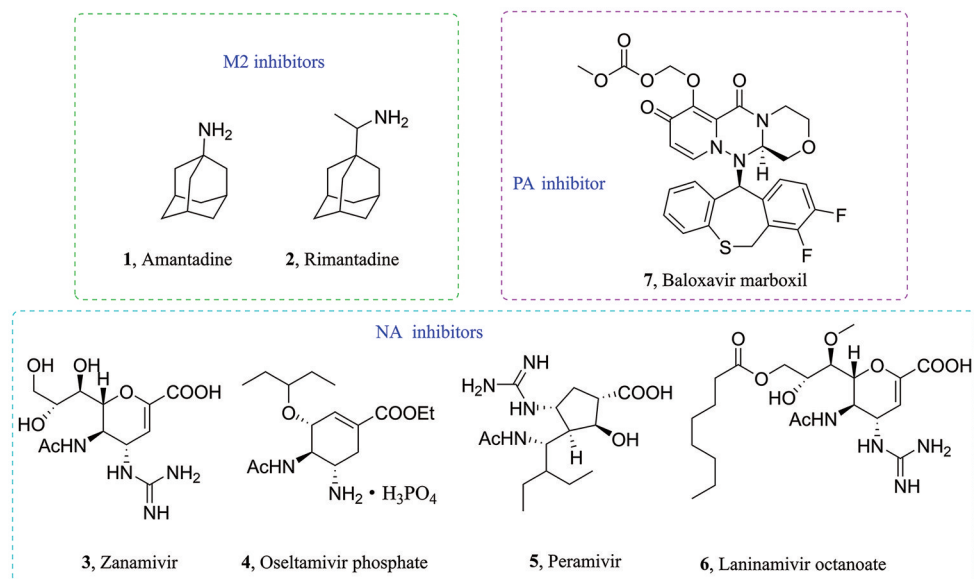


Figure 1 Structures of approved anti-influenza virus drugs

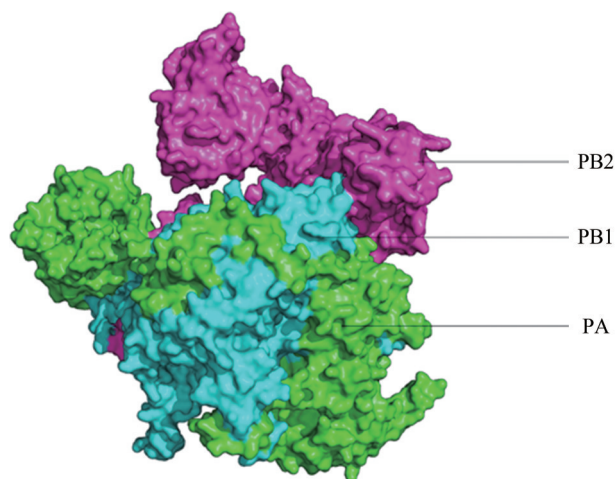


Figure 2 The structure diagram of influenza A virus RdRp (PDB code: 4WSB)

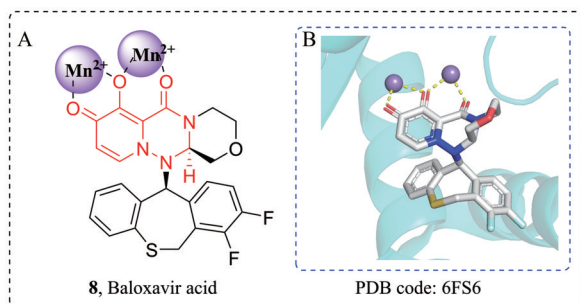


Figure 3 The structure of baloxavir acid and the complex structure of baloxavir acid binding with H1N1 endonuclease. A: The structure of baloxavir acid; B: The complex structure of baloxavir acid binding with H1N1 endonuclease

$0.124\ 3\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 流感病毒均有强效抑制活性, 且细胞毒性低 ($\text{CC}_{50} > 25\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDBK 细胞)。此外, **11** 在小鼠体内清除率为 $10.9\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 显示出较好的药代动力学性质^[16]。随后, 研究人员在 **11** 的 *N*-1 位引入疏水性取代基, 并修饰其 *N*-3 位以改善药代动力学性质, 设计合成了一系列二氢二苯并噻庚环类化合物。其中化合物 **12** 抑制 PA 的活性 ($\text{IC}_{50} = 5.57\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 **11** 的 51 倍, 抗 H1N1 流感病毒活性 ($\text{EC}_{50} = 4.28\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 **11** 的 19 倍, 同时小鼠体内清除率达到了 $11.0\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, 与 **11** 相当。在感染甲型流感病毒的小鼠模型中, 与磷酸奥司他韦 (以临床剂量 $5\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服给药) 相比, **12** 以 $0.4\ \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的口服剂量使小鼠肺部病毒滴度减少了十分之一^[17]。通过骨架跃迁策略 (scaffold hopping) 对 **12** 进行多样性的结构修饰得到了巴洛沙韦酸, 随后采用前药策略优化得到可口服的巴洛沙韦^[18, 19]。

从巴洛沙韦酸与 PA 靶标复合物晶体结构 (图 3) 可以看出, CAB 骨架中的两个羰基和一个羟基与 PA 内切酶活性位点上的两个 Mn^{2+} 配位, 而二氢二苯并噻庚

环则通过疏水作用与 PA 内切酶活性位点的疏水口袋结合。巴洛沙韦对包括奥司他韦耐药株在内的甲型和乙型流感病毒均有效, 单次口服一片就可减轻流感症状, 而奥司他韦需要服用五天^[9]。但是在体外活性表征中 PA/I38T 突变株的出现导致巴洛沙韦抗甲、乙型流感病毒活性明显降低 (EC_{50} 值分别升高 30~50 倍和 7 倍); 在临床 II 期和 III 期试验中, 接受巴洛沙韦治疗的患者有 2.2%~9.7% 体内也出现了 I38T 突变株, 使得巴洛沙韦对流感病毒的敏感性大大降低^[20, 21]。

2020 年, Ivashchenko 等^[22] 针对巴洛沙韦进行优化, 报道了与巴洛沙韦的二氢二苯并噻庚环刚性基团不同的非刚性二苯甲基类化合物 (图 5)。分子模拟显示这类化合物与甲型流感病毒 (H1N1pdm09) PA 内切酶活性位点的结合模式与巴洛沙韦酸相似, 金属离子螯合基团与活性中心的两个 Mn^{2+} 结合, 二苯甲基疏水基团与活性位点上由残基 Ala20、Tyr24、Lys34 和 Ile38 形成的疏水口袋作用。其中化合物 **13** 在细胞水平抗 H1N1pdm09 流感病毒活性 ($\text{EC}_{50} = 18.5\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 虽低于巴洛沙韦酸 ($\text{EC}_{50} = 0.9\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但其细胞毒性低 ($\text{CC}_{50} > 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MRC5 细胞) 且在 HepG2 细胞中未见有线粒体毒性。由于化合物 **13** 的金属螯合骨架与巴洛沙韦酸相同, 研究人员同样采用前药策略对 **13** 进行修饰, 得到化合物 **14**, **14** 经口服后在体内水解转化为其活性形式 **13**。**13** 和 **14** 在小鼠体内口服生物利用度分别为 38.2% 和 62.1%, 高于巴洛沙韦酸 (3%) 和巴洛沙韦 (26.9%)。

Ivashchenko 等^[22] 所报道的非刚性二苯甲基类化合物抗病毒活性仍低于巴洛沙韦酸, 因此 Tang 等^[23] 认为巴洛沙韦的抗病毒活性依然由其刚性结构二氢二苯并噻庚环决定。随后他们用二苯并环庚烯环取代巴洛沙韦的二氢二苯并噻庚环合成了一系列刚性更强的化合物 (图 5), 其中化合物 **15** 在细胞水平抗 H1N1 流感病毒的活性 ($\text{EC}_{50} = 0.42\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显高于巴洛沙韦酸 ($\text{EC}_{50} = 0.59\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。qRT-PCR 实验显示 **15** ($3\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 H1N1 流感病毒 M2 RNA 的抑制率为 88.5%, 稍弱于巴洛沙韦酸 (98.3%); 间接免疫荧光实验显示 **15** ($3\ \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在 MDCK 细胞中对 H1N1 流感病毒 M2 蛋白表达的抑制略弱于巴洛沙韦酸。且化合物 **15** 的选择性 (SI = 449 762) 远高于巴洛沙韦酸 (SI = 16 220), 在小鼠体内的口服生物利用度 ($F = 22.9\%$) 也高于巴洛沙韦酸 (4.2%) 和巴洛沙韦 (14.9%)。同时 **15** 只有一个手性中心, 大大降低了合成和纯化难度^[19]。

2.2 羟基吡啶 (嘧啶) 酮类化合物

2013 年, Sagong 等^[24] 利用 X-射线晶体学 (X-ray crystallography) 方法对甲型流感病毒 PA 内切酶进行

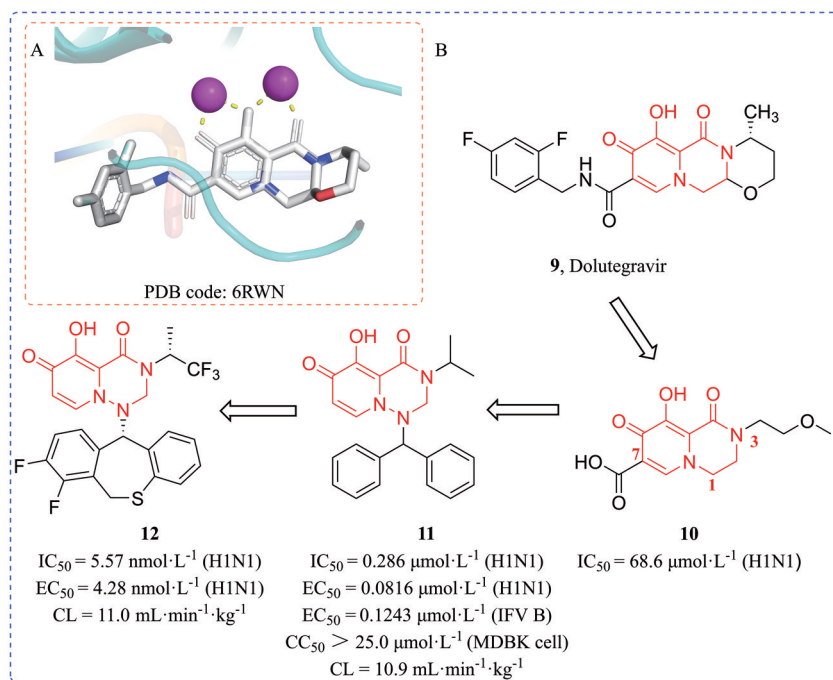


Figure 4 The complex structure of dolutegravir binding with HIV integrase and the discovery process of baloxavir. A: The complex structure of dolutegravir binding with HIV integrase; B: The discovery process of baloxavir

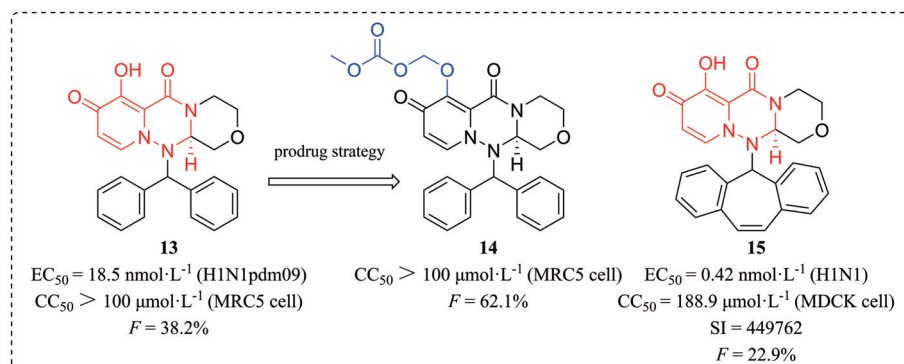


Figure 5 Structures of baloxavir derivatives 13–15

片段筛选,发现化合物5-氯-3-羟基吡啶-2(1*H*)-酮能够作为PA活性位点的双金属螯合配体,因此该课题组开发了3-羟基喹啉-2(1*H*)-酮系列PA抑制剂(图6)。SAR研究发现,6位和7位对氟苯基取代的化合物**16**和**17**对PA的抑制活性较好, IC_{50} 值均为 $0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。化合物**17**与PA靶标复合物共晶结构显示(图6),其3-羟基吡啶-2(1*H*)-酮结构中的羰基和羟基与PA活性中心的两个 Mn^{2+} 螯合,质子化的氮原子也通过水分子介导与 Mn^{2+} 螯合,且羟基与Lys134上的主链氨基形成氢键;喹啉环以 50° 角向His41倾斜与之形成 π - π 堆积作用,7-对氟苯基插入由Ala20、Met21、Tyr24、Asp26、Lys34和Ile38形成的口袋,与Ala20、Tyr24和Ile38形成疏水作用。

在后续的研究中,该课题组又合成了苯基取代的5-羟基嘧啶-4(3*H*)-酮类化合物(图7),其中4-(四氮唑)

苯衍生物**18**抑制PA的活性较好($IC_{50} = 0.15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),而3-(四氮唑)苯衍生物**19**活性明显降低($IC_{50} = 0.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$);但3-(氰基)苯衍生物**20**的抑制活性($IC_{50} = 0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)是4-(氰基)苯衍生物**21**($IC_{50} = 0.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的2倍^[25]。由此可以看出化合物对PA的抑制活性受取代基基团的种类及位置共同影响。

2016年, Miyagawa等^[26]在其螯合物库中进行筛选发现了对PA有抑制活性的4-吡啶酮酸类化合物**22**($IC_{50} = 3.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。随后,为进一步丰富构效关系,他们针对**22**的螯合部位与亲脂性基团之间的距离进行优化合成了一系列4-吡啶酮酸衍生物(图8),其中化合物**23**对PA抑制活性较好($IC_{50} = 0.714 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),但分子模拟显示**23**只能占据PA活性中心的一个疏水口袋(pocket 1)。为了进一步提高化合物的活性,他

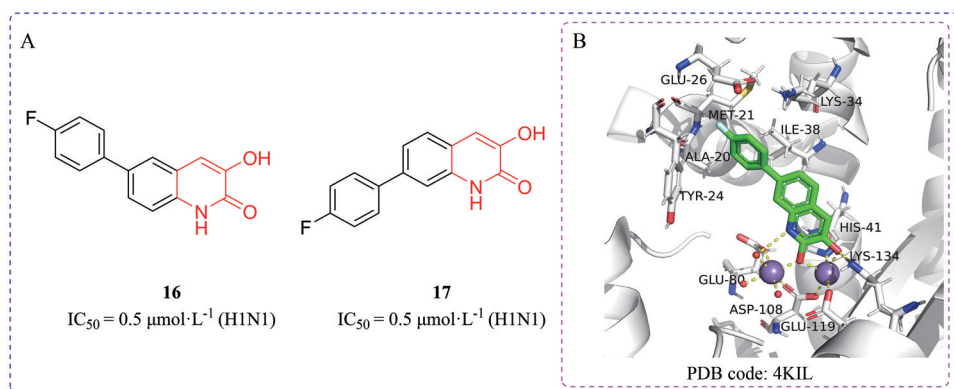


Figure 6 Structures of hydroxypyridone derivatives **16** and **17** and the complex structure of **17** binding with H1N1 endonuclease. A: Structures of hydroxypyridone derivatives **16** and **17**; B: The complex structure of **17** binding with H1N1 endonuclease

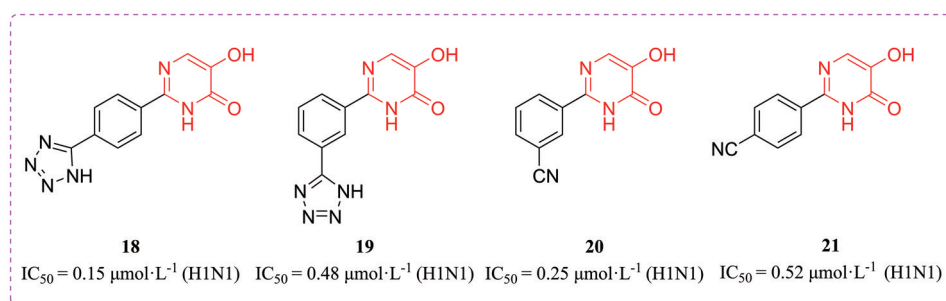


Figure 7 Structures of hydroxypyrimidinone derivatives **18**–**21**

们尝试引入能够占据 pocket 2 的亲脂性基团, 通过对 4-吡啶酮酸衍生物的构效关系探讨, 发现含环戊烷基团的化合物 **24** 对 PA 的抑制活性较 **23** 显著提高 ($IC_{50} = 5.12 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 分子对接显示其能同时占据 pocket 1 和 pocket 2。然而 **24** 的细胞活性较低 ($EC_{50} = 201 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 可能与其脂溶性低和透膜性差有关 ($\text{Log } P$ 计算值为 0.82)。

2016 年, Credille 等^[27] 采用高通量筛选 (high-throughput screening, HTS) 及基于片段的药物发现策略 (fragment-based drug discovery, FBDD), 得到了对 PA 有抑制活性的焦袂康酸 (**25**, pyromeconic acid, $IC_{50} = 22.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 9) 及其相似片段, 通过 SAR 研究及片段生长策略 (fragment growing) 对 **25** 进行修饰,

最终得到了活性明显提升的羟基吡啶酮类化合物 **26**, 其抑制 PA 的 IC_{50} 值为 $14 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 同时具有细胞水平的抗 H1N1 活性 ($EC_{50} = 2.1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及较低的细胞毒性 ($CC_{50} = 280 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。此外, 该课题组基于 SAR 研究对前期得到的结构片段进行优化, 得到了吡喃酮类 PA 抑制剂 **27** ($IC_{50} = 43 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。基于金属离子结合药效团的电子效应, 他们利用吡啶酮取代 **27** 中的吡喃酮得到了化合物 **28**。与吡喃酮结构相比, 吡啶酮芳香性增加, 其给电子体氧原子的电子云密度增大, 碱性增强。作为 PA 活性中心金属离子的配体时, 吡啶酮类结构与硬路易斯酸性金属的配位更强, 因此 **28** 对 PA 的抑制活性 ($IC_{50} = 17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 **27** 的 2.5 倍。同时 **28** 在不同浓度下 ($500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

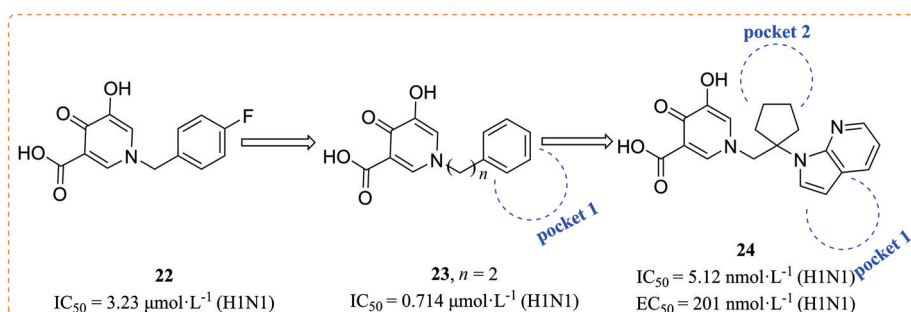


Figure 8 Structures of pyridone acid derivatives **22**–**24**

对 PA 内切酶和其他三种双核金属酶 [人精氨酸酶 1 (ARG1)、人蛋氨酸氨基肽酶 2 (METAP2) 和 NDM-1] 的抑制率分别为 97%、24%、0 和 6%，选择性好^[28,29]。

以 **28** 作为基本结构片段, 该课题组通过 FBDD 策略及 SAR 研究设计合成了一系列吡啶酮类化合物 (图 9)。其中化合物 **29**、**30** 和 **31** 差示扫描荧光 (differential scanning fluorometry, DSF) 实验得到的熔融值变化 ΔT_M 与配体浓度和配体结合亲和力成正比。由于部分化合物 IC_{50} 值低于核酸酶实验测定中所用酶的最小可用浓度, 因此根据 ΔT_M 与测定的已知化合物 pIC_{50} 值之间的线性关系, 基于 ΔT_M 值外推得 **29**、**30** 和 **31** 的 IC_{50} 值分别为 120、110 和 47 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对 PA 的抑制活性均高于之前报道的抑制剂, 且 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下对细胞活力无影响, 毒性低。但是 **30** 和 **31** 细胞水平抗 H1N1 病毒活性相对较低 (EC_{50} 值分别为 21.3 和 11.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 可能与化合物中的三个电离基团导致其透膜性差、溶解度低等因素有关。化合物 **29** 与 PA 复合物共晶结构 (图 9) 显示, **29** 吡啶酮骨架中的两个羟基和一个羧基与 PA 内切酶活性中心的两个 Mn^{2+} 螯合, 同时通过 2' 位烷基取代基与活性位点 Ile38 附近的氨基酸残基形成

范德华力, 4' 环状取代基则与 Lys34 和 Arg124 形成氢键 (或水介导的氢键)^[30]。

2.3 邻苯二酚衍生物

2016 年, 有研究^[31-34]基于前人报道的对 HIV 及流感病毒具有良好生物活性的 *N*-酰脲类金属螯合配体, 设计合成了一系列 *N*-酰脲类化合物 (图 10), 其中含三羟基苯基的化合物 **32** 对 PA 具有中等程度的抑制活性 ($IC_{50} = 8.7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 细胞水平抗病毒活性较好 ($EC_{90} = 3.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。化合物 **32** 与 PA 复合物共晶结构显示 (图 10), **32** 的三羟基苯甲酰胺部分与 PA 活性中心的两个 Mn^{2+} 螯合; 三羟基苯基与 Tyr24 的芳香环形成 π - π 相互作用, 其中两个羟基与 Glu26 和 Lys34 形成氢键。

Pala 等^[35,36]根据前期报道的碳酸酐酶抑制剂的金属螯合特征, 对包含 500 万个具有金属螯合功能化合物的数据库进行虚拟筛选 (structure-based virtual screening), 同时测定其对 PA 的抑制活性, 得到了活性较好的二羟基吡啶类化合物 (图 11) **33** ($IC_{50} = 0.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 **34** ($IC_{50} = 7.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。同时 **33** ($EC_{90} = 3.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 **34** ($EC_{90} = 6.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在细胞水平的抗病毒活

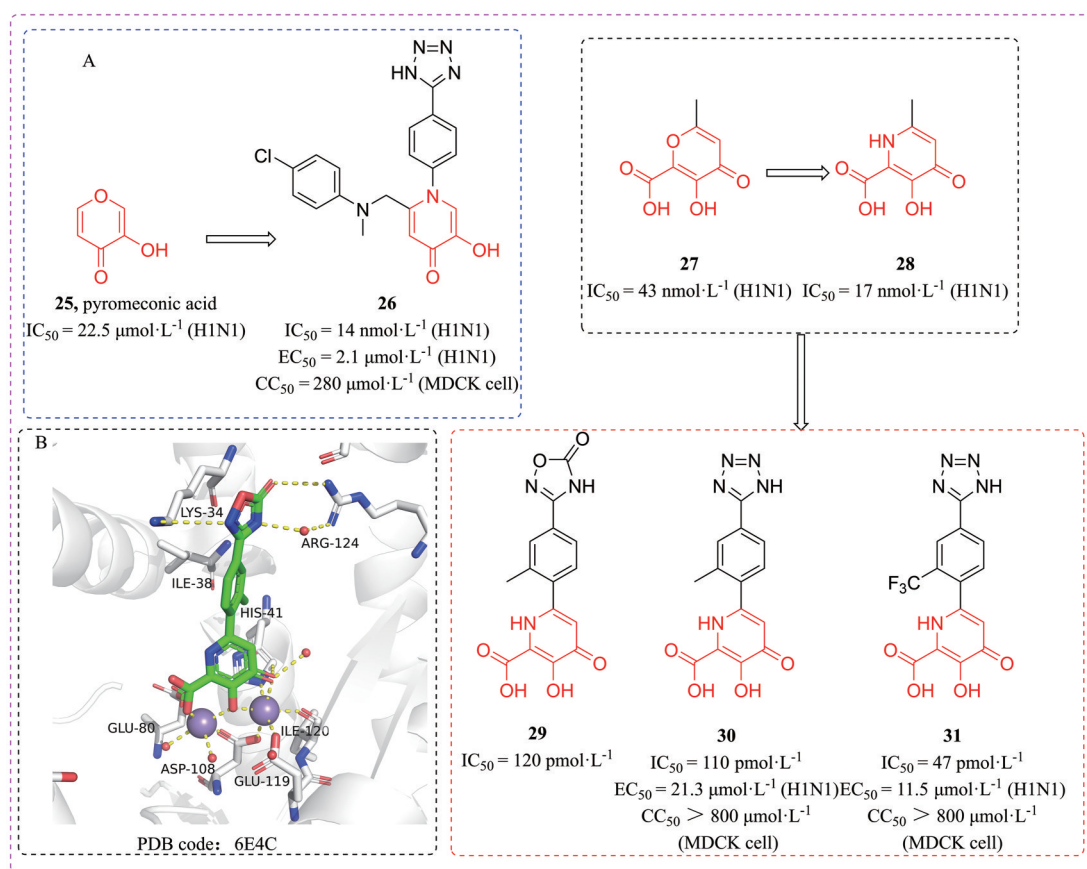


Figure 9 Structures of hydroxypyranone and hydroxypyrimidinone derivatives **25**–**31** and the complex structure of compound **29** binding with H1N1 endonuclease. A: Structures of hydroxypyranone and hydroxypyrimidinone derivatives **25**–**31**; B: The complex structure of compound **29** binding with H1N1 endonuclease

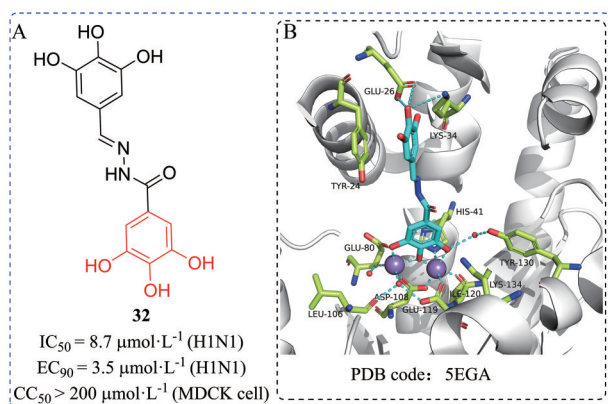


Figure 10 The structure of *N*-acylhydrazone derivative **32** and the complex structure of **32** binding with H1N1 endonuclease. A: The structure of *N*-acylhydrazone derivative **32**; B: The complex structure of **32** binding with H1N1 endonuclease

性高于广谱抗病毒药物利巴韦林 (ribavirin, EC₉₀ = 6.8 μmol·L⁻¹), 且细胞毒性低。分子对接显示, **33**和**34**二羟基吲哚基团中两个羟基与PA活性中心的两个Mn²⁺螯合; **33**的邻苯二酚基团和**34**的第二个二羟基吲哚环插入由Val122、Arg124和Tyr130形成的口袋。

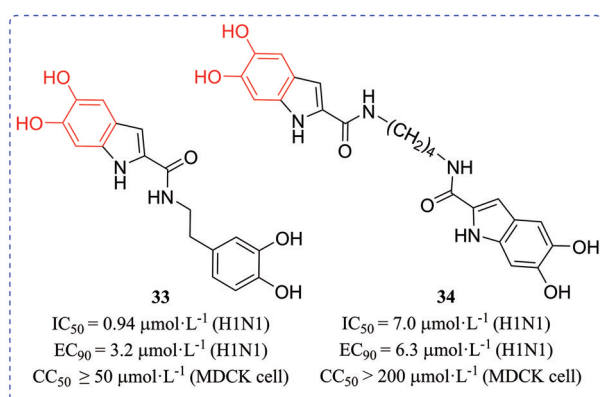


Figure 11 Structures of dihydroxy indole derivatives **33** and **34**

2018年, Ferro等^[37]通过对小分子化合物库进行虚拟筛选得到了含有苯磺酰胺的邻苯二酚类PA抑制剂**35** (IC₅₀ = 12 μmol·L⁻¹, 图12)。分子对接显示, **35**苯环上的两个羟基与PA活性位点上的两个Mn²⁺螯合, 对磺

酰胺苯甲酰胺片段占据由Leu16、Lys19、Ala20、Glu23、Glu80、Gly81、Arg82和Asp83包围形成的一个口袋, 同时磺酰胺基团分别与Glu23和Lys19形成氢键。

2020年, 华南农业大学与南方医科大学研究团队^[38]对含邻苯二酚基团的多巴胺进行SAR研究, 设计合成了一系列多巴胺衍生物及其构象限制的1,2,3,4-四氢异喹啉-6,7-二醇类似物(图12)。细胞水平的抗流感病毒活性显示, 化合物**36** (EC₅₀ = 2.46 μmol·L⁻¹)和**37** (EC₅₀ = 2.58 μmol·L⁻¹)具有比帕拉米韦(**5**, EC₅₀ = 5.26 μmol·L⁻¹)更强的抗病毒活性和更高的选择性(**36**, SI > 81.3; **37**, SI = 58.5; **5**, SI > 38.0), 且细胞毒性低(MDCK细胞: **36**, CC₅₀ > 200 μmol·L⁻¹; **37**, CC₅₀ = 150.85 μmol·L⁻¹; **5**, CC₅₀ > 200 μmol·L⁻¹)。但化合物**36** (IC₅₀ = 312.36 nmol·L⁻¹)和**37** (IC₅₀ = 489.39 nmol·L⁻¹)对PA的抑制活性低于巴洛沙韦酸 (IC₅₀ = 1.34 nmol·L⁻¹)。分子对接显示, **36**的多巴胺片段和**37**的1,2,3,4-四氢异喹啉-6,7-二醇片段均可与PA活性位点的Mn²⁺螯合并与关键残基His41形成疏水作用, 但**37**的螯合片段由于刚性太强不能同时与两个Mn²⁺螯合。**36**的3,4-二羟基苯乙酰胺片段中的芳环与Tyr24形成疏水作用, 对位羟基与Glu26形成氢键; **37**的另一个邻苯二酚基团与Ser194形成双重氢键, 芳环与Lys34和Ala134形成多重疏水作用。尽管**37**的金属-配体相互作用强度略低于**36**, 但较多的疏水作用和氢键可能是使其保持与**36**相似活性的原因。另外**36**和**37**都不与Ile38产生作用力, 因此可以推测I38T突变可能不会改变其对PA内切酶的亲和力。

2022年, 该团队^[39]报道了针对天然PA抑制剂(**38**, *D,L*-溴氨酸劳丹素, LDS)的结构优化, 其对PA的抑制活性较好 (IC₅₀ = 1.88 μmol·L⁻¹), 但在20 μmol·L⁻¹浓度下未显示抗病毒活性。分子对接显示, 化合物**38**C-1位的邻苯二酚基团与氨基酸残基Val122和Arg124形成氢键而占据pocket 4, N-2位取代基能与Lys34作用, C-3位有向pocket 3延伸的空间, 引入疏水性取代基可能会使其与pocket 3发生相互作用。基于分子对接信息, 该团队采用多位点结合策略 (multi-site binding

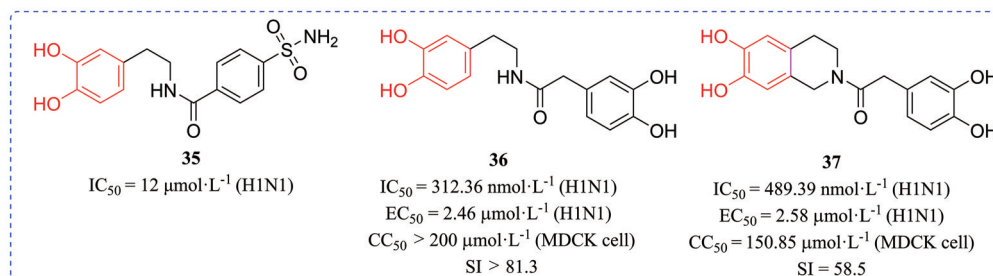


Figure 12 Structures of 1,2-dihydroxybenzene derivatives **35**–**37**

strategy)、基于结构的药物设计 (structure-based drug design, SBDD) 策略及 SAR 研究设计合成了一系列四氢异喹啉衍生物 (图 13), 其中含 2-氯苯基乙酸酯结构的化合物 **39** 对 PA 的抑制活性 ($IC_{50} = 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较 **38** 提高了近 6 倍, 细胞水平抗 H1N1 流感病毒活性明显提高 ($EC_{50} = 4.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。分子对接显示, **39** C-1 位的芳香取代基同 **38** 一样与 pocket 4 结合, 且与 Ala37 形成 π - π 堆积作用, 邻苯二酚基团与 Val122 和 Arg124 形成氢键; N-2 位羰基氧与 Lys34 形成了一个额外的强氢键; 而 C-3 位的邻氯苯基由于体积太大未能与 pocket 3 形成疏水作用, 而是插入由 Ala20、Met21 和 Lys19 形成的另一个亲脂性口袋。

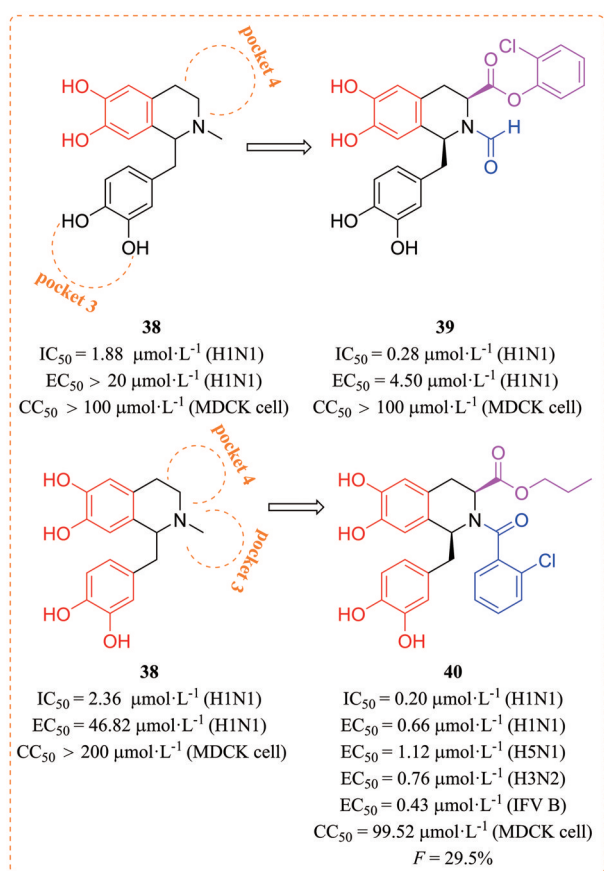


Figure 13 Structures of benzyltetrahydroisoquinoline derivatives **38**–**40**

该研究团队^[40]对化合物 **38** 重新进行了活性评价 ($IC_{50} = 2.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50} = 46.82 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞), 同样采用多位点结合策略、SBDD 策略及 SAR 研究对其进行修饰, 发现在其 N-2 位引入氯代苯甲酰基团以及 C-3 位引入羧酸酯基得到的四氢异喹啉衍生物对 PA 的抑制活性较好, 其中化合物 **40** (图 13) 对 PA 的抑制活性 ($IC_{50} = 0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)

是 **38** 的近 12 倍; 细胞水平抗 H1N1 流感病毒活性 ($EC_{50} = 0.66 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较 **38** 提高了近 70 倍, 同时具有广谱抗流感病毒活性 (抗 H5N1、H3N2 和乙型流感病毒的 EC_{50} 值分别为 1.12 、 0.76 和 $0.43 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} = 99.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。微型复制子试验显示, I38T 突变株不影响 **40** 对流感病毒的敏感性。分子对接显示, **40** 的四氢异喹啉环和 3,4-二羟基苯基上的两个羟基分别与 PA 活性位点的两个 Mn^{2+} 螯合, N-芳香酰基侧链定向插入 pocket 4, C-3 位正丙基占据 pocket 3, 并与氨基酸残基 Met21 和 Lys34 形成疏水作用。初步成药性评价显示, **40** 在小鼠体内具有较高的代谢稳定性和良好的药代动力学性质 (以 $15 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量腹腔注射, 吸收迅速 ($t_{\text{max}} = 0.45 \text{h}$), 且生物利用度高 ($F = 29.5\%$)). 动物水平的抗病毒活性显示, 以 $30 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量对小鼠腹腔注射给药, **40** 与帕拉米韦 ($10 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) 表现出相当的抗 H1N1 毒株活性。

2.4 基于 PROTAC 策略的 PA 降解剂

2001 年, Crews 团队^[41,42]率先提出了蛋白降解靶向嵌合体 (proteolysis targeting chimera, PROTAC) 的概念。PROTAC 分子由靶蛋白配体和 E3 泛素连接酶配体通过中间连接体 (linker) 连接而成, 利用泛素-蛋白酶体系统诱导靶向蛋白质降解。

近期, 岑山课题组^[43]发现植物内生真菌曲霉代谢物 APL-16-5 (**41**, 图 14) 对甲型 ($EC_{50} = 0.28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和乙型 ($EC_{50} = 1.22 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 流感病毒均有活性, 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。对化合物 **41** 抗病毒机制进行探究发现, 其同时与 E3 连接酶 TRIM25 和 PA 结合, 使 TRIM25 泛素化 PA, 随后在蛋白酶体中降解 PA, 这种作用模式符合 PROTAC 分子作用机制。PA 作为流感病毒 RdRp 复合物的关键亚基, 它的降解破坏了病毒 RNA 的合成, 从而抑制了流感病毒的复制。

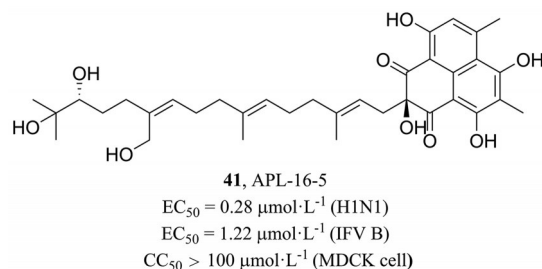


Figure 14 The structure of compound APL-16-5

3 PB1 抑制剂

法匹拉韦 (**42**, favipiravir, T-705, 图 15) 是 2002 年首次被报道的核苷酸类似物, 在日本上市用于对神经

氨酸酶抑制剂耐药的大流行性流感病毒。其作为前药在细胞酶作用下转化为三磷酸活性形式, 该活性形式作为鸟嘌呤三磷酸酯 (GTP) 的竞争性抑制剂被 RdRp 错误识别用于病毒 RNA 合成, 最终导致病毒 RNA 合成被抑制。法匹拉韦显示出广谱抗流感病毒活性 (EC_{50} 值为 $0.19 \sim 22.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 包括高致病性甲型流感病毒 (H5N1 和 H7N9) 及对奥司他韦耐药的毒株, 细胞毒性低 ($CC_{50} > 1\ 000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞), 且与奥司他韦显示协同作用^[44]。与法匹拉韦不同, 广谱抗病毒药物利巴韦林 (**43**, ribavirin) 主要通过抑制单磷酸脱氢酶 (IMPDH) 使酶催化生成的 GTP 减少而干扰病毒 RNA 合成, 其抗病毒活性较弱 (EC_{50} 值为 $9.4 \sim 22.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 590 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[45]。

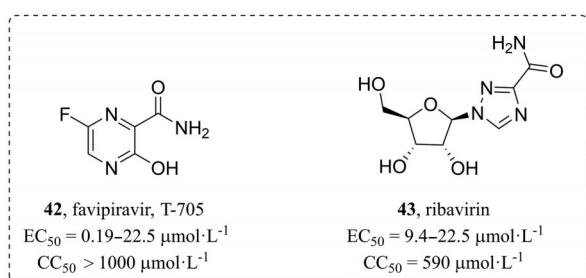


Figure 15 Structures of favipiravir and ribavirin

Lin 等^[46]基于前人对核苷类抗病毒药物的研究, 采用分子杂合策略将 2'-脱氧-2'-氟-2'-C-甲基核糖基和 6-甲基-7-脱氮杂嘌呤碱基整合成一个新的 6-甲基-7-脱氮嘌呤核苷骨架 (**44**, 图 16)。SAR 研究发现, 在其 C-7 位引入芳杂环有利于提高化合物活性。其中含乙烯基吡啶基团的化合物 **45** 抗甲型流感病毒活性 (H1N1, $EC_{50} = 5.88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; H3N2, $EC_{50} = 6.95 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较好, 优于利巴韦林 (H1N1, $EC_{50} = 10.92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; H3N2, $EC_{50} = 11.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。

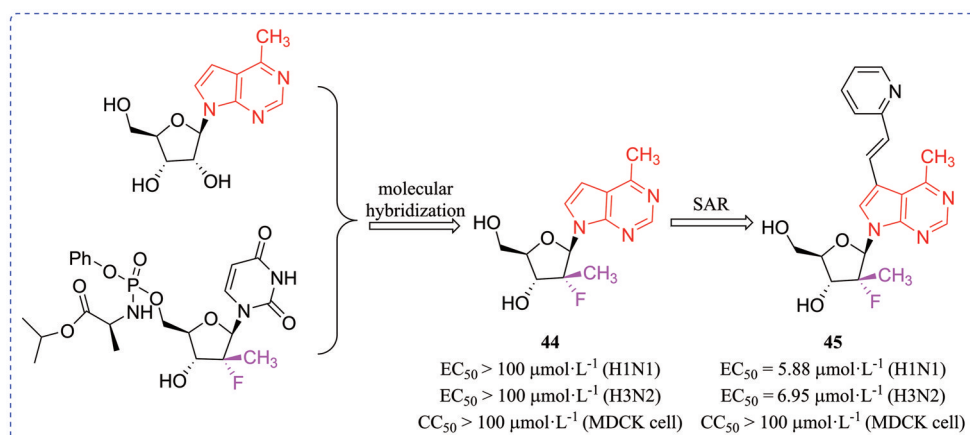


Figure 16 Structures of purine nucleoside derivatives **44** and **45**

4 PB2 抑制剂

2014 年, Clark 等^[47]报道的 PB2 抑制剂匹莫地韦 (**46**, pimodivir, VX-787, 图 17) 对甲型流感病毒具有强抑制活性 (EC_{50} 值在 $0.15 \sim 2.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 之间), 包括对金刚烷胺和奥司他韦耐药的毒株。VX-787 与 PB2 复合物共晶结构 (图 17) 显示, 其氮杂吡啶环与 PB2 帽结合域的活性口袋上的 Lys376 和 Glu361 形成氢键, 同时与 His357 和 Phe404 形成 π - π 堆积作用。嘧啶环与 Phe323 及环己基与 Phe325 之间也分别存在 π - π 堆积作用; 羧基分别与 His357 的侧链氨基、Gln406 主链氨基及 Arg355 的主链羰基形成水分子介导的氢键。然而在临床 III 期试验中, 匹莫地韦因药物代谢和耐药性问题被终止研发^[48]。

由 VX-787 与 PB2 复合物共晶结构可知, 嘧啶环 C-5 位置附近还未与 PB2 帽结合域活性口袋形成相互作用, 因此, Xiong 等^[49]分别对 VX-787 的 C-4 和 C-5 (系列 1) 及 C-5 和 C-6 位 (系列 2) 进行成环修饰以增强分子刚性, 增加其与活性口袋的相互作用, 设计合成了两个系列的化合物, 然而系列 1 化合物的抗病毒活性并未超过 VX-787。根据更新的 VX-787 与 PB2 复合物晶体结构 (图 18) 发现, VX-787 C-4 位连接的 NH 与 Val511 主链形成了关键氢键, 成环后氢键消失导致系列 1 化合物活性降低。该课题组将系列 2 化合物与 PB2 帽结合域重新进行对接, 结合 SAR 研究, 获得了抗病毒活性强于 VX-787 ($EC_{50} = 0.6 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 12 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (MDCK 细胞), $CL = 30.9 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $AUC = 13.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$) 的二氢噻吩并嘧啶环类化合物 **47** ($EC_{50} = 0.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 4.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞, 图 18), 同时其药代动力学性质明显改善 ($CL = 13.8 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $AUC = 19.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)。针对 **47** 氮杂吡啶骨架 2' 位易被醛氧化酶代谢为羟基产生肝肾毒性的问题, 将其 2' 位 C 替换为 N 后得到抗病毒活性

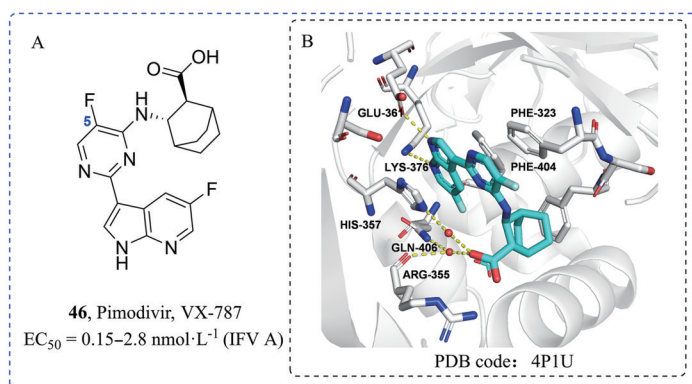


Figure 17 The structure of pimodivir and the complex structure of pimodivir bound to the PB2 cap-binding domain. A: The structure of pimodivir. B: The complex structure of pimodivir bound to the PB2 cap-binding domain

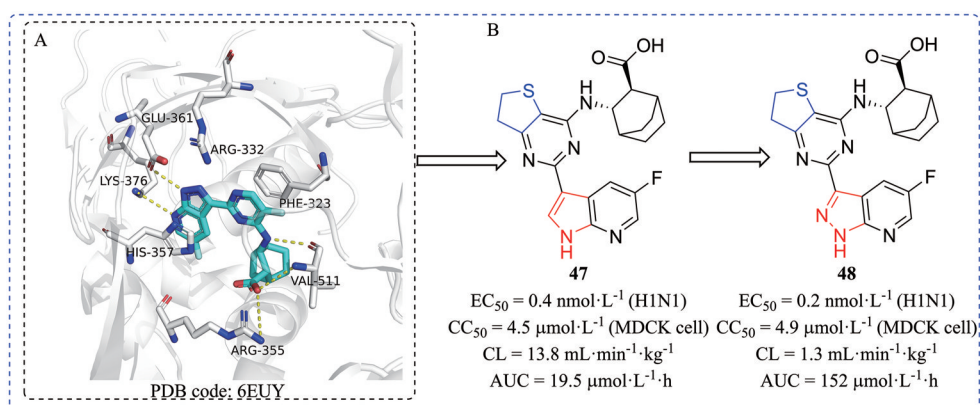


Figure 18 The complex structure of pimodivir bound to the PB2 cap-binding domain and structures of pimodivir derivatives **47** and **48**. A: The complex structure of pimodivir bound to the PB2 cap-binding domain; B: Structures of pimodivir derivatives **47** and **48**

和药代动力学性质均显著提升的化合物 **48** ($EC_{50} = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 4.9 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (MDCK 细胞), $CL = 1.3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$, $AUC = 152 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$)。分子对接显示, 与 VX-787 相比, **48** 的二氢噻吩并嘧啶环增强了与 Phe323 和 Leu512 的疏水作用以及与 Asn510 的范德华力; 吡唑-嘧啶环上的两个氮原子同时与 Arg332 形成额外氢键。

Yang 等^[50]用吡嗪酮环取代 VX-787 的嘧啶环得到了新的 PB2 抑制剂 **49** (图 19), 表面等离子体共振 (surface plasmon resonance, SPR) 实验测得其与 PB2 具有较好结合活性 ($K_d = 0.27 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。随后对 **49** 的吡嗪酮环 2 位取代基进行结构优化合成了 30 个新的化合物。其中 2-乙基吡嗪酮环类化合物 **50** 与 PB2 的结合活性 ($K_d = 0.11 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 与 VX-787 相当 ($K_d = 0.07 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但其抗流感病毒活性 ($EC_{50} = 1.025 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 VX-787 ($EC_{50} = 0.002 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

Zhang 等^[51]针对 VX-787 的三部分分别进行结构修饰, 构建了一个小型的 PB2 抑制剂库, 活性结果发现, 噻吩并嘧啶衍生物 (图 20) **51** ($EC_{50} = 6.5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)

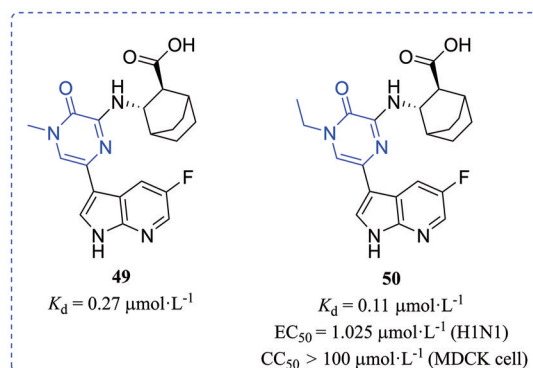


Figure 19 Structures of pimodivir derivatives **49** and **50**

和 **52** ($EC_{50} = 17 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的抗流感病毒活性较好, 但未超过 VX-787 ($EC_{50} = 4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 20 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, A549 细胞) 且细胞毒性增大 (A549 细胞: **51**, $CC_{50} = 14.5 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **52**, $CC_{50} = 14.7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

McGowan 等^[52]用 7-氟取代咪唑环对 VX-787 的 7-氮杂咪唑环进行生物电子等排置换 (bioisosterism) 设计合成了一系列咪唑类化合物 (图 20), 其中化合物 **53** 对 PB2 的抑制活性较好 ($IC_{50} = 0.12 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 抗 H1N1 流

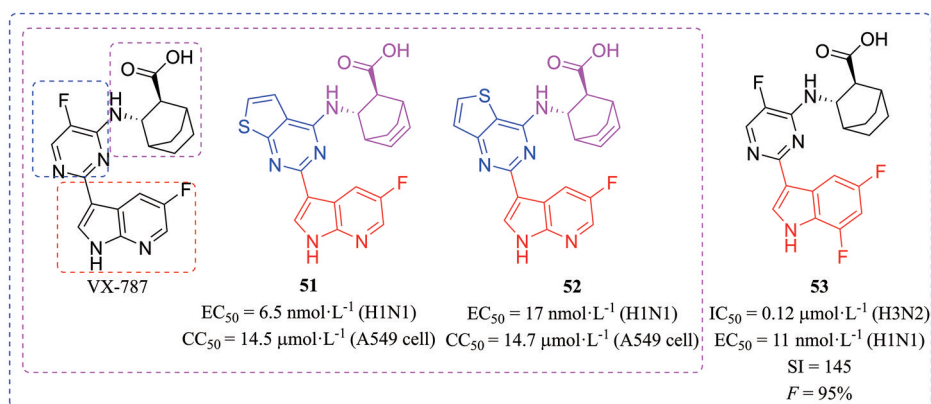


Figure 20 Structures of pimodivir derivatives 51–53

感病毒活性突出 ($EC_{50} = 11 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且选择性高 ($SI = 145$)。以 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量对小鼠口服给药, **53** 在 0.5~2 h 内迅速吸收, 口服生物利用度高 ($F = 95\%$) 且在人肝细胞中未显示醛氧化酶代谢。

5 蛋白-蛋白相互作用抑制剂

RdRp 的 PA、PB1 和 PB2 三个亚基通过非共价方式结合, 三者之间的蛋白-蛋白相互作用对流感病毒的转录和复制至关重要, 阻断亚基间相互作用的 RdRp 抑制剂被称为蛋白-蛋白相互作用抑制剂 (protein-protein interaction inhibitors, PPIs), 目前的研究热点主要是 PA-PB1 和 PB1-PB2 相互作用抑制剂。

5.1 PA-PB1 相互作用抑制剂

5.1.1 环庚噻吩-3-甲酰胺 (cHTC) 衍生物 2012年, 意大利帕多瓦大学 Arianna 教授团队^[53]从含三百万个分子的 ZINC 化合物库中进行虚拟筛选, 最终发现了 32 个 PA-PB1 相互作用抑制剂, 代表化合物为环庚噻吩-3-甲酰胺 (cHTC) 衍生物 **54** ($IC_{50} = 90.7 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 21), 但遗憾的是, 其在细胞水平的抗病毒活性低 ($EC_{50} > 100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。Massari 等^[54]对化合物 **54** 环庚噻吩环 C-2 位修饰得到的含对氯苯基的 **55** ($IC_{50} = 32 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和无芳香取代基的 **56** ($IC_{50} = 35 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制 PA-PB1 相互作用的活性及抗流感病毒活性较 **54** 显著增强 (**55**,

$EC_{50} = 18 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **56**, $EC_{50} = 26 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞), 同时也显示较好的抗乙型流感病毒活性 (**55**, $EC_{50} = 21 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **56**, $EC_{50} = 19 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

该团队^[55,56]继续对化合物 **54** 进行修饰 (图 22), 尝试在其环庚噻吩环 C-2 位苯环上引入羟基以增强化合物与 PA 活性口袋的氢键, 其中邻位羟基衍生物 **57** ($IC_{50} = 15 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制 PA-PB1 相互作用的活性是 **54** 的 6 倍, 抗病毒活性较 **54** 显著增强 ($EC_{50} = 2.6 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。对 **57** 的环庚噻吩环 C-3 位进行修饰, 发现 C-3 位 2-吡啶分别替换为对氯苯基 (**58**, $EC_{50} = 1.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和对氟苯基 (**59**, $EC_{50} = 1.2 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后抗病毒活性进一步提升。此外, 尽管 **57** 的 C-3 噻唑衍生物 **60** ($IC_{50} = 69 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 C-2 对硝基苯基衍生物 **61** ($IC_{50} = 65 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制 PA-PB1 相互作用的活性较弱, 却具有更强的抗病毒活性 (**60**, $EC_{50} = 0.18 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **61**, $EC_{50} = 0.26 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。Nannetti 等^[57]发现化合物 **57**~**61** 均具有抗甲型和乙型流感病毒的广谱抗病毒活性, 包括对奥司他韦耐药株均具有纳摩尔或低微摩尔的抗病毒活性。其中化合物 **58**、**59** 和 **61** 的耐药性屏障高于奥司他韦, 甲型流感病毒在药

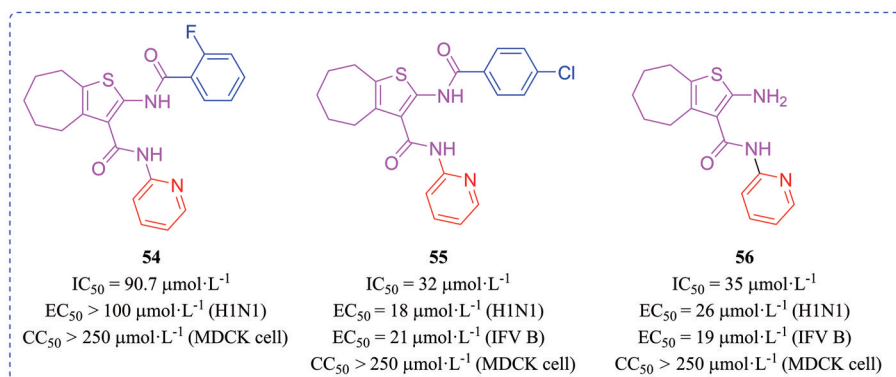


Figure 21 Structures of cycloheptenyl-3-formamide (cHTC) derivatives 54–56

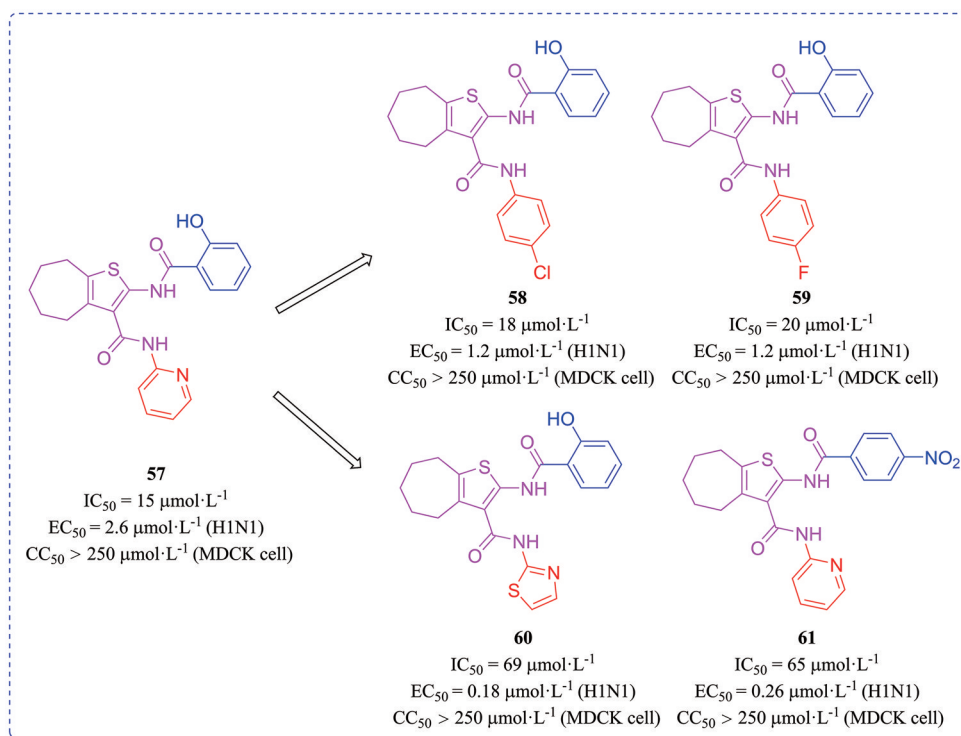


Figure 22 Structures of cycloheptienyl-3-formamide (cHTC) derivatives 57–61

物诱导的选择压力下连续传代后, 没有出现使其敏感性降低的病毒变异株。

5.1.2 三唑并嘧啶 (TZP) 衍生物 2015年, Arianna 教授团队^[53]对前期通过虚拟筛选得到的三唑并嘧啶类化合物 **62** ($IC_{50} = 170.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞, 图 23) 进行优化, 采用分子杂合策略合并其三唑并嘧啶 (TZP) 骨架与化合物 **54** 的 cHTC 骨架, 得到杂化分子 **63**, 其抑制 PA-PB1 相互

作用的活性 ($IC_{50} = 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 **62** 的 155 倍, 细胞水平抗 H1N1 活性较好 ($EC_{50} = 21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。化合物 **63** 的位置异构体 **64** 抑制 PA-PB1 相互作用的活性 ($IC_{50} = 28 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较 **63** 弱, 但抗病毒活性更强 ($EC_{50} = 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。由于 **63** 和 **64** 的溶解度均很低 ($< 1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 而且可能与环庚噻吩环的存在有关^[52]。因此在后续的

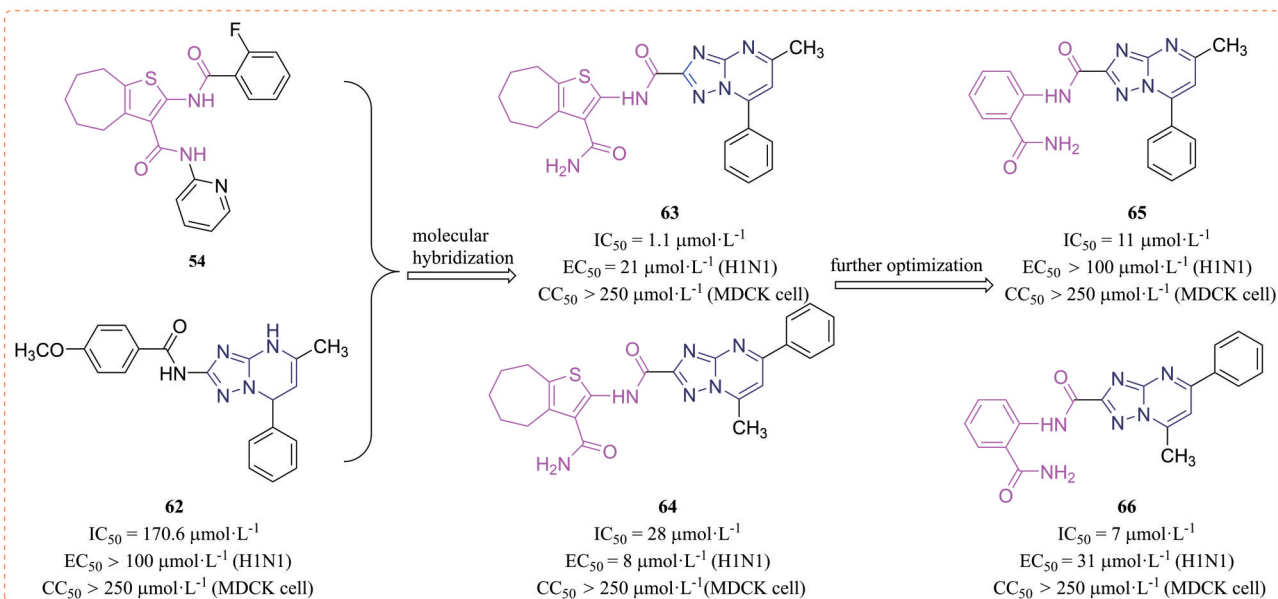


Figure 23 Structures of triazolopyrimidine (TZP) derivatives 62–66

研究中, 该团队保持化合物的TZP骨架不变, 将**63**和**64**的环庚噻吩环替换为苯环, 所得化合物以**65** ($IC_{50} = 11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和**66** ($IC_{50} = 7 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制PA-PB1相互作用活性较好, 但由于**65**的溶解度 ($6.55 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 较**66** ($30.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 低, 其抗病毒活性 ($EC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 弱于**66** ($EC_{50} = 31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[58,59]。

近期, Pismataro等^[60]基于对TZP衍生物的SAR研究, 设计合成了另一系列三唑并嘧啶类化合物(图24), 其中含苯并噁嗪酮环的化合物**67**具有中等程度的抑制PA-PB1相互作用活性 ($IC_{50} = 19.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及细胞水平抗流感病毒活性 ($EC_{50} = 16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 250 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK细胞)。此外, 含N-(2-氟苯基)甲酰胺基团的化合物**68**抑制PA-PB1相互作用活性 ($IC_{50} = 17.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 略高于**67**, 抗流感病毒活性较差 ($EC_{50} = 83.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 却具有一定的抗SARS-CoV-2活性 ($EC_{50} = 34.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且对Vero E6细胞的毒性低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

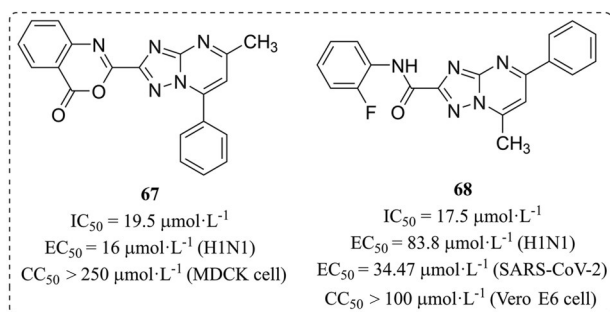


Figure 24 Structures of triazolopyrimidine (TZP) derivatives **67** and **68**

5.1.3 苯并咪唑衍生物 2013年, Kessler等^[61]采用高通量筛选方法从15 000个化合物中筛选得到苯并咪唑类PA-PB1抑制剂**69**(图25), 其抗H1N1流感病毒活性较好 ($EC_{50} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且在 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下无细胞毒性。SAR研究发现, 在**69**的苯环C-3位引入硝基得到

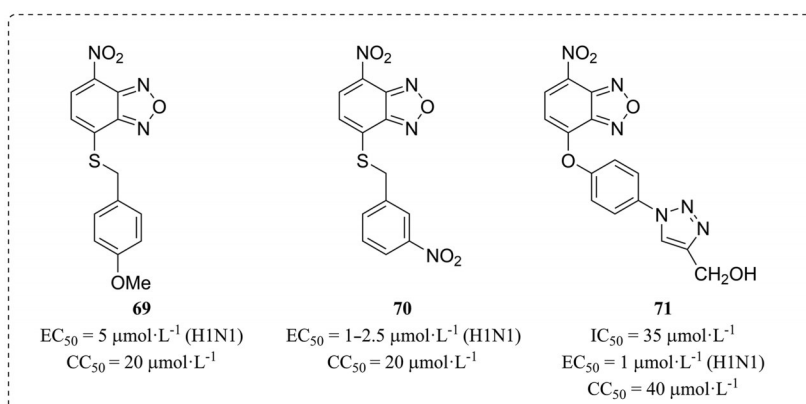


Figure 25 Structures of benzofuran derivatives **69**–**71**

的化合物**70**抗病毒活性增加 ($EC_{50} = 1\sim 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 细胞毒性与**69**相同。该团队为了研发新型有效的苯并咪唑类RNA聚合酶抑制剂, 继续对**70**进行SAR研究, 发现在其苯环C-4位引入含羟基的三氮唑环得到的化合物**71**在细胞水平抗H1N1流感病毒活提高 ($EC_{50} = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且细胞毒性降低 ($CC_{50} = 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), ELISA实验显示其抑制PA-PB1相互作用的 IC_{50} 值为 $35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[62]。

5.1.4 ANA-1 2016年, 香港大学周婕教授课题组^[63]对950个化合物进行基于ELISA的高通量筛选, 获得了三唑并嘧啶类PA-PB1抑制剂PAC-3 (**72**, $IC_{50} = 8.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图26), 其抗流感病毒活性较好 ($EC_{50} = 0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且选择性高 ($SI = 150$)。对**72**进行结构修饰合成了含邻氯苯基的三唑并嘧啶类化合物**73** (ANA-1), 其抗流感病毒活性 ($EC_{50} = 0.55 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和选择性 ($SI = 227$) 均高于**72**。通过对感染H1N1病毒的小鼠鼻内给药, 发现**73**能够明显降低小鼠肺部病毒载量。分子对接显示, **73**与 PA_C 端的Asp426、Glu427、Arg582和Leu585残基形成氢键, 可能会引起构象变化, 从而破坏 PA_C 与 $PB1_N$ 的相互作用。

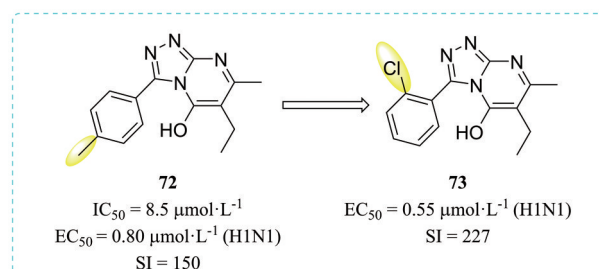


Figure 26 Structures of triazolopyrimidine derivatives **72** and **73**

5.1.5 喹啉酮类化合物 2017年, Watanabe等^[64]对约60万个化合物进行虚拟筛选得到136个得分较高的分子, 进而通过SPR实验, 发现含四氮唑基团的喹啉酮类化合物**74**(图27)对PA具有较高的亲和力 ($K_d =$

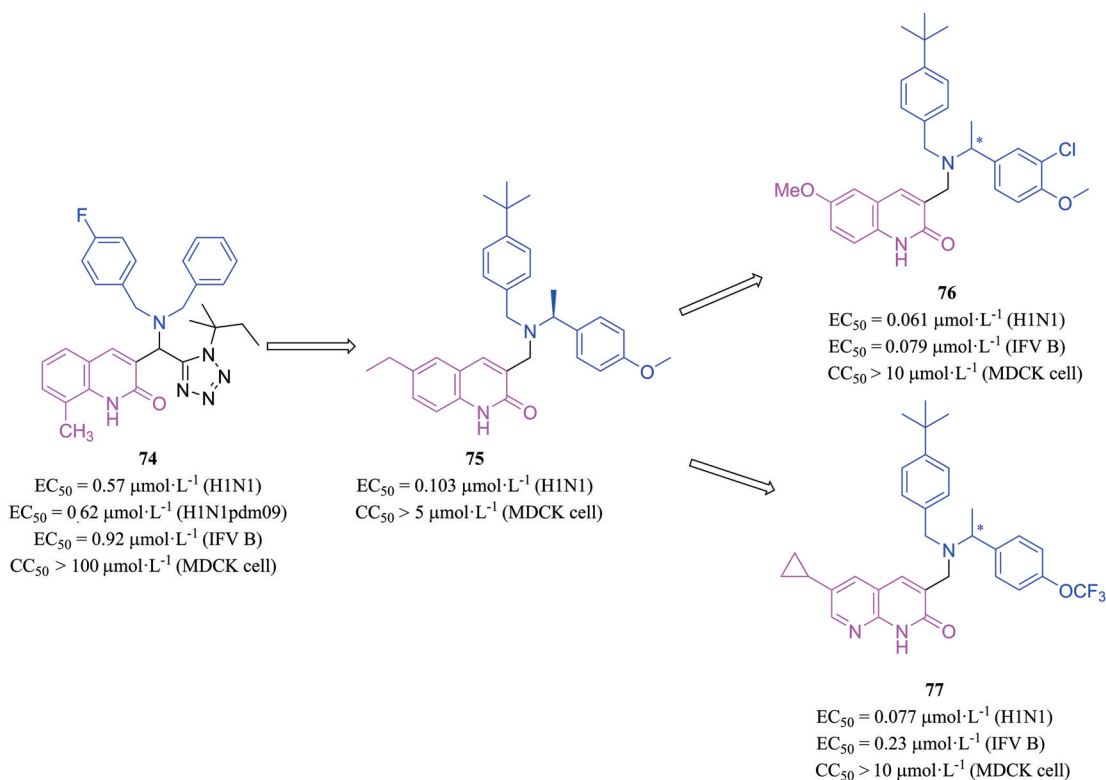


Figure 27 Structures of quinolinone derivatives 74–77

$7.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 进一步的机制研究表明其通过抑制 PA 的核定位干扰 PA-PB1 相互作用。细胞水平抗 H1N1 流感病毒活性较好 ($EC_{50} = 0.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对突变株 H1N1pdm09 ($EC_{50} = 0.62 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和乙型流感病毒 ($EC_{50} = 0.92 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 也有抑制活性且细胞毒性低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。近期该课题组保留 **74** 的喹啉酮环, 对其四氮唑环和二苄基氨基进行修饰得到了化合物 **75**, 其抗 H1N1 病毒活性 ($EC_{50} = 0.103 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 **74** 的 5.5 倍。接着, 他们以 **75** 为先导, 在其对位取代苯环上的间位引入氯原子, 将喹啉酮环 6 位乙基替换为甲氧基后得到了化合物 **76**, 其抗病毒活性 ($EC_{50} = 0.061 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 高于 **75**, 且细胞毒性降低 ($CC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞); 此外, 采用骨架跃迁策略对 **75** 进行修饰, 结合 SAR 研究, 又发现了抗病毒活性和细胞毒性与化合物 **76** 相当的 1,8-萘啉酮类化合物 **77** ($EC_{50} = 0.077 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; $CC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞), 且化合物 **76** 和 **77** 均显示较好的抗乙型流感病毒活性 (**76**, $EC_{50} = 0.079 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **77**, $EC_{50} = 0.23 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[65]。

5.1.6 噻唑类化合物 2020 年, Zhang 等^[66]采用体外裂解荧光素酶裂解法 (SLC) 从 10 000 种化合物中筛选出噻唑类 PA-PB1 相互作用抑制剂 **78** ($IC_{50} = 4.78 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 28)。进一步活性评价显示, 其对甲型和乙型流感病

毒以及对金刚烷胺、奥司他韦耐药及双重耐药的毒株具有广谱抗病毒活性 ($EC_{50} = 0.93 \sim 4.66 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 300 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞)。机制研究表明, **78** 通过抑制 PA 核定位, 进而降低病毒 RNA 和蛋白质水平, 最终抑制病毒复制。

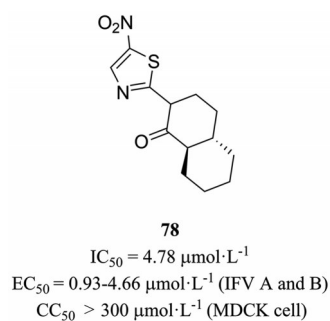


Figure 28 The structure of thiazoles derivative **78**

5.2 PB1-PB2 相互作用抑制剂

2017 年, 香港大学周婕教授课题组^[67]将发现 PA-PB1 相互作用抑制剂 ANA-1 的高通量筛选方法用于 PB1-PB2 相互作用抑制剂的研发, 首次报道了靶向 PB1-PB2 相互作用的吡唑烷二酮类化合物 **79** ($IC_{50} = 8.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 图 29), 其在细胞水平对流感病毒 H1N1pdm09 具有较强活性 ($EC_{50} = 1.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 且细胞毒性低 ($CC_{50} > 500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, MDCK 细胞), 但在

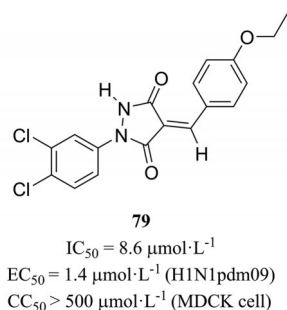


Figure 29 The structure of PB1-PB2 interaction inhibitor **79**

$40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下 **79** 才对 H5N1、H7N7 流感病毒显示抑制活性, 对这两类流感病毒具有不同程度的耐药性。

6 总结与展望

目前, 流感病毒仍对人类健康构成严重威胁。小分子药物是抗击流感的重要防线, 但耐药毒株的出现导致现有抗流感病毒药物的选择受到限制, 因此迫切需要开发具有新骨架或新机制的抗流感病毒药物。流感病毒的 RdRp 在病毒的转录和复制中发挥关键作用, 是一个重要的抗病毒靶点。本文介绍了流感病毒 RdRp 的结构和功能, 并总结了近年来靶向 RdRp 的各类抑制剂 (图 30)。

PA 属于金属酶, 目前报道的大多数 PA 抑制剂的结构包含金属结合药效团 (MBG) 和疏水基团两部分, MBG 与 PA 活性位点的二价金属离子螯合并与氨基酸残基相互作用, 例如羟基吡啶酮或邻苯二酚基团; 疏水部分与远离金属离子中心的口袋相互作用^[25,40]。根据 PA 的金属螯合特征, 主要通过基于片段的药物发现得

到与酶活性中心二价金属离子螯合的优势片段, 再采用片段生长策略进行优化; 或采用基于结构的虚拟筛选和高通量筛选得到 PA 抑制剂的新骨架, 其中使用计算技术的虚拟筛选方法确定先导化合物可以大大节约时间和成本^[24,27,36]; 或采用优势骨架再定位策略将其他有效金属酶抑制剂的 MBG 用于 PA 抑制剂的设计, 例如巴洛沙韦的发现历程^[15,16]。由于 PA 抑制剂均包含一个极性的金属螯合基团, 常常面临透膜性差和口服生物利用度差等问题^[26], 因此这类药物在研究过程中, 应注重早期的成药性评价, 比如透膜性的虚拟预测。运用基于靶标的结构修饰策略、改善物理化学性质的策略使化合物兼顾抗病毒活性与成药性, 经验主义的试错方法正在被这些更复杂的策略所取代。

Arianna 教授团队^[53]通过虚拟筛选得到了 PA-PB1 相互作用抑制剂, 开启了抗流感药物研发的新方向, 后续不同研究团队^[61,63-66]也报道了关于 PA-PB1 相互作用抑制剂的研究, 但目前报道的化合物抗病毒活性大多在微摩尔水平, 与上市药物相比还有很大的优化空间。而关于另一个蛋白-蛋白相互作用靶标 PB1-PB2 复合物的共晶研究还较少, 目前仅报道了一个对 PB1-PB2 相互作用有抑制作用的化合物, 针对此类抑制剂的研究仍前路漫漫^[67]。对于蛋白-蛋白相互作用靶标, 蛋白间的接触面积大, 相互作用界面平坦, 口袋较浅, 是对这类靶标进行药物设计的难点。针对这一问题, 可通过增加小分子化合物的立体性使其更好地占据活性口袋, 如 Watanabe 等^[64]报道的三骨架喹啉酮类 PA-PB1 相互作用抑制剂抗病毒活性达到了纳摩尔水平; 或采用共

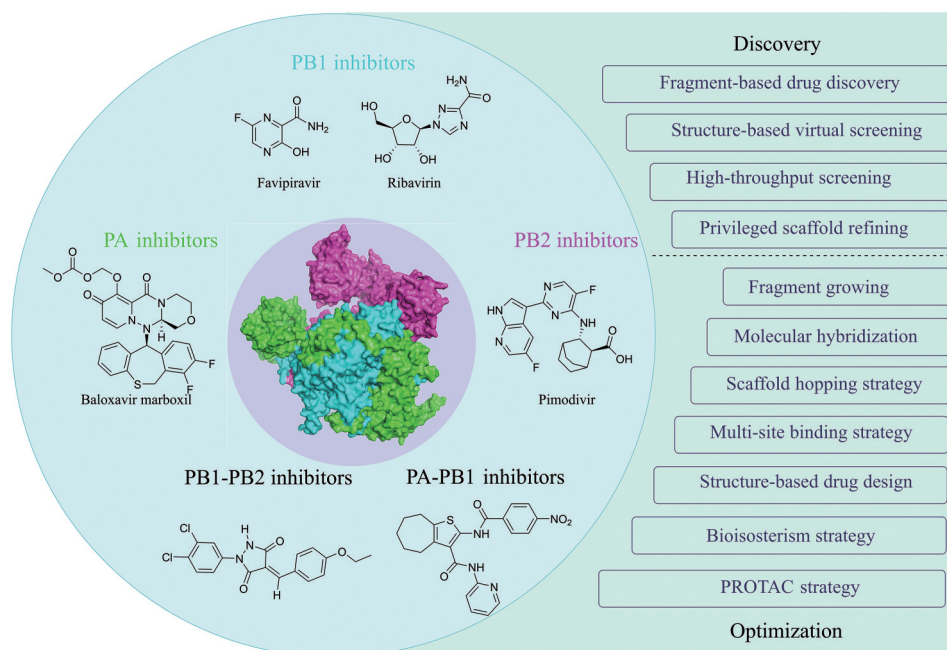


Figure 30 Representative RdRp inhibitors and their discovery and optimization of medicinal chemistry strategies

价策略使配体与蛋白-蛋白相互作用界面口袋形成共价键以提高化合物活性;同时 PROTAC 策略已成功应用于靶向流感病毒表面蛋白的药物的设计中^[43,68,69],因此理论上对 RNA 依赖的 RNA 聚合酶也同样适用。

作者贡献: 展鹏对论文进行整体的构思和修改;贾惠楠和贾瑞芳负责全文的撰写;张继伟、江圆敏、刘传峰和张莹对论文进行修改;刘新泳对论文进行整体的指导。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] World Health Organization. Influenza (Seasonal) [DB/OL]. 2022 [2022-5-28]. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)).
- [2] Zhang C, Cao YL, 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
- [3] Zhang Q, Zhao QJ, Xiong RS, et al. Research progress of anti-influenza virus agents [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2010, 45: 289-299.
- [4] Li M, Li HW, Liang SB, et al. Recent progress of novel anti-influenza entry inhibitors [J]. Sci Sin: Chim (中国科学:化学), 2018, 48: 1347-1364.
- [5] Xiu SY, Zhang J, Ju H, et al. Progress on IFV drug targets and small molecule inhibitors [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2020, 55: 611-626.
- [6] 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.
- [7] Hou L, Zhang Y, Ju H, et al. Contemporary medicinal chemistry strategies for the discovery and optimization of influenza inhibitors targeting vRNP constituent proteins [J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12: 1805-1824.
- [8] Lee N, Hurt AC. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza: a clinical perspective [J]. Curr Opin Infect Dis, 2018, 31: 520-526.
- [9] Hayden FG, Sugaya N, Hirotsu N, et al. Baloxavir marboxil for uncomplicated influenza in adults and adolescents [J]. N Engl J Med, 2018, 379: 913-923.
- [10] Obayashi E, Yoshida H, Kawai F, et al. The structural basis for an essential subunit interaction in influenza virus RNA polymerase [J]. Nature, 2008, 454: 1127-1131.
- [11] Boivin S, Cusack S, Ruigrok RW, et al. Influenza A virus polymerase: structural insights into replication and host adaptation mechanisms [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 28411-28417.
- [12] Hengrung N, El Omari K, Serna Martin I, et al. Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from influenza C virus [J]. Nature, 2015, 527: 114-117.
- [13] Dias A, Bouvier D, Crepin T, et al. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit [J]. Nature, 2009, 458: 914-918.
- [14] Heo YA. Baloxavir: first global approval [J]. Drugs, 2018, 78: 693-697.
- [15] Johns BA, Kawasuji T, Weatherhead JG, et al. Carbamoyl pyridone HIV-1 integrase inhibitors 3. A diastereomeric approach to chiral nonracemic tricyclic ring systems and the discovery of dolutegravir (S/GSK1349572) and (S/GSK1265744) [J]. J Med Chem, 2013, 56: 5901-5916.
- [16] Miyagawa M, Akiyama T, Taoda Y, et al. Synthesis and SAR study of carbamoyl pyridone bicycle derivatives as potent inhibitors of influenza cap-dependent endonuclease [J]. J Med Chem, 2019, 62: 8101-8114.
- [17] Taoda Y, Miyagawa M, Akiyama T, et al. Dihydrodibenzothiepine: promising hydrophobic pharmacophore in the influenza cap-dependent endonuclease inhibitor [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2020, 30: 127547.
- [18] Kawai M, Tomita K, Akiyama T, et al. Preparation of polycyclic pyridone derivatives as cap-dependent endonuclease (CEN) inhibitors and prodrugs thereof: Jpn, 5971830 B1 [P]. 2016-08-17.
- [19] Kawai M, Tomita K, Akiyama T, et al., Pharmaceutical composition containing polycyclic pyridone derivatives as cap-dependent endonuclease (CEN) inhibitors: JPN, 6249434 B1 [P]. 2017-12-20.
- [20] Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil [J]. Sci Rep, 2018, 8: 9633.
- [21] Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi K, et al. Treatment-emergent influenza variant viruses with reduced baloxavir susceptibility: impact on clinical and virologic outcomes in uncomplicated influenza [J]. J Infect Dis, 2020, 221: 346-355.
- [22] Ivashchenko AA, Mitkin OD, Jones JC, et al. Non-rigid diarylmethyl analogs of baloxavir as cap-dependent endonuclease inhibitors of influenza viruses [J]. J Med Chem, 2020, 63: 9403-9420.
- [23] Tang L, Yan H, Wu W, et al. Synthesis and anti-influenza virus effects of novel substituted polycyclic pyridone derivatives modified from baloxavir [J]. J Med Chem, 2021, 64: 14465-14476.
- [24] Sagong HY, Parhi A, Bauman JD, et al. 3-Hydroxyquinolin-2(1H)-ones as inhibitors of influenza A endonuclease [J]. ACS Med Chem Lett, 2013, 4: 547-550.
- [25] Sagong HY, Bauman JD, Patel D, et al. Phenyl substituted 4-hydroxypyridazin-3(2H)-ones and 5-hydroxypyrimidin-4(3H)-ones: inhibitors of influenza A endonuclease [J]. J Med Chem, 2014, 57: 8086-8098.
- [26] Miyagawa M, Akiyama T, Mikamiyama-Iwata M, et al. Discovery of novel 5-hydroxy-4-pyridone-3-carboxy acids as potent inhibitors of influenza cap-dependent endonuclease [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26: 4739-4742.
- [27] Credille CV, Chen Y, Cohen SM. Fragment-based identification

- of influenza endonuclease inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 6444-6454.
- [28] Sanna D, Buglyo P, Biro L, et al. Coordinating properties of pyrone and pyridinone derivatives, tropolone and catechol toward the VO^{2+} ion: an experimental and computational approach [J]. *Eur J Inorg Chem*, 2012, (7): 1079-1092.
- [29] Credille CV, Dick BL, Morrison CN, et al. Structure-activity relationships in metal-binding pharmacophores for influenza endonuclease [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 10206-10217.
- [30] Credille CV, Morrison CN, Stokes RW, et al. SAR exploration of tight-binding inhibitors of influenza virus PA endonuclease [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 9438-9449.
- [31] Gong Q, Menon L, Ilina T, et al. Interaction of HIV-1 reverse transcriptase ribonuclease H with an acylhydrazone inhibitor [J]. *Chem Biol Drug Des*, 2011, 77: 39-47.
- [32] Chen E, Swift RV, Alderson N, et al. Computation-guided discovery of influenza endonuclease inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 61-64.
- [33] Rogolino D, Carcelli M, Bacchi A, et al. A versatile salicyl hydrazonic ligand and its metal complexes as antiviral agents [J]. *J Inorg Biochem*, 2015, 150: 9-17.
- [34] Carcelli M, Rogolino D, Gatti A, et al. *N*-Acylhydrazone inhibitors of influenza virus PA endonuclease with versatile metal binding modes [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31500.
- [35] Pala N, Dallochio R, Dessi A, et al. Virtual screening-driven identification of human carbonic anhydrase inhibitors incorporating an original, new pharmacophore [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21: 2515-2520.
- [36] Pala N, Stevaert A, Dallochio R, et al. Virtual screening and biological validation of novel influenza virus PA endonuclease inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6: 866-871.
- [37] Ferro S, Gitto R, Buemi MR, et al. Identification of influenza PA-Nter endonuclease inhibitors using pharmacophore- and docking-based virtual screening [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 4544-4550.
- [38] Liao Y, Ye Y, Li S, et al. Synthesis and SARs of dopamine derivatives as potential inhibitors of influenza virus PA_N endonuclease [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, 189: 112048.
- [39] Liu Z, Gu S, Zhu X, et al. Discovery and optimization of new 6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline derivatives as potent influenza virus PA_N inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2022, 227: 113929.
- [40] Liao Y, Ye Y, Liu M, et al. Identification of *N*- and C-3-modified laudanoline derivatives as novel influenza PA_N endonuclease inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2023, 66: 188-219.
- [41] 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.
- [42] Toure M, Crews CM. Small-molecule PROTACS: new approaches to protein degradation [J]. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2016, 55: 1966-1973.
- [43] Zhao J, Wang J, Pang X, et al. An anti-influenza A virus microbial metabolite acts by degrading viral endonuclease PA [J]. *Nat Commun*, 2022, 13: 2079.
- [44] Furuta Y, Gowen BB, Takahashi K, et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor [J]. *Antiviral Res*, 2013, 100: 446-454.
- [45] Vanderlinden E, Vrancken B, Van Houdt J, et al. Distinct effects of T-705 (favipiravir) and ribavirin on influenza virus replication and viral RNA synthesis [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60: 6679-6691.
- [46] Lin C, Sun C, Liu X, et al. Design, synthesis, and *in vitro* biological evaluation of novel 6-methyl-7-substituted-7-deaza purine nucleoside analogs as anti-influenza A agents [J]. *Antiviral Res*, 2016, 129: 13-20.
- [47] Clark MP, Ledebor MW, Davies I, et al. Discovery of a novel, first-in-class, orally bioavailable azaindole inhibitor (VX-787) of influenza PB2 [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 6668-6678.
- [48] Janssen Pharmaceutical. Janssen to stop clinical development of pimodivir for influenza. [DB/OL]. 2020 [2020-09-03]. <https://www.clinicaltrialsarena.com/news/janssen-pimodivir-development>.
- [49] Xiong J, Wang J, Hu G, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel, orally bioavailable pyrimidine-fused heterocycles as influenza PB2 inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 162: 249-265.
- [50] Yang J, Du J, Huang C, et al. Discovery of 5-(5-fluoro-1*H*-pyrrolo 2,3-*b* pyridin-3-yl)pyrazin-2(1*H*)-one derivatives as new potent PB2 inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 1609-1613.
- [51] Zhang H, Zhou L, Amichai S, et al. Novel influenza polymerase PB2 inhibitors for the treatment of influenza A infection [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 126639.
- [52] McGowan DC, Balemans W, Embrechts W, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel indoles targeting the influenza PB2 cap binding region [J]. *J Med Chem*, 2019, 62: 9680-9690.
- [53] Muratore G, Goracci L, Mercorelli B, et al. Small molecule inhibitors of influenza A and B viruses that act by disrupting subunit interactions of the viral polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 6247-6252.
- [54] Massari S, Nannetti G, Goracci L, et al. Structural investigation of cycloheptathiophene-3-carboxamide derivatives targeting influenza virus polymerase assembly [J]. *J Med Chem*, 2013, 56: 10118-10131.
- [55] Desantis J, Nannetti G, Massari S, et al. Exploring the cycloheptathiophene-3-carboxamide scaffold to disrupt the interactions of the influenza polymerase subunits and obtain potent anti-influenza activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 138: 128-139.
- [56] Desantis J, Nannetti G, Massari S, et al. Corrigendum to

- "Exploring the cycloheptathiophene-3-carboxamide scaffold to disrupt the interactions of the influenza polymerase subunits and obtain potent anti-influenza activity" [Eur. J. Med. Chem. 138 (2017) 128-139] [J]. Eur J Med Chem, 2018, 156: 302-303.
- [57] Nannetti G, Massari S, Mercorelli B, et al. Potent and broad-spectrum cycloheptathiophene-3-carboxamide compounds that target the PA-PB1 interaction of influenza virus RNA polymerase and possess a high barrier to drug resistance [J]. Antiviral Res, 2019, 165: 55-64.
- [58] Massari S, Desantis J, Nannetti G, et al. Efficient and regioselective one-step synthesis of 7-aryl-5-methyl- and 5-aryl-7-methyl-2-amino 1,2,4 triazolo 1,5-*a* pyrimidine derivatives [J]. Org Biomol Chem, 2017, 15: 7944-7955.
- [59] Massari S, Bertagnin C, Pismataro MC, et al. Synthesis and characterization of 1,2,4-triazolo [1,5-*a*] pyrimidine-2-carboxamide-based compounds targeting the PA-PB1 interface of influenza A virus polymerase [J]. Eur J Med Chem, 2021, 209: 112944.
- [60] Pismataro MC, Felicetti T, Bertagnin C, et al. 1,2,4-Triazolo 1,5-*a* pyrimidines: efficient one-step synthesis and functionalization as influenza polymerase PA-PB1 interaction disruptors [J]. Eur J Med Chem, 2021, 221: 113494.
- [61] Kessler U, Castagnolo D, Pagano M, et al. Discovery and synthesis of novel benzofurazan derivatives as inhibitors of influenza A virus [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23: 5575-5577.
- [62] Pagano M, Castagnolo D, Bernardini M, et al. The fight against the influenza A virus H1N1: synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of benzofurazan derivatives as viral RNA polymerase inhibitors [J]. ChemMedChem, 2014, 9: 129-150.
- [63] Yuan S, Chu H, Zhao H, et al. Identification of a small-molecule inhibitor of influenza virus *via* disrupting the subunits interaction of the viral polymerase [J]. Antiviral Res, 2016, 125: 34-42.
- [64] Watanabe K, Ishikawa T, Otaki H, et al. Structure-based drug discovery for combating influenza virus by targeting the PA-PB1 interaction [J]. Sci Rep, 2017, 7: 12.
- [65] Mizuta S, Otaki H, Ishikawa T, et al. Lead optimization of influenza virus RNA polymerase inhibitors targeting PA-PB1 interaction [J]. J Med Chem, 2022, 65: 369-385.
- [66] Zhang J, Hu Y, Wu N, et al. Discovery of influenza polymerase PA-PB1 interaction inhibitors using an *in vitro* split-luciferase complementation-based assay [J]. ACS Chem Biol, 2020, 15: 74-82.
- [67] Yuan S, Chu H, Ye J, et al. Identification of a novel small-molecule compound targeting the influenza A virus polymerase PB1-PB2 interface [J]. Antiviral Res, 2017, 137: 58-66.
- [68] 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.
- [69] 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.