

## 丙型肝炎病毒抑制剂研究进展

宋 淑, 高 萍, 展 鹏\*, 刘新泳\*

(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:** 丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染是全球性的公共卫生问题之一, 全世界有 1.3 亿至 1.5 亿人长期感染, 其中四分之一的患者会产生肝硬化、肝细胞癌甚至肝功能衰竭等并发症。完全清除病毒是研究者不断进行抗丙肝新药物研发的目标与动力。本综述精选近几年具代表性的研究实例, 从药物化学的视角总结了抗丙肝小分子抑制剂的前沿进展。

**关键词:** 丙型肝炎; 抗病毒药物; 药物靶标; 药物设计; 小分子抑制剂

中图分类号: R916 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)04-0652-17

## Recent progress in inhibitors against hepatitis C virus

SONG Shu, GAO Ping, ZHAN Peng\*, LIU Xin-yong\*

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

**Abstract:** Hepatitis C virus (HCV) infection is one of the global public health issues. Approximately, 130–150 million individuals are chronically infected worldwide and a quarter of these patients are at increased risk of developing liver cirrhosis, hepatocellular carcinoma and even liver failure. A complete eradication of the virus is one of the most important treatment goals for antiviral research. From the point of view of medicinal chemistry, we summarize and discuss current endeavors towards the discovery and development of novel inhibitors with various scaffolds or distinct mechanisms of action.

**Key words:** hepatitis C virus; antiviral drug; drug target; drug design; small molecule inhibitor

丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 是一种血液传播性疾病, 通常会被描述为“沉默杀手”, 主要是因为丙肝病毒的潜伏期很长, 而且极容易慢性化。慢性丙肝会对肝脏造成不同程度的损伤, 如不及时治疗, 会引起一系列的并发症, 如肝纤维化、肝硬化甚至是肝癌。估计全球仍有 1.3 亿~1.85 亿人感染 HCV, 每年大约有 70 万人死于丙型肝炎及其并发症。我国的丙肝病毒感染患者大约有 1 000 万人<sup>[1]</sup>。

HCV 病毒进入人体, 会选择性感染肝脏细胞, 利

用肝细胞中的物质进行增殖。其生命周期主要分为吸附与融合、翻译和 RNA 复制、组装、出芽和释放 (图 1)<sup>[2]</sup>。抗 HCV 药物通过作用于病毒编码蛋白或致病相关宿主细胞因子, 从不同阶段阻断 HCV 在肝细胞中的生命周期, 从而达到抗病毒疗效。根据作用靶点的不同, 抗 HCV 药物主要包括直接抗病毒药物 (direct-acting antiviral agents, DAA) 和宿主靶向药物 (host-targeting agents, HTA)。其中, DAA 直接作用于病毒蛋白, 往往具有较高的应答率和治愈率<sup>[3]</sup>。本综述精选近几年研究实例, 从药物化学的角度总结了 HCV 治疗历程及 DAA 研究的最近进展。

1989 年, 科学家首次发现丙型肝炎病毒。1991 年注射用干扰素  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) 被美国 FDA 批准用于 HCV 治疗, 从此开始了丙肝治疗的干扰素时代, 当时的治愈率

收稿日期: 2019-09-29; 修回日期: 2019-10-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81420108027, 81573347); 山东省重点研发计划 (2017CXGC1401, 2019JZZY021011).

\*通讯作者 Tel: 86-531-88380270,

E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0786

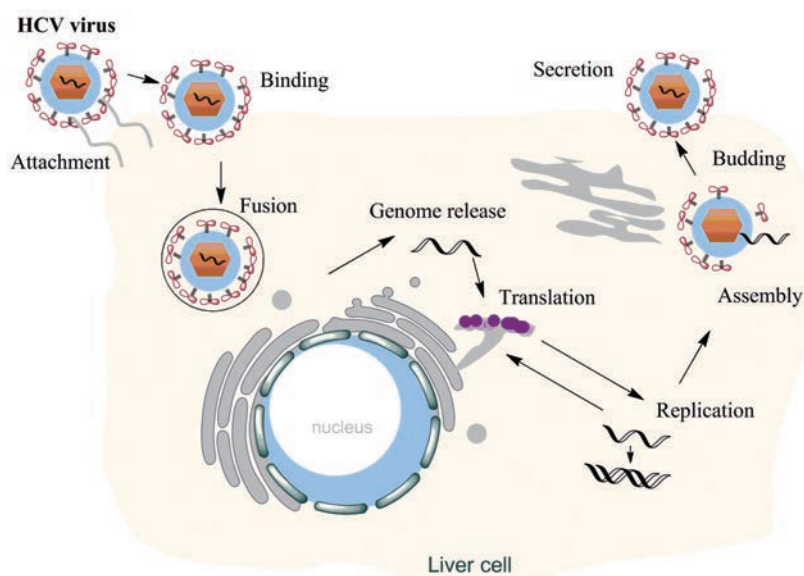


Figure 1 The life cycle of hepatitis C virus (HCV)

仅为6%。2001年各国一致推荐的标准治疗方案: 长效干扰素与利巴韦林联合使用, 可获得中等的持续病毒学应答 (sustained viral response, SVR), 治愈率进一步提升到41%, 但这一标准治疗方案存在治愈率较低、患者耐受性差、治疗周期长 (48周~72周) 等问题<sup>[4]</sup>。2011年, FDA批准的特拉匹韦 (telaprevir) 和波普瑞韦 (boceprevir) 开启了丙肝DAA治疗的新时代, 结束了干扰素时代。之后, 利巴韦林 (ribavirin, RBV)、聚乙二醇化长效干扰素 $\alpha$  (IFN- $\alpha$  2a 或 IFN- $\alpha$  2b) 和 telaprevir 或 boceprevir 组成的三联疗法大幅提高了治愈率, 也显著地缩短了治疗周期 (24周~48周), 使得HCV-1型初治患者的SVR提高至68%~75%。但是三联法具有长期毒副作用、高成本和较高的复发率等问题。2013年, NS5B聚合酶抑制剂索非布韦 (sofosbuvir) 的上市, 使SVR提高至90%以上, 基本可以达到临床治愈, 且不良反应少, 疗程较短。但是单一DAA治疗的疗效总是不足, 并且容易出现耐药毒株。需要不同机制的DAA (NS3/4A、NS5A、NS5B抑制剂) 联合治疗以降低耐药毒株的发生率和剂量相关的毒性以及增强治疗的有效

性。因此, 基于几种不同作用方式的DAA的组合, 是目前治疗HCV感染最重要的需求。

目前, 欧洲药物管理局 (EMA) 和美国食品药品监督管理局 (FDA) 批准用于HCV治疗的DAA药物<sup>[5]</sup>如表1所示, 基于DAA药物组合疗法<sup>[6]</sup>如图2所示。

Table 1 HCV inhibitor targets and corresponding drugs

Drug targets	Drugs
NS3/4A	Telaprevir, Boceprevir, Simeprevir, Voxilaprevir, Glecaprevir, Grazoprevir, Paritaprevir
NS5B	Sofosbuvir (NPIs) Dasabuvir (NNPIs)
NS5A	Daclatasvir, Ledipasvir, Ombitasvir, Velpatasvir, Pibrentasvir, Elbasvir

### 1 NS3/4A蛋白酶抑制剂

NS3/4A蛋白是一种多功能酶, 具有N端丝氨酸蛋白酶结构域和C端解旋酶结构域, 主要功能为催化裂解HCV多聚蛋白前体, 释放出成熟的丝氨酸蛋白酶、螺旋酶/核苷酸三磷酸酶和RNA依赖性RNA聚合酶 (RNA dependent RNA polymerase, RdRp)。蛋白酶抑

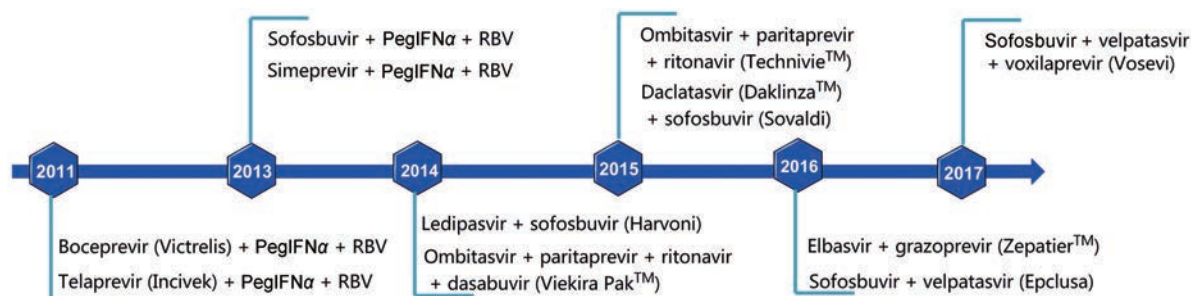


Figure 2 The direct-acting antiviral agents (DAA)-based combination therapies

制剂 (protease inhibitor, PI) 通过与 NS3/4A 蛋白酶活性中心发生可逆共价或非共价结合, 竞争性地抑制酶活性来阻断 HCV 复制、翻译和翻译后多聚蛋白的加工成熟; 此外 PI 还可以通过恢复感染细胞内的 I 型干扰素信号通路, 提高机体的固有免疫<sup>[7]</sup>。但 PI 存在耐药位点多、不良反应发生率高、易受基因型影响等问题<sup>[8]</sup>。蛋白酶抑制剂可分为开环和大环两种。

### 1.1 开环类 NS3/4A 蛋白酶抑制剂

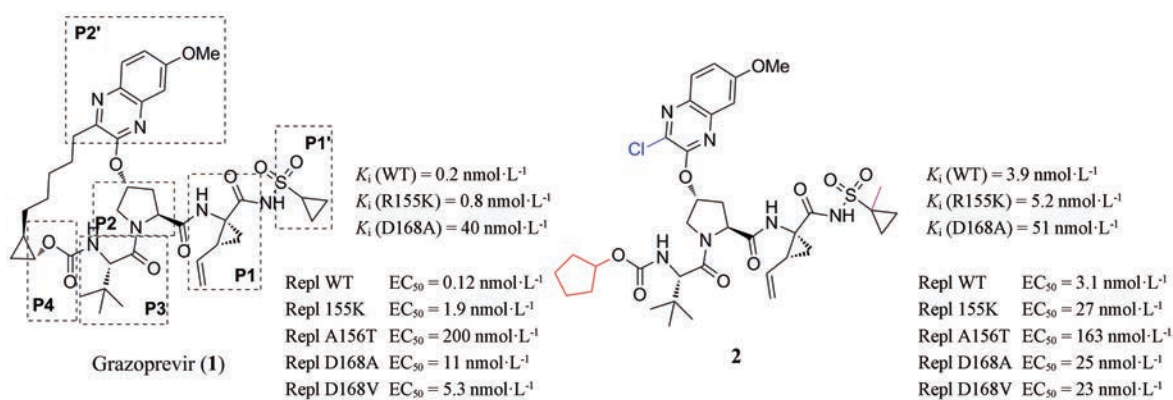
通过消除格佐匹韦 (grazoprevir, **1**) 中的 P2-P4 大环连接链, Rusere 等<sup>[9]</sup>设计、合成了一系列开环类 NS3/4A 蛋白酶抑制剂, 代表化合物为 **2**。开环化合物显示出对 A156T 突变株更好的抗病毒活性, 然而可能是由于构象灵活性的增加和与蛋白酶结合的相关熵补偿, 化合物对野生型 (wild type, WT) 蛋白酶和复制子 (replicon) 的活性降低。开环类抑制剂虽然通常比相应的大环类似物活性低, 但是相对更容易合成并且不容易出现耐药问题 (图 3)。

化合物 **4** 是 NS3 蛋白酶抑制剂早期的先导化合物, 这种三肽酰基磺酰胺对基因 1b 型 (genotype 1b, GT-1b) 复制子细胞抑制活性比相应的羧酸 (**3**) 高 100 倍以上, 表明环丙基酰基磺酰胺部分对 NS3/4A 蛋白酶抑制活性

的重要性, 但该化合物的药代动力学 (pharmacokinetic, PK) 性质很差, 通过继续优化发现了 BMS-605339 (**5**), 但是由于该化合物的心血管风险而停止了临床前研究<sup>[10]</sup>。之后, 对 BMS-605339 的 P2-异喹啉部分详细构效关系 (structure-activity relationship, SAR) 研究发现了阿那匹韦 (asunaprevir, **6**) (图 4), 其在兔心脏模型中没有心血管效应, 同时保持良好的活性 (GT-1a 和 1b 复制子的  $EC_{50} < 10 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和 PK 性质<sup>[11]</sup>, 随后进入临床开发, 并在日本被批准为 SUNVEPRATM, 与 PEG-IFN/RBV 联合使用。

基于吡嗪酮的 HCV NS3 蛋白酶抑制剂的设计源于化合物 **7**<sup>[12]</sup>, 用吡嗪酮代替 **7** 的 P3 部分, 得到等效抑制剂 **8**。随后, 通过将不稳定的氨基甲酸酯基团替换为脲基团使抑酶活性增强 10 倍, 代表化合物为 **9**。进一步延长化合物 **9** 的脲端取代基<sup>[13]</sup>, 得到的化合物改善了对于 NS3 GT-1a 野生株和突变株活性。其中, 化合物 **10** (图 5) 对 GT-1a 的野生株和耐药株 R155K 以及对 GT-3a 均显示出纳摩尔水平的抑制活性。

Zheng 等<sup>[14]</sup>通过在 P1 环丙基氨基酸的环丙基上引入二氟甲基, 设计、合成了一系列三肽酰基磺酰胺类抑制剂, SAR 研究表明: 与  $\text{CH}_3$  和  $\text{CF}_3$  类似物相比, 该类



P1-P4 are the side chains of corresponding positions on the peptide chain of early peptidomimetic NS3/4A inhibitors

Figure 3 The structures of compounds **1** and **2**

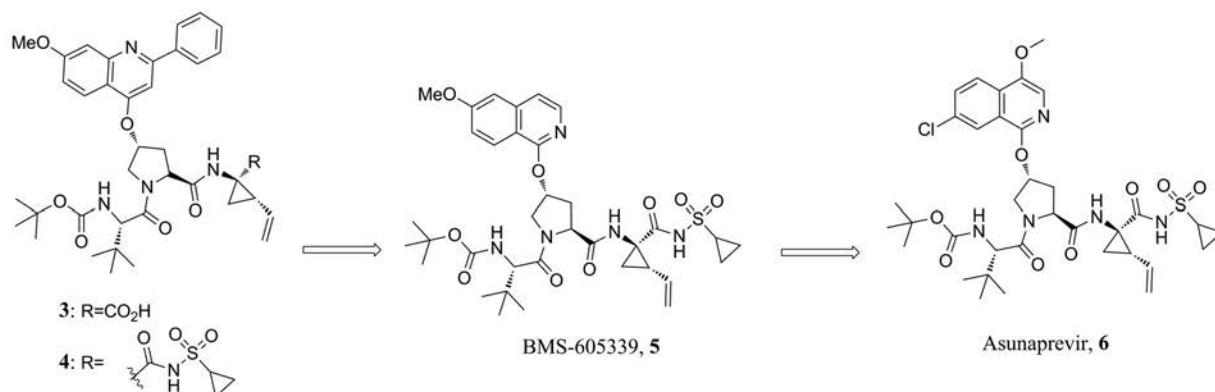


Figure 4 The structures of compounds **3**–**6**

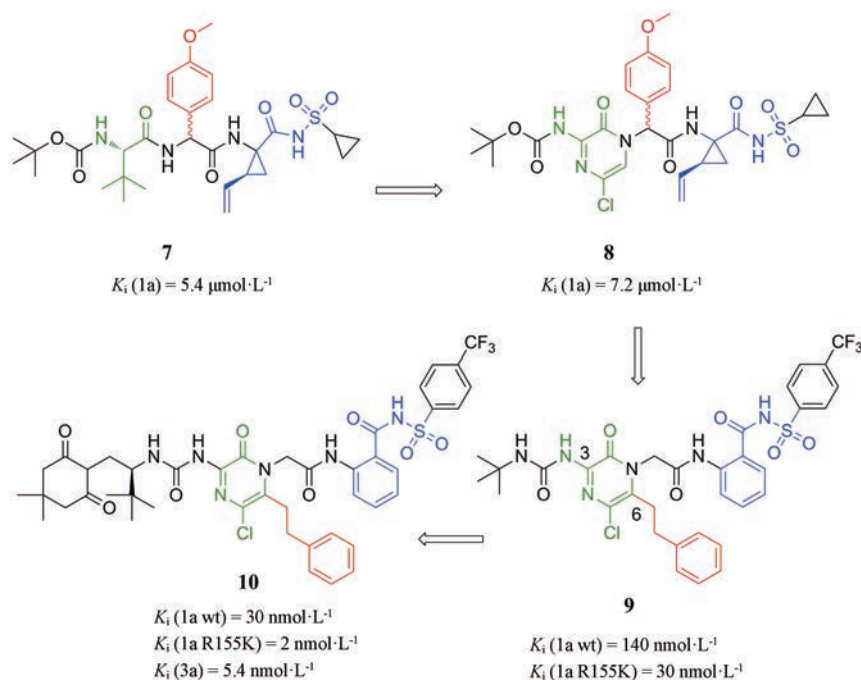
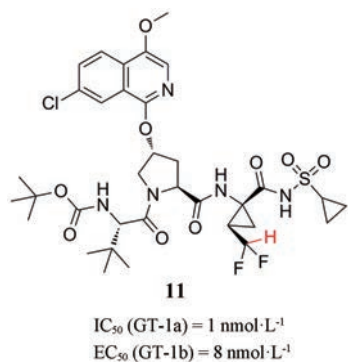


Figure 5 The structures of compounds 7–10

衍生物抑酶活性分别增强了13倍和17倍。其中,化合物**11**与NS3/4A蛋白酶共晶结构表明 $\text{CHF}_2$ 基团的C-H和Leu135主链羰基之间存在氢键作用。虽然该系列的PK性质较差,但结果证明了在该氨基酸部分引入 $\text{CHF}_2$ 基团作为氢键供体有利于提高活性。



## 1.2 大环类NS3/4A蛋白酶抑制剂

虽然早期的蛋白酶抑制剂对GT-1患者非常有效,但对GT-3a及1b的多个耐药株的活性有待提高。早期研究发现修饰P2咪唑区域可以改善GT-3a的活性<sup>[15]</sup>, Merck团队将化合物**12**的P2咪唑与脯氨酸部分形成螺环得到化合物**13**<sup>[16]</sup>, 化合物**13**对GT-1b、3a的活性提高了约80倍, 并且提高了对GT-1b突变株的活性。基于化合物**13**, 通过P1-P3环化策略得到的化合物**14**, 进一步提高了对GT-1b、3a以及1b突变株的活性, 然而发现其PK性质差 ( $\text{AUC}_{0-24\text{h}} = 0.14 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}$ ;  $t_{1/2} =$

0.9 h;  $F = 4\%$ )。在已有构效关系的基础上, 对化合物**14**的P2芳香族区域和P4氨基甲酸酯部位进行优化, 发现化合物MK-8831 (**15**) (图6), PK性质得到改善 ( $F > 17\%$ ), 其对GT-1的 $\text{IC}_{50}$ 值达到皮摩尔级 (GT-1a和1b,  $\text{IC}_{50} = 9$ 和 $4 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 抗病毒活性较好 (GT1-3,  $\text{EC}_{50} = 0.7 \sim 3.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

之后, Merck团队又通过将螺环脯氨酸结构引入MK-5172 (grazoprevir, **1**)的骨架结构得到一系列衍生物<sup>[17]</sup>, 在抑酶和细胞活性测试中, 化合物**16**和**17**对不同的基因型和突变株均显示出优异的活性。以及在螺环化合物基础上, 增加P1-P3环化得到的双大环**18**也显示出优异的抑酶和抗病毒活性 (图7)。

所有NS3/4A PI都易受耐药性的影响, 值得注意的是, 几乎所有PI治疗失败的患者都存在D168A/V突变<sup>[18]</sup>。野生型和突变蛋白酶与抑制剂的高分辨率的共晶结构确定了单点突变导致的耐药性的分子机制。这些晶体结构揭示了PI的大杂环P2部分结合在底物结合区 (被定义为底物包膜) 以外, 并与残基Arg155、Ala156和Asp168进行广泛的相互作用。突变导致的Arg155和Asp168之间的静电相互作用的破坏是对NS3/4A PI产生耐药的原因。Merck团队运用底物包膜假说<sup>[19]</sup>, 设计并合成了一系列P1-P3大环类衍生物 (图8), 发现在P2咪唑部分的3-位具有小疏水性取代基的抑制剂对耐药株具有很好的活性, 抑制主要耐药突变株 ( $\text{EC}_{50} \leq 5 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。这些发现支持这一观点: 设计与蛋白酶包膜内残基相互作用, 同时避免与对

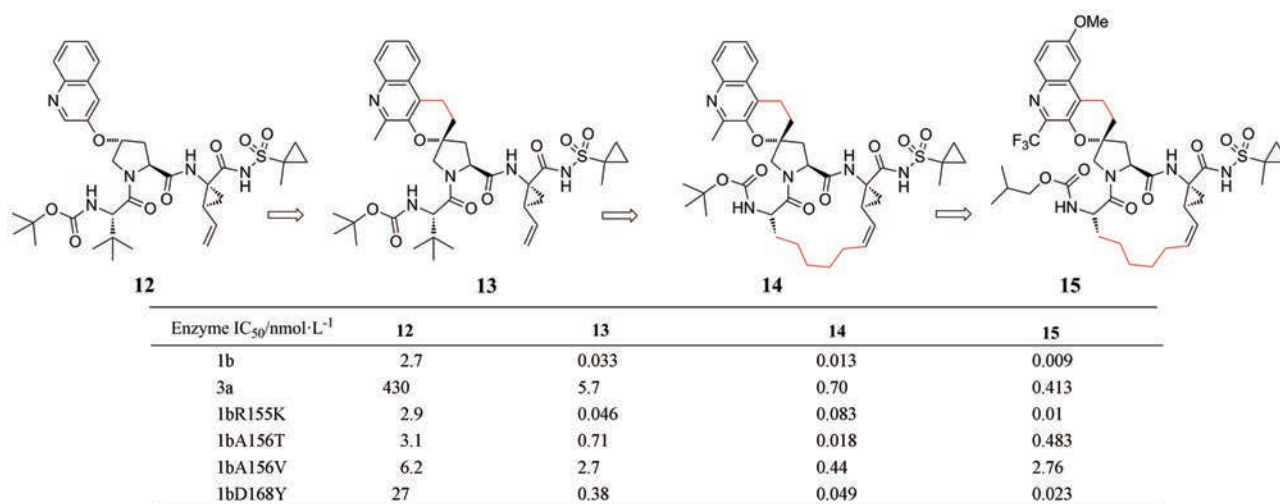


Figure 6 The structures of compounds 12–15

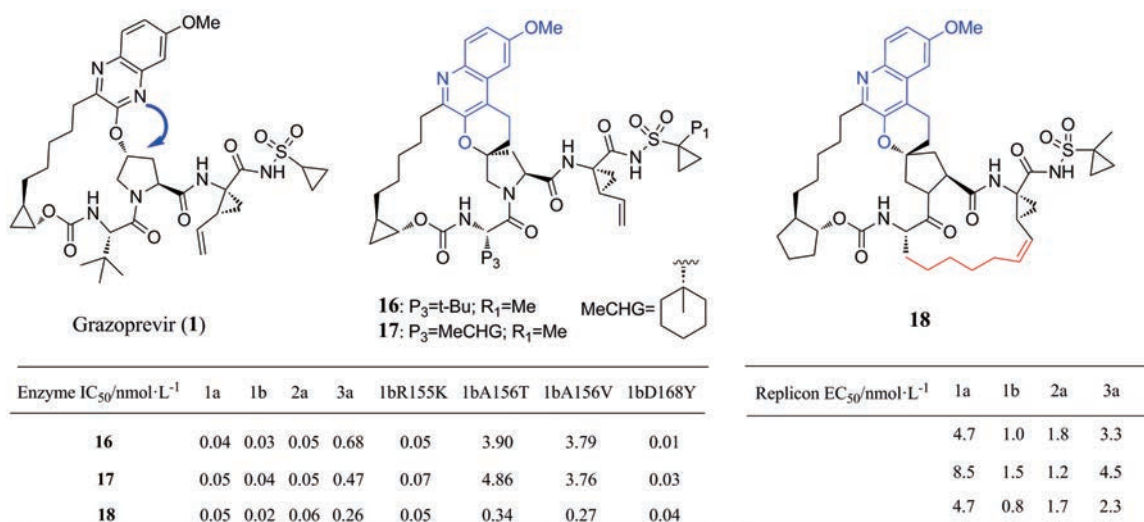


Figure 7 The structures of compounds 16–18

底物识别不重要的残基相互作用的抑制剂可以提高抗病毒耐药性。

吉利德公司选用次膦酸等排体代替P1-羧酸,设计合成了一系列P-苯基取代的衍生物<sup>[20]</sup>,其中2,6-二氟

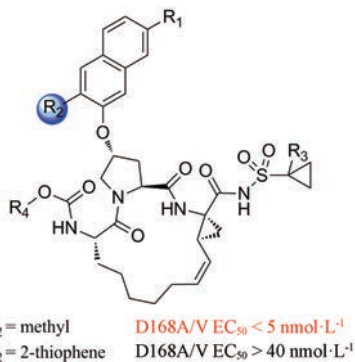
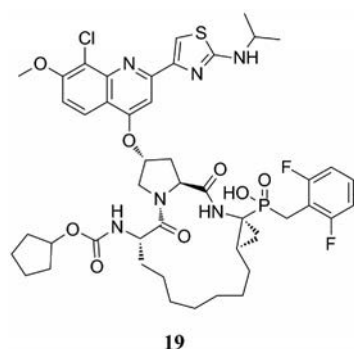


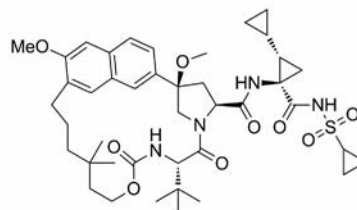
Figure 8 The structures of P1–P3 macrocyclic derivatives

苯基取代衍生物 GS-9256 (19), 在 GT-1b Huh-luc 细胞测试中表现出较好的抑制活性 (EC<sub>50</sub> = 20 nmol·L<sup>-1</sup>) 和较小的细胞毒性<sup>[21]</sup>。最近的研究发现 GS-9256 与 NS5A 抑制剂 ledipasvir 以及其他药物 (包括干扰素-α、利巴韦林、NS5B 聚合酶抑制剂 GS-6620 和 tegobuvir) 组合使用具有协同作用。此外, GS-9256 在小鼠中具有高生物利用度 (接近 100%), 可进一步应用于治疗 GT-1 患者的慢性 HCV 感染的临床开发。

Bowsher 等<sup>[22]</sup>设计、合成了萘连接的 P2-P4 大环酰胺类衍生物, 在个位数纳摩尔级别抑制基因 1a 和 1b 型的 HCV NS3 蛋白酶。通过对大环连接链以及 P1 亚位点的结构修饰来优化该系列中化合物的 PK 性质。最终得到大鼠口服生物利用度为 100%、血浆半衰期长的化合物 20。然而, 该化合物在离体兔心脏模型中表现出心脏毒性而停止了进一步的优化工作。



19



20

## 2 NS5B 聚合酶抑制剂

NS5B 是 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 在病毒复制周期中, 以病毒 RNA 链为模板, 通过催化核糖核苷三磷酸的聚合来完成 HCV RNA 的复制过程。因此靶向 NS5B 聚合酶可以直接抑制病毒 RNA 合成, 阻断病毒的复制周期。在结构上, RdRp 具有聚合酶典型的“右手”结构, 包括拇指 (thumb)、手指 (fingers)、和手掌 (palm) 3 个结构域<sup>[23]</sup>。手掌区的功能是形成核苷酸转移反应的催化中心; 手指区主要是与复制所需的三磷酸核苷酸相互作用; 而拇指区则是在 RNA 复制起始和延伸过程中发挥作用。NS5B 聚合酶还包括 5 个变构位点 (Thumb I、Thumb II、Palm I、Palm II、Palm III), 调节聚合酶的基本构象来保持催化活性。

人体细胞中不含有与 NS5B RdRp 功能相近的酶, 这就使得 NS5B RdRp 的抑制剂具有高度的选择性, 因此 NS5B 聚合酶成为一个理想的抗病毒药物靶点。根据其结构不同分为核苷类和非核苷类聚合酶抑制剂两大类, 这两类药物作用机制不同, 可以联合应用。

### 2.1 核苷类 NS5B 聚合酶抑制剂

核苷类聚合酶抑制剂 (nucleoside analogue polymerase inhibitor, NPI) 是经过糖基化或碱基化修饰的核苷类似物, 通过模拟酶的天然底物, 竞争作用于 NS5B 的催化活性位点, 插入到新合成的核苷酸链中, 使链的延伸终止, 从而阻断 HCV 的生命周期。NS5B 的活性位点具有高度保守性, 不易产生突变, 因此 NPI 具有泛基因型和高抗耐药性特征<sup>[24]</sup>。但是 NPI 需要在体内转化为活性三磷酸盐的形式才能发挥抑制聚合酶活性, 且第一步 5'-单磷酸核苷的形成是磷酸化过程的限速步骤, 为了改善 NPI 的膜渗透性、提高 NPI 在肝细胞内的三磷酸盐水平, 多数采用前药策略。

索菲布韦 (sofosbuvir, **21**) (图 9) 是一种最初由 Pharmasset 开发的氨基磷酸酯前药, 是迄今为止唯一一个获得 HCV 治疗批准的核苷酸前药, 其显示出高的抗耐药性和泛基因型活性。此药联合 NS5A 蛋白酶抑制剂 ledipasvir 可治愈慢性丙型肝炎 (chronic hepatitis

C, CHC), 这对 CHC 治疗具有里程碑意义<sup>[3]</sup>。然而, 该抑制剂不可避免地在 NS5B 中诱导 S282T 突变, 该突变显著降低了活性三磷酸盐代谢物与 NS5B 结合的亲和力, 因此降低了 sofosbuvir 的复制子活性, 此外, 在临床试验中也检测到 S282T 突变<sup>[25]</sup>。

由于发现 HCV 候选药物 mericitabine 的活性代谢物 (**22**) 比 sofosbuvir 的尿苷代谢物能更有效地抑制野生型和 S282T 突变株的 NS5B 聚合酶。因此, Zhen 等<sup>[26]</sup>基于化合物 **22**, 应用双前药策略设计一系列具有 N4 修饰胞嘧啶的氨基磷酸酯衍生物。其中, 化合物 **23** ( $EC_{50} = 0.366 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 相比 sofosbuvir ( $EC_{50} = 0.589 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 对 S282T 突变株 HCV 复制子表现出更强的活性。此外, 这些化合物在高达  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度下不具有细胞毒性 (图 9)。

2017 年, Zhou 等<sup>[27]</sup>用氯原子取代 sofosbuvir 中 2'-甲基得到化合物 **24**, 化合物 **24** 表现出较高的泛基因型活性 ( $GT1-4$ ,  $EC_{50} = 0.05 \sim 0.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 其活性代谢物 24-三磷酸 (**24-TP**, **25**) 对多个基因型的野生株和 S96T 突变株具有微摩尔水平的抑制活性, 且具有较长的半衰期 ( $t_{1/2} = 16 \text{ h}$ )。化合物 **24** 在人血浆中的稳定性以及人肠微粒体和肝微粒体中的代谢稳定性, 使其作为候选药物得到进一步研究 (图 9)。

Jonckers 课题组<sup>[28]</sup>设计、合成了一类 2'-脱氧-2'-螺氧杂环丁烷核糖核苷的氨基磷酸酯前药衍生物, 通过 Huh7-复制子细胞活性测试, 发现大多数衍生物显示显著的活性 ( $EC_{50} = 0.23 \sim 96.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和低的细胞毒性 ( $CC_{50} > 98.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

2016 年, 该课题组又报道了 2'-脱氧-2'-螺氧杂环丁烷尿苷核苷酸的环状磷酸酯衍生物 JNJ-54257099 (**26**)<sup>[29]</sup>, 尽管该化合物在体外基于 Huh-7 复制子细胞的活性测试中没有表现出任何抗 HCV 活性, 但安全性和 PK 特征较好。在人原代肝细胞中对化合物 **26** 的体外培养, 以及临床前其他物种的药代动力学研究, 共同揭示了 2'-脱氧-2'-螺氧杂环丁烷尿苷三磷酸 (**27**) 高水平的形成。**27** 是 HCV NS5B 聚合酶的有效抑制剂

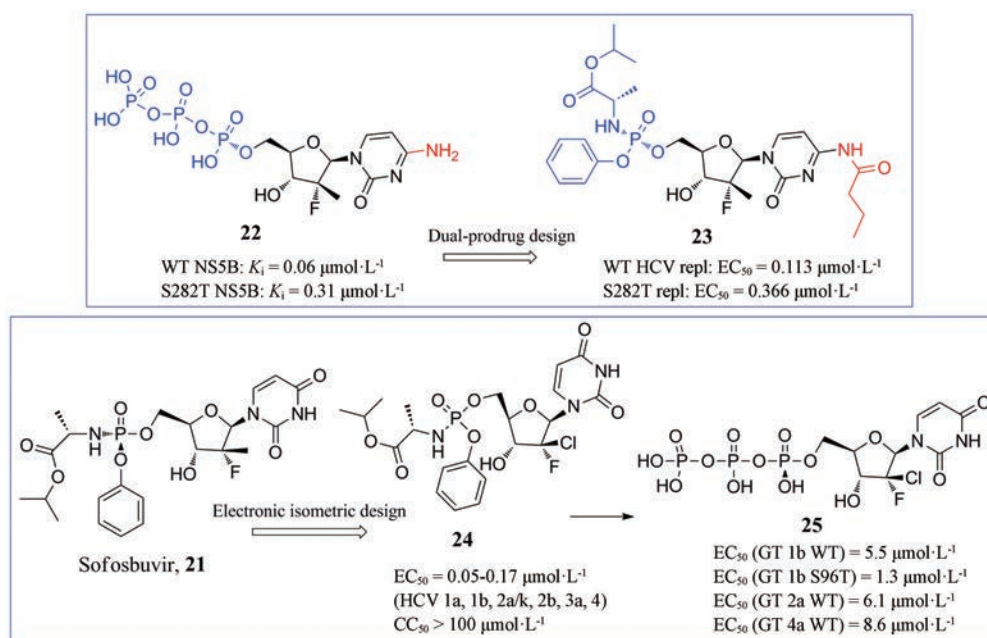


Figure 9 The structures of compounds 21–25

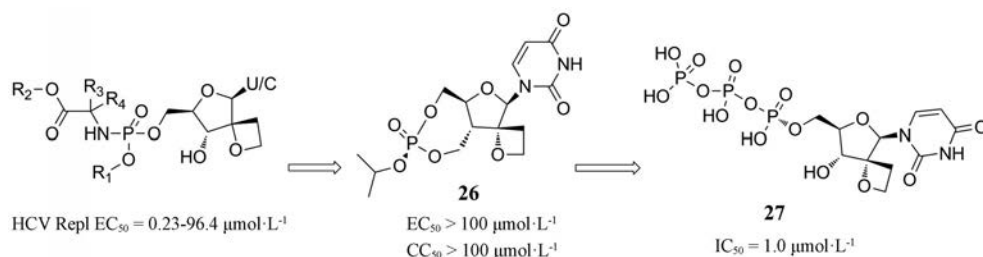


Figure 10 The structures of compounds 26 and 27

( $\text{IC}_{50} = 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (图 10)。特别是在建立的 HCV 感染 (GT-1a 和 3a) 的小鼠模型中, 口服给药 26 后观察到病毒 HCV RNA 的剂量依赖性减少。

## 2.2 非核苷类 NS5B 聚合酶抑制剂

非核苷类聚合酶抑制剂 (non-NPI, NNPI) 以非竞争方式与 NS5B 聚合酶催化部位的变构位点结合, 在延伸复合物形成前, 导致多聚蛋白复制复合体的重要构象发生改变, 从而抑制 NS5B 聚合酶活性中心的催化效率, 干扰病毒的体内复制过程。与核苷类聚合酶抑制剂相比, 非核苷类聚合酶抑制剂基因屏障较低, 容易发生耐药, 对 HCV 基因型也有选择性。这类 NS5B 抑制剂可能需要联合作用于其他靶点的抗 HCV 药物解决这些问题。该类抑制剂因结构不同又分为喹诺酮类、噻吩羧酸类、苯并咪唑酮等多种骨架抑制剂。

**2.2.1 喹诺酮类衍生物** 为了提高 2-芳基喹诺酮类非核苷类 NS5B 聚合酶抑制剂 28 和 29 的抗病毒活性, Cheng 等<sup>[30]</sup>通过分子杂合策略发现了 2-烷基-N-苄基喹诺酮类衍生物, 该类化合物的抗病毒活性提高, 尤其

以化合物 30 活性最好 (GT-2a Huh7.5.1 细胞,  $\text{EC}_{50} = 0.4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。但是这些多取代的喹诺酮具有不良药代动力学性质, 鉴于此, Cheng 等又通过骨架跃迁策略设计、合成一系列 1,6-二氮杂萘-4,5-二酮类衍生物以改善化合物的类药性, 代表化合物为 31 ( $\text{EC}_{50} = 2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) (图 11)。分子模拟表明: 2-烷基喹诺酮类和 1,6-二氮杂萘-4,5-二酮类衍生物均与 HCV NS5B 聚合酶的拇指 II 区 (Thumb II) 结合而发挥作用。

2015 年, Manfroni 等<sup>[31]</sup>设计、合成了一系列 6 氨基-7-[4-(2-吡啶基)-1-哌嗪基]喹诺酮类衍生物, 其中化合物 32 的活性与选择性最好, 抑制 NS5B 聚合酶的  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.069 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 在 GT-1b 细胞中抑制 HCV 复制的  $\text{EC}_{50}$  值为  $3.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 细胞毒性较低 ( $\text{CC}_{50} > 163 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

**2.2.2 噻吩羧酸类** Lomibuvir (33) 是结合 HCV NS5B 聚合酶 Thumb II 的非核苷类抑制剂, 为了改善其抗病毒活性和 PK 性质, Court 等<sup>[32]</sup>用甘氨酸衍生的酰胺取代 33 中的反式-4-羟基环己烷环, 得到与化合物

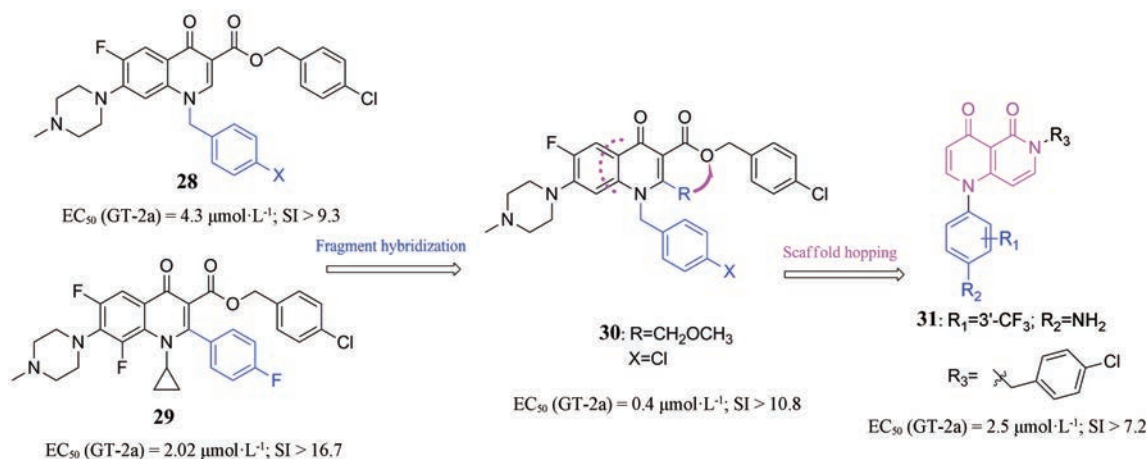
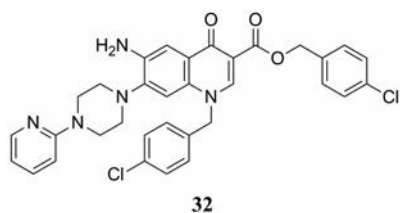


Figure 11 The structures of compounds 28–31



33 活性相当、物理化学性质改善的一系列化合物, 代表化合物为 34 (图 12)。

化合物 33 与 NS5B 聚合酶的晶体结构显示: 化合物 33 的反式-4-羟基环己基靠近形成结合口袋侧面的残基 Arg501。2017 年, Li 等<sup>[33]</sup>运用基于结构的药物设计和构象限制策略, 设计、合成一系列内酰胺类抑制

剂, 预期与 Arg501 残基产生额外的相互作用。发现化合物 35 相对化合物 33 的抑酶活性和抗病毒活性均提高了 3~5 倍, 验证了设计思想。此外, 化合物 35 具有类药性和与进一步开发所需参数一致的体内特征 (图 12)。

噻吩羧酸类化合物 36 是与 NS5B 蛋白酶 Thumb II 结合的抑制剂<sup>[34]</sup>。用内酰胺代替化合物 36 中酰胺使抑酶活性得到改善, 尤其是对复制子细胞的抑制活性得到很大的提升, 代表化合物为 37。为了减少化合物 37 对孕烷 X 受体 (PXR) 的活化, 进一步引入极性基团来破坏 PXR 配体结合口袋中疏水区域的相互作用, 发现化合物 38 不仅减少对 PXR 的活化而且保持细胞抑制活性, 同时该化合物还具有良好的 PK 性质 (图 13)。

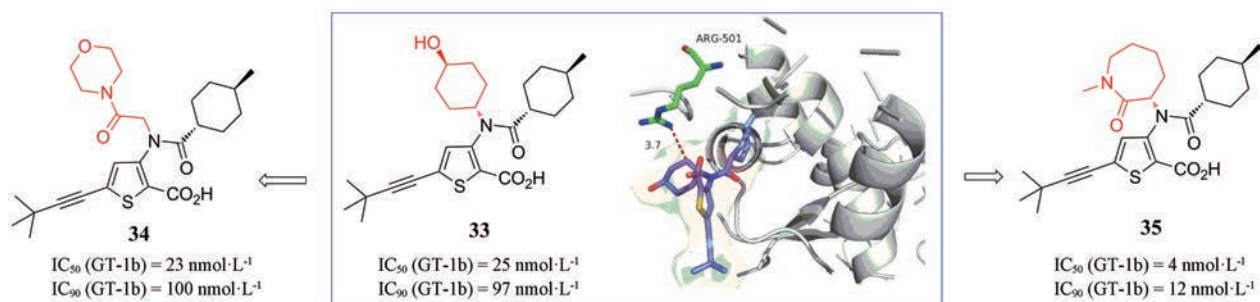


Figure 12 Model of 33 bound to HCV genotype 1b NS5B and derivatives (PDB: 2GIR)

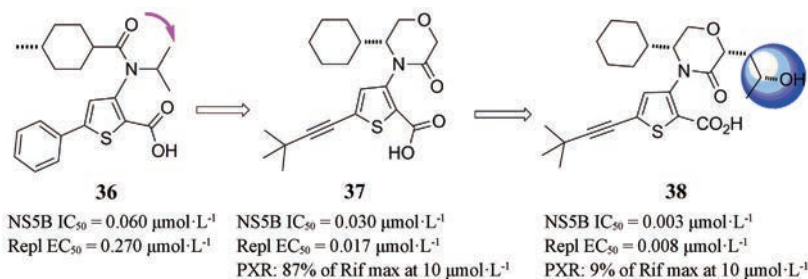
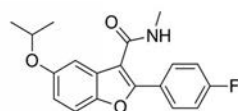
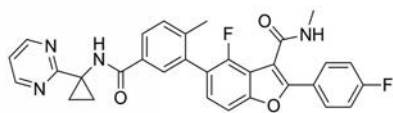


Figure 13 The structures of compounds 36–38

**2.2.3 苯并咪唑酮类** 苯并咪唑酮类化合物 **39** 是靶向 NS5B 手掌区的变构抑制剂, 抑酶活性及细胞水平的抗病毒活性均较弱。BMS 团队通过延长化合物 **39** 的 C5 位片段发现 BMS-929075 (**40**)<sup>[35]</sup>。除基因 2 型外, 化合物 **40** 对所有基因型表现出有效的 HCV 抑制作用, 且化合物 **40** 在 3 种临床前动物模型中表现出一致的高口服生物利用度 ( $F > 48\%$ )。此外, 通过使用稳定的无定形固体分散剂解决了 BCS II 类化合物的溶解度限制吸收的问题, 在健康志愿者完成单次递增剂量 (single ascend dose, SAD) 和多次递增剂量 (multiple ascend dose, MAD) I 期临床试验中发现 **40** 的 PK 性质优于预期, 表明化合物 **40** 具有一天给药一次的潜力。

**39**

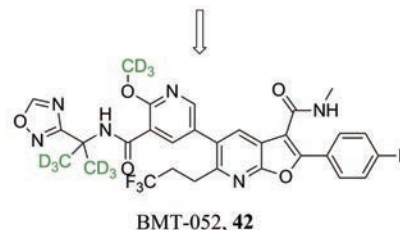
$EC_{50}$  (1a) = 11  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $EC_{50}$  (1b) = 14  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $IC_{50}$  = 21  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

**40**

$IC_{50}$  (5a) = 2  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $EC_{50}$  (1a) = 9  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $EC_{50}$  (1b) = 4  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $EC_{50}$  (3a) = 22  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $EC_{50}$  (4a) = 3  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $EC_{50}$  (6a) = 5  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $EC_{50}$  (1b C316N) = 18  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$   
 $EC_{50}$  (2b, 2a) = 115, 481  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

由于第二代泛基因型抑制剂 BMS-986139<sup>[36]</sup> (**41**) 在毒理学研究中出现的微晶化问题, 研究人员停止了对其进一步的研究。之后, BMS 团队通过在 BMS-986139 的 C5 苯环和酰胺取代基中添加氘原子发现 BMT-052 (**42**)<sup>[37]</sup>, 化合物 **42** 是有效的泛基因型 HCV 抑制剂, 对基因 1-6 型以及 1b C316N 突变株的  $EC_{50}$  值为 1~7  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 在 3 种临床前物种中表现出良好口服生物利用度 ( $F > 85\%$ )。

2-亚苄基苯并咪唑-3(2H)-酮是强效的黄酮类 HCV 小分子抑制剂, 该类衍生物的结合位点位于拇指 I 区 (Thumb I)。由于发现 Thumb I 具有未开发的疏水区域, 可容纳更大的结构。Meguellati 等<sup>[38]</sup> 假设二聚体橙酮比单体衍生物能更好的结合 Thumb I, 将会产生更高的抑制活性。因此, 设计合成一系列连接链不同的二聚体橙酮作为 NS5B 聚合酶抑制剂的新型骨架。通过 NS5B 酶活测试, 发现大多数衍生物抑酶水平在微摩尔级别, 其中, 化合物 **43** 抑酶活性最高 ( $IC_{50} = 1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。

BMS-986139, **41**BMT-052, **42**

但是分子模拟表明 **43** 的结合位点可能是 Palm I, 而不是单体衍生物结合的 Thumb I。

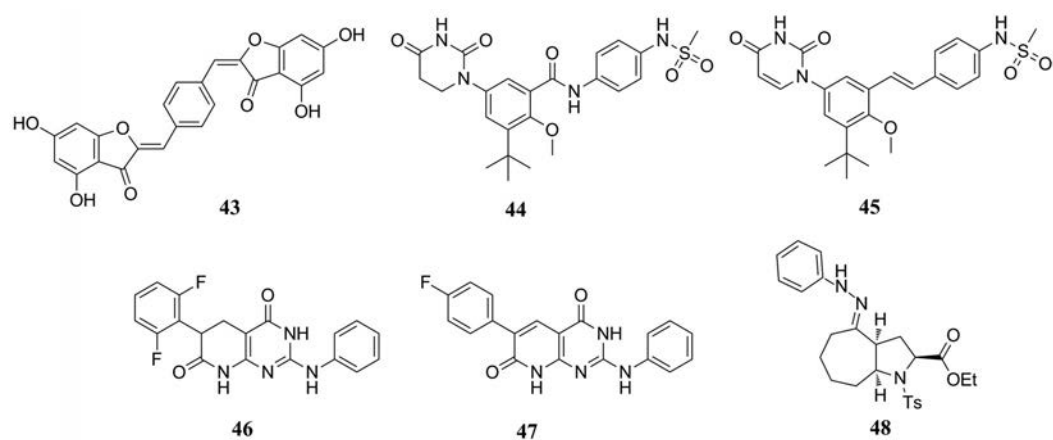
**2.2.4 其他结构类型的 NS5B 聚合酶抑制剂** 二氢尿嘧啶类似物 **44** 是一种有效的 GT-1a 和 1b 聚合酶抑制剂,  $EC_{50}$  值分别为 51 和 19  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 然而, 化合物 **44** 的血浆清除率高和口服生物利用度低 ( $F = 1.4\%$ )。用反式烯烃取代 **44** 中的酰胺键能改善化合物的 PK 性质, 在此基础上, AbbVie 团队继续用 N-连接的尿嘧啶代替二氢尿嘧啶得到 ABT-072 (**45**), 其对 GT-1a 和 1b 的  $EC_{50}$  值分别为 1 和 0.3  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且血浆半衰期延长, 口服生物利用度提高到 44%。ABT-072 与 ritonavir 和利巴韦林联合治疗基因 1 型患者的 II 期临床研究中, 91% 的患者在治疗 24 周后获得持续病毒学应答 (SVR<sub>24</sub>), 证明了 ABT-072 联合用药治疗基因 1 型 HCV 患者的有效性<sup>[39]</sup>。

Camarasa 等<sup>[40]</sup> 利用吉利德公司报道的一系列 HCV 抑制剂—吡啶并 [3,2-d] 咪唑的结构信息, 设计合成了吡啶并 [2,3-d] 咪唑-7(8H)-酮化合物。通过含有 HCV 亚型 1b 复制子的稳定细胞系测定  $EC_{50}$ , 发现 **46** 和 **47** 表现出很好的活性 ( $EC_{50}$  值分别为 0.027 和 0.034  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和高选择性 (SI = 196, 397)。分子模拟揭示 **46** 和 **47** 通过与变构位点结合抑制 NS5B 聚合酶。

Kaushik-Basu 等<sup>[41]</sup> 报道的双环八氢环庚并 [b] 吡咯-4(1H)-酮类衍生物对 HCV 基因 1b 和 2a 型复制子具有抑制活性。化合物 **48** 是最有效的衍生物, 对基因 1b 和 2a 型的  $EC_{50}$  值分别为 1.8 和 4.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 并且毒性很小 ( $CC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。初步的构效关系研究证实这类衍生物的酯功能与顺式稠合环结合是获得基因 1b 和 2a 型抗病毒活性的基本特征。

### 3 NS5A 抑制剂

HCV NS5A 蛋白是由 447 个氨基酸组成的高度磷酸化蛋白, 包括 3 个结构域。其中, 结构域 1 对 HCV 基因组的复制是必不可少的, 是药物设计的关注重点; 结



构域2和3在RNA复制和病毒颗粒组装环节中发挥重要作用。

NS5A上丝氨酸残基产生两种磷酸化程度不同的蛋白,即基础磷酸化p56和高度磷酸化p58,均在HCV的生命周期中发挥重要作用。研究发现,NS5A可与HCV RNA、NS5B等组成复制复合体,完成HCV复制;NS5A亦可通过与NS5B作用刺激NS5B合成负链RNA。此外,NS5A可通过其上的IFN敏感决定区与IFN刺激产生RNA依赖型蛋白激酶结合,通过抑制其活性来调节对IFN $\alpha$ 应答。NS5A功能的重要性和多样性使其成为抗HCV的重要靶点。且随着daclatasvir (DSV, **49**)的发现,NS5A抑制剂吸引了更多的关注,最显著的特征是这类抑制剂对HCV各个基因型均有较好的抗病毒效果<sup>[3]</sup>。

### 3.1 Daclatasvir (DSV) 类似物的研究

DSV是由施贵宝研发的第一个对基因1-5型HCV均表现出显著抑制活性( $EC_{50} = 9 \sim 146 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的NS5A抑制剂<sup>[42]</sup>,于2015年获美国FDA批准上市。

目前,研究人员已经开发了许多与DSV结构类似的NS5A抑制剂,并且在体外显示出纳摩尔和皮摩尔抗HCV活性<sup>[43-49,50]</sup>。这些抑制剂的结构可分为3个部分:两个对称或非对称的氨基酸或肽的基团(cap i、cap j)与不同类型和长度的中心结构域(core)。依据这个药效团模型,以DSV作为对照,根据结构变化的区域,将本文的DSV类似物分为以下3类进行论述(图14)。

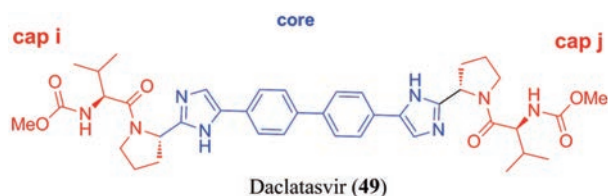


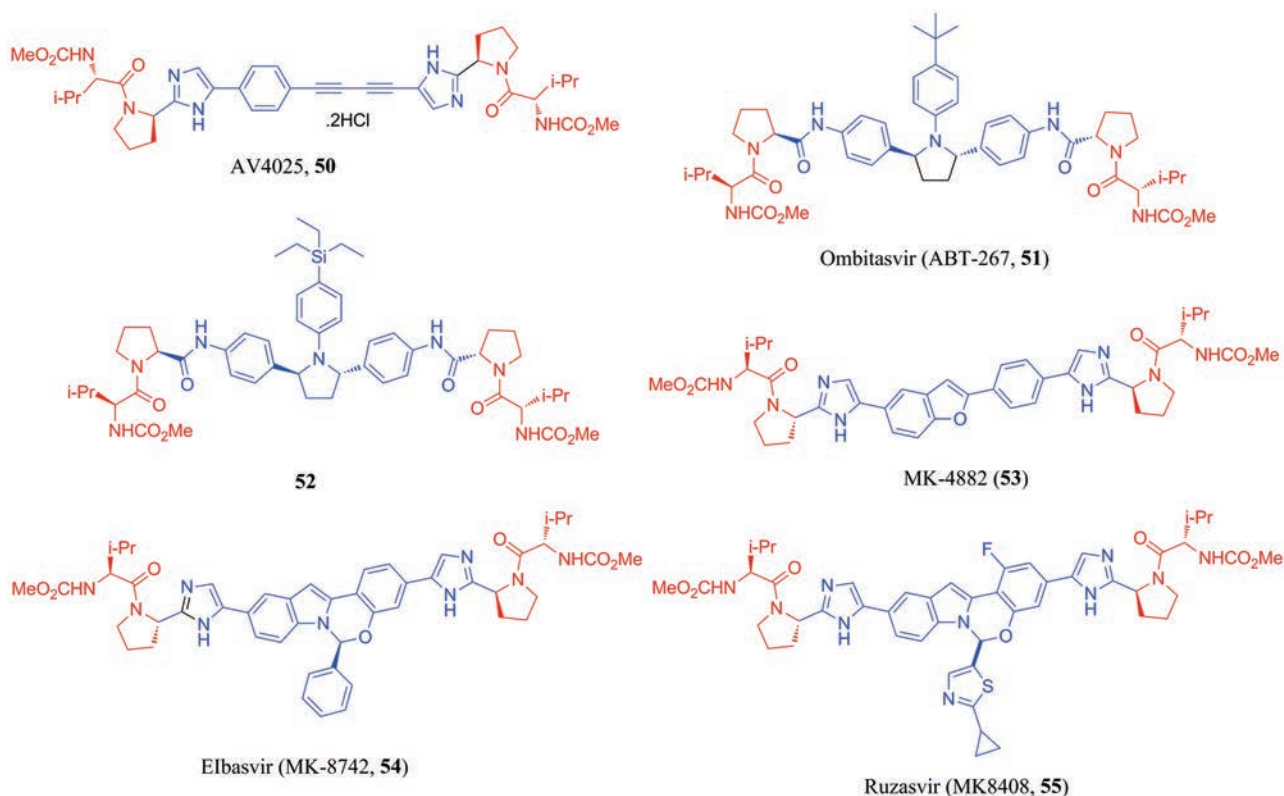
Figure 14 The structure of daclatasvir

**3.1.1 中心结构改变的类似物** 2014年,AllaChem公司使用二乙炔苯基结构代替DSV的中心区域得到的化合物AV4025(**50**)<sup>[51]</sup>,其具有4个(S)手性中心,改变任一个构型都能使活性降低。化合物**50**对GT-1a、2a和4a的 $EC_{50}$ 值分别为59、51和 $6.5 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,此外,化合物**50**在动物实验中表现出良好的PK性质,且其在啮齿动物中耐受良好(在雄性小鼠中, $LD_{50} \geq 3435.4 \pm 502.3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。化合物**50**对HCV感染的I/II期临床试验结果乐观,但未见后续报道。

AbbVie公司用反式-2,5-二苯基-N-(4-叔丁基)苯基吡咯烷代替DSV中心区域得到ombitasvir (ABT-267, **51**)。Ombitasvir对GT 1-5 HCV都显示出比DSV更强的体外抑制活性( $EC_{50} = 1.7 \sim 19.3 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),并且口服给药后在人体内半衰期长达约30 h<sup>[52]</sup>。2014年12月复方制剂Viekira Pa (ombitasvir/paritaprevir/ritonavir与dasabuvir的组合)被FDA批准上市,并且可用于伴有肝硬化的患者。

将硅原子结合到药物分子中可以影响并且改善生物活性和ADMET性质<sup>[53-55]</sup>,其作为一种具有潜力的药物设计策略已引起关注。2018年,Liu等<sup>[56]</sup>基于ombitasvir,采用C-Si转换策略得到一系列含硅衍生物。其中,化合物**52**与ombitasvir相比,对HCV GT 1-5的活性都有所增加( $EC_{50} = 0.1 \sim 10 \text{ pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),特别是对GT-3a的抑制活性增加了7倍以上。此外,化合物**52**在动物实验中表现出优异的PK性质和肝靶向性,且在14天的重复剂量毒性研究中未观察到**52**的毒性。

Merck公司在MK-4882(**53**)的基础上,通过构象限制策略将苯并咪唑与苯环连成环,并在环上引入苯基取代得到Elbasvir (MK-8742, **54**),**54**对GT1-4 HCV都有很好的抑制效果,与已经上市的DSV和ledipasvir相比,对多种耐药毒株的活性也表现更佳<sup>[57]</sup>。Elbasvir与grazoprevir组成的复方单片,每日一次口服给药12周用于治疗HCV GT-1、4和6的感染者,GT-1、4和6的



SVR<sub>12</sub>分别为94.4%、95.5%和96.4%<sup>[58]</sup>。这一复方单片于2016年1月被FDA批准上市用于治疗HCV GT-1和4的慢性感染。

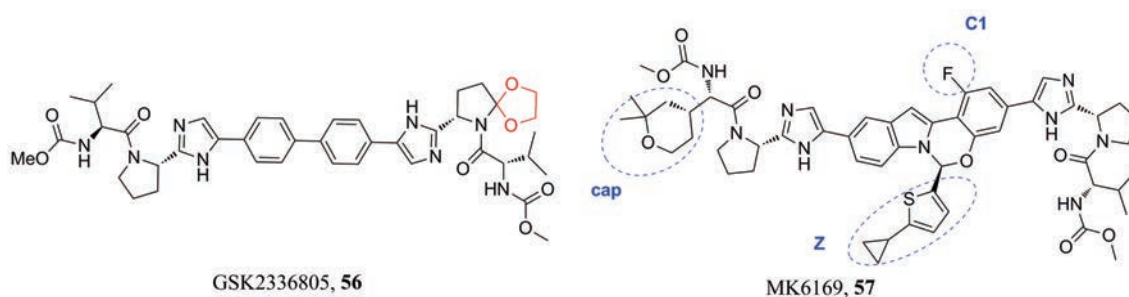
2017年, Tong等<sup>[59]</sup>运用电子等排策略将elbasvir苯环替换为噻唑环衍生物得到MK-8408 (ruzasvir, **55**), 其具有泛基因型活性, 对基因1-6型的EC<sub>90</sub>值为0.002~11 nmol·L<sup>-1</sup>, 且显示出对GT1a Y93H、L31V和GT2b (31M) 等多个突变株活性改善, EC<sub>90</sub>值为0.002~0.067 nmol·L<sup>-1</sup>。在ruzasvir与uprifosbuvir联合用药的III期临床试验中, ruzasvir 180 mg加uprifosbuvir 450 mg治疗HCV GT1、GT2、GT4、GT5和GT6感染者SVR<sub>12</sub>均高于90.9%, 且耐受性良好, 但对GT3感染者的疗效较低 (SVR<sub>12</sub> = 73.8%)<sup>[60]</sup>。

**3.1.2 仅在两翼改变的类似物** 2014年, Kazmierski等<sup>[61]</sup>通过在DSV的一侧翼端的吡咯烷上引入氧杂螺环结构得到化合物GSK2336805 (JNJ56914845, **56**), 化合物**56**对基因1a和1b型表现出皮摩尔抑制活性 (EC<sub>50</sub>值分别为10.4和11.1 pmol·L<sup>-1</sup>), 对1b的野生株和L28V、L31V和Y93H突变株也显示出良好的活性 (EC<sub>50</sub> = 10.6~11.1 pmol·L<sup>-1</sup>)。JNJ56914845与simeprevir、ritonavir组成的3-DAA方案在治疗基因1a与1b型患者的II期临床试验中, 分别有100%和93%的患者获得了持续病毒学应答 (SVR<sub>12</sub>)。此外, Vijgen等<sup>[62]</sup>发现: 在大多数患者中, 3-DAA组合治疗失败与所研究

药物的耐药相关变异 (resistance-associated variants, RAVs) 的出现相关, 且在研究中观察到NS5A中的JNJ-56914845 RAV。

**3.1.3 中心结构和两翼均改变的衍生物** Yu等通过对elbasvir进行多样性修饰得到以下构效关系: ① 在“帽” (cap) 中引入四氢-2H-吡喃 (THP) 基团<sup>[63]</sup>可以改善对GT2b L31M的活性; ② 四环吡啶核心的C-1位置为氟原子<sup>[64]</sup>可以改善对RAVs, 如GT1a Y93H和GT2b L31M的活性; ③ Z基团为4-环丙基苯基、4-二苯基<sup>[65]</sup>和7'-苯并二氢吡喃<sup>[66]</sup>等大芳香基团或者取代的噻唑和噻吩也提高对RAV的活性。Yu等将这些优势基团进行组合, 发现强效和泛基因型NS5A抑制剂MK-6169 (**57**), 对基因1a、1b、3a和4a型复制子的EC<sub>90</sub>值分别为4、4、1和6 nmol·L<sup>-1</sup>, 对GT1a Y93H和GT2b L31V的EC<sub>90</sub>分别为0.033和0.004 nmol·L<sup>-1</sup>, 同时该化合物还具有良好的PK特征。MK-6169作为临床前候选物得到进一步开发<sup>[67]</sup>。

Bae等<sup>[68]</sup>设计、合成了一系列具有联苯胺脲酰胺核心结构的抑制剂。构效关系显示: 末端基团为苯基甘氨酸的抑制剂具有较高活性, 其中化合物BMK-20113 (**58**) 活性最高, 对基因2a和1b型的EC<sub>50</sub>值分别为0.26和0.028 nmol·L<sup>-1</sup>。随后对化合物**58**进行心脏毒性、大鼠血浆稳定性和CYP450酶抑制活性研究, 表明化合物**58**是安全有效的 (图15)。



2015年, Bae等<sup>[69]</sup>对化合物**58**进行新一轮修饰以提高其抗病毒活性, 用各种脯氨酸等排体代替L-脯氨酸, 联苯胺替换为取代的联苯胺衍生物得到一系列化合物。发现在联苯胺核心结构嵌入间位取代的抑制剂表现出最有效的抗HCV活性。其中, 化合物**59**不仅具有改善的抗病毒活性, 对基因2a和1b型的 $EC_{50}$ 值分别为0.059和0.003  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 且对于真核细胞无毒并且通过Ames试验证明其不具有基因毒性。

2017年, You等<sup>[70]</sup>又设计将二芳基砜或硫酸盐嵌入到**58**的核心结构中并与咪唑或者酰胺部分相连接得到一系列新型强效的NS5A抑制剂。对核心结构各种取代模式的抑制剂进行SARs研究, 发现基于二芳基硫酸酯核心的含有酰胺部分(化合物**60**)或咪唑部分(化合物**61**)的间位双取代的抑制剂表现出极高的活性, 化合物**60**和**61**对基因1b、2a型的 $EC_{50}$ 值分别为19.8、19.9和32.3、882  $\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。并且通过hERG配体

结合试验和Ames试验分别证明没有心脏毒性和诱变潜力。此外, 这些化合物与NS5B靶向药物sofosbuvir联合治疗显示出协同效应。

在一项初步研究中, Yeh等<sup>[71]</sup>观察到用疏水噻唑环取代DSV的两个咪唑环得到的化合物**62**具有中等的GT-1b抑制活性( $EC_{50}$ 为56.3  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 但是毒性小( $CC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )。为了改善活性, 对其两翼进行结构修饰, 合成了一系列结构相关的二聚苯基噻唑衍生物, 并评价它们对GT-1b的抑制活性。结果表明几种化合物抑制GT-1b的活性达皮摩尔级, 其中, 环丙基酰胺衍生物**63**是GT-1b复制子( $EC_{50} = 0.003 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )的最佳抑制剂, 并在大鼠和犬中口服给药后显示出优异PK性质。

Pibrentasvir (ABT-530, **64**)是AbbVie公司继ombitasvir之后研发的第2代NS5A抑制剂, 其在ombitasvir的吡咯烷的N-1位苯基上连接了吸电性和极性都明

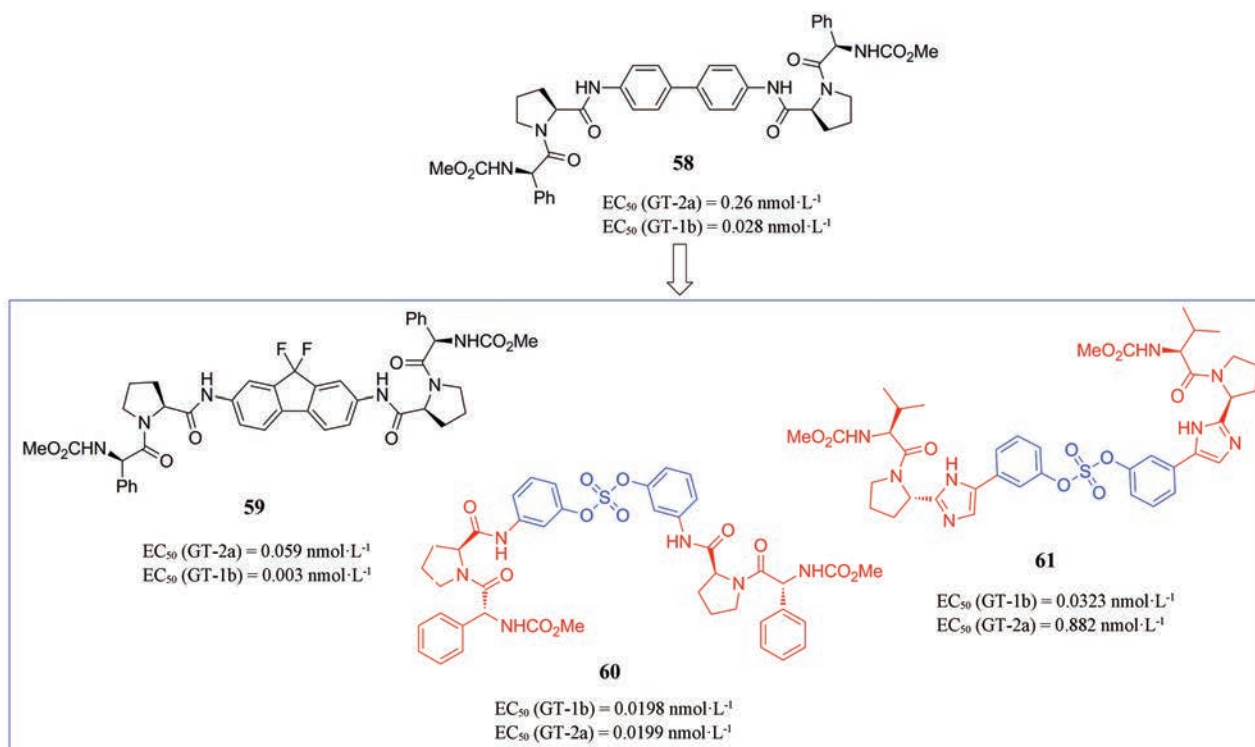
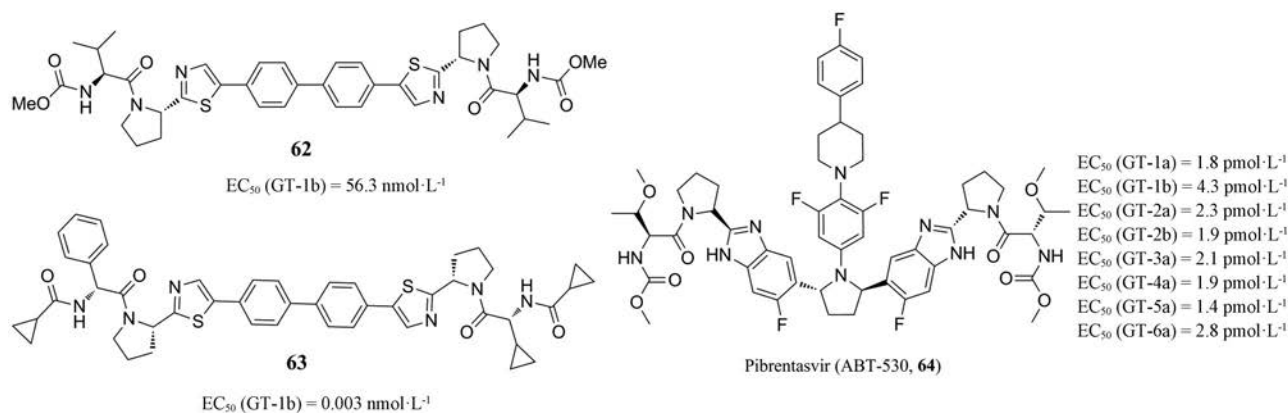


Figure 15 The structural evolution of compounds **58**–**61**



显增强的取代基,同时将酰胺进行成环优化形成苯并咪唑的结构。Pibrentasvir对HCV GT1-6的体外抑制活性有了进一步的提高( $EC_{50} < 5$  pmol·L<sup>-1</sup>),同时对现有的多种NS5A抑制剂耐药变异毒株的抑制活性也在低皮摩尔水平<sup>[72]</sup>。Pibrentasvir和NS3/4A蛋白酶抑制剂glecaprevir联合应用的III期临床试验结果表明:在1 819名患者中用药,治疗依从性和完成度均较高( $\geq 96\%$ ),并且SVR<sub>12</sub>大于93%,与药物相关的严重不良反应和导致治疗中断的不良反应的发生率较低( $\leq 1\%$ )<sup>[73]</sup>。

### 3.2 其他结构类型的HCV NS5A抑制剂

Ledipasvir、ombitasvir和daclatasvir是HCV NS5A的有效抑制剂,其具有大分子量的杂二聚体和同二聚体结构。由于其结构复杂和难以合成,这类HCV NS5A抑制剂具有极高成本。为了简化化学结构已设计、合成和评价了几种杂环化合物。以其中的4-苯基噻唑**65**( $EC_{50} = 9440$  nmol·L<sup>-1</sup>)为先导化合物,在**65**的噻唑和吡咯烷环之间引入酰胺基团得到化合物**66**。化合物**66**活性显著增加( $EC_{50} = 0.92$  nmol·L<sup>-1</sup>),但是化合物**66**的PK性质一般,并且在大鼠实验中口服生物利用度低( $F = 18.7\%$ )。进一步优化噻唑环4位和吡咯烷氮上取代基,发现化合物**67**是高效和选择性NS5A抑制剂( $EC_{50} = 4.6$  nmol·L<sup>-1</sup>),具有更高的治疗指数( $SI > 10\ 000$ )。在大鼠口服给药后,化合物**67**表现

出良好的口服生物利用度( $F = 45\%$ )<sup>[74]</sup>(图16)。

### 4 基于PROTAC技术的新药物设计策略

PROTAC (Proteolysis targeting chimeras) 分子是一种双功能小分子,可以同时结合靶蛋白和E3-泛素连接酶,从而引起蛋白酶对靶蛋白的泛素化和降解<sup>[75]</sup>(图17)。与普通小分子抑制剂相比,PROTAC有以下多种优点:作用靶点广泛,可以用于一些不可成药靶点;用量小,催化量的药物就可以产生很好的药理活性且选择性高;毒副作用小,较低的药物剂量降低了脱靶效应产生的可能性,提高了安全性。对于抗病毒方面来说,PROTAC策略还有一个特别的优势,通过直接将靶蛋白降解,克服靶蛋白突变/过表达引起的耐药问题。该原理已成功应用于激酶(RIPK2、BTK、BCR-ABL和CDK9)和转录酶(BRD4、BRD9和TRIM24)等。

Telaprevir (VX-950, **68**)是第一代NS3/4A蛋白酶抑制剂,但是这类蛋白酶抑制剂的耐药屏障很低,服药之后在患者体内出现多个耐药突变株。2019年,De Wispelaere等<sup>[76]</sup>选择telaprevir作为与NS3/4A蛋白酶结合的配体。通过telaprevir与蛋白酶的高分辨晶体结构发现,telaprevir的吡嗪环处于蛋白溶剂界面,选择将吡嗪环作为与E3泛素连接酶的连接位点,来避免连接链阻碍配体与靶蛋白之间的相互作用。基于以上研究,他们通过使用不同的连接链来连接telaprevir与E3泛素连接酶底物CRBN,设计了一系列小分子,并证实了它

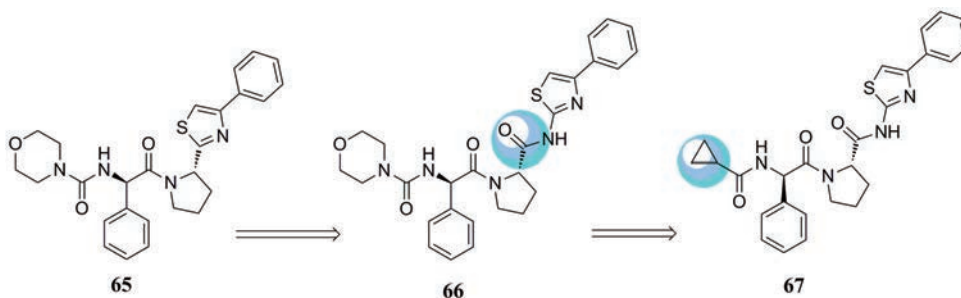


Figure 16 The structural evolution of compounds 65–67

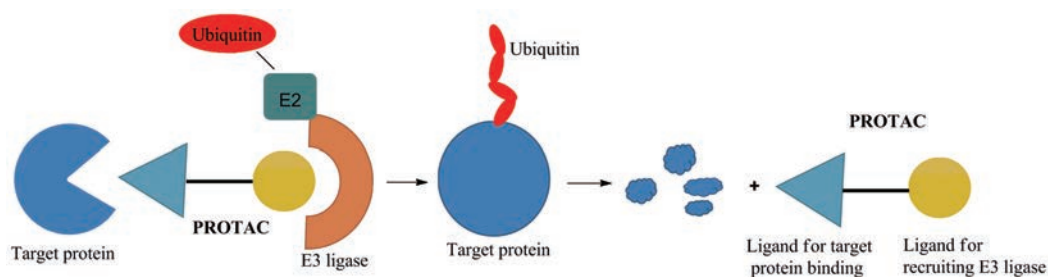
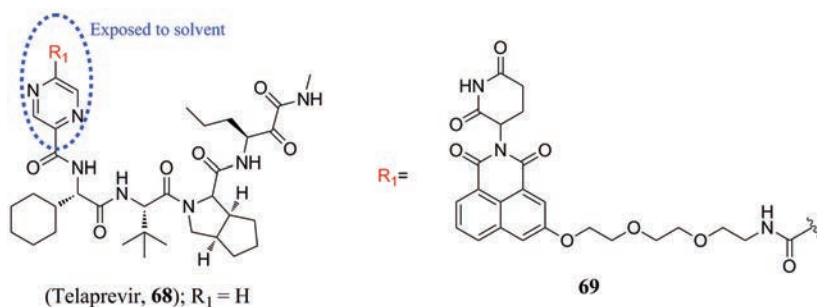


Figure 17 Schematic of the PROTAC technology



们与 NS3 的靶向结合以及 CRBN 依赖性的降解机制。其中, 最佳化合物 **69** 能够选择性诱导快速和持续的蛋白酶体介导的 NS3 降解 (4 小时  $DC_{50}$  为  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $DC_{50}$  为 NS3-eGFP 荧光降低 50% 的浓度), 此外, 化合物 **69** 不仅具有最强的抗病毒活性还保留对 NS3 的耐药突变株 (V55A 和 A156S) 的抑制活性。这证实了 PROTAC 小分子不易受配体结合位点突变的影响, 因此可以用来抑制对常规药物耐药的病毒突变株。

## 5 总结与展望

目前 HCV 治疗方案主要是基于几种不同作用方式的 DAA 组合, 组合法具有治愈率高、治疗周期短以及耐药屏障高等优点, 但是其价格昂贵且仍然存在耐药等问题。本文从药物化学的角度总结了治疗 HCV 感染的 DAA 研究的最新进展。基于化合物库的高通量筛选 (high-throughput screening, HTS) 以及从天然产物中寻找具有抗 HCV 活性的化合物是发现抗 HCV 先导化合物的重要途径。这些先导化合物基于配体结构相似性等, 通过分子杂合、生物电子等排、骨架跃迁等药物化学策略进行修饰优化; 对于已经发现的针对某确定靶点的先导化合物, 通过对其结合模式的研究, 运用基于结构的合理药物设计方法如底物包膜假说等策略进行优化; 基于先导化合物的体内代谢和活性转化的前药策略以及基于体内泛素化蛋白降解机制的 PROTAC 策略也用于抗 HCV 先导化合物的优化中。以上几种针对性修饰先导化合物的药物化学策略已经成为发展抗 HCV 药物的重要途径。通过系统的药代动力学、药效学和毒理学评价新衍生物, 最终筛选出候

选药物。

虽然现在已经发展出许多抗 HCV 耐药屏障高、疗效好的临床药物, 然而, 目前针对 HCV 的治疗仍然存在一些挑战, 第一个挑战是对于难以治疗的人群缺少有效的治疗方案, 比如 HCV 感染的终末期肾病患者、肾移植前后的 HCV 感染患者和 HCV 感染的代偿性与失代偿性肝硬化患者等; 第二个是缺少耐药屏障高的泛基因型药物, 一方面是 Epclusa<sup>®</sup> 是唯一被批准用于治疗 GT1 至 GT6 感染的疗法; 另一方面, 耐药性仍然是一个问题, 特别是 NS5A 耐药相关变异对治疗结果产生了消极影响<sup>[6]</sup>。令人欣慰的是, 目前 FDA 批准的药物和有希望的临床前候选药物已经为大多数患者的 HCV 感染提供了强有力的后盾。另外, 靶向于新靶点的抑制剂, 如靶向 HCV 蛋白 (E1/E2、p7 和 NS4B) 与靶向人蛋白 (例如亲环蛋白 A、细胞周期蛋白 G 相关激酶和清道夫受体 B1) 的抑制剂; 以及具有新作用机制的抑制剂, 如 PROTAC 小分子, 有望解决以上难题, 这将会给 HCV 治疗带来新的突破。

相信在不远的将来, 随着更多高效低毒药物的出现, 全球 HCV 感染者将大幅减少, 根治 HCV 感染的目标终会全面实现。

## References

- [1] World Health Organization. Hepatitis C [EB/OL]. 2018 [2019-10]. <http://www.searo.who.int/thailand/factsheets/fs0018/en/>.
- [2] Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, et al. Overview of HCV life cycle with a special focus on current and possible future anti-

- viral targets [J]. *Viruses*, 2019, 11: 30.
- [3] Wang J, He XY. Anti-hepatitis C virus drugs: research advances [J]. *J Int Pharm Res*(国际药学研究杂志), 2015, 42: 551-560.
- [4] Manns MP, Foster GR, Rockstroh JK, et al. The way forward in HCV treatment--finding the right path [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 991-1000.
- [5] Zając M, Muszalska I, Sobczak A, et al. Hepatitis C - new drugs and treatment prospects [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 165: 225-249.
- [6] Li G, De Clercq E. Current therapy for chronic hepatitis C: The role of direct-acting antivirals [J]. *Antiviral Res*, 2017, 142: 83-122.
- [7] Horner SM, Gale M. Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus [J]. *Nat Med*, 2013, 19: 879-888.
- [8] Hayes CN, Chayama K. Emerging treatments for chronic hepatitis C [J]. *J Formos Med Assoc*, 2015, 114: 204-215.
- [9] Rusere LN, Matthew AN, Lockbaum GJ, et al. Quinoxaline-based linear HCV NS3/4A protease inhibitors exhibit potent activity against drug resistant variants [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 691-696.
- [10] Wang AX, Chen J, Zhao Q, et al. Structure-activity relationships of 4-hydroxy-4-biaryl-proline acylsulfonamide tripeptides: a series of potent NS3 protease inhibitors for the treatment of hepatitis C virus [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 590-596.
- [11] Scola PM, Sun LQ, Wang AX, et al. The discovery of asunaprevir (BMS-650032), an orally efficacious NS3 protease inhibitor for the treatment of hepatitis C virus infection [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1730-1752.
- [12] Gising J, Belfrage AK, Alogheli H, et al. Achiral pyrazinone-based inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease and drug-resistant variants with elongated substituents directed toward the S2 pocket [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1790-1801.
- [13] Belfrage AK, Abdurakhmanov E, Åkerblom E, et al. Pan-NS3 protease inhibitors of hepatitis C virus based on an R3-elongated pyrazinone scaffold [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 148: 453-464.
- [14] Zheng B, D'Andrea SV, Sun LQ, et al. Potent inhibitors of hepatitis C virus NS3 protease: employment of a difluoromethyl group as a hydrogen-bond donor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2018, 9: 143-148.
- [15] Shah U, Jayne C, Chackalamannil S, et al. Novel quinoline-based P2-P4 macrocyclic derivatives as pan-genotypic HCV NS3/4a protease inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2014, 5: 264-269.
- [16] Neelamkavil SF, Agrawal S, Bara T, et al. Discovery of MK-8831, a novel spiro-proline macrocycle as a pan-genotypic HCV-NS3/4a protease inhibitor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 7: 111-116.
- [17] Velázquez F, Chelliah M, Clasby M, et al. Design and synthesis of P2-P4 macrocycles containing a unique spirocyclic proline: a new class of HCV NS3/4A inhibitors [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2016, 7: 1173-1178.
- [18] Pawlotsky JM. Hepatitis C virus resistance to direct-acting antiviral drugs in interferon-free regimens [J]. *Gastroenterology*, 2016, 151: 70-86.
- [19] Matthew AN, Zephyr J, Hill CJ, et al. Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors incorporating flexible P2 quinoxalines target drug resistant viral variants [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5699-5716.
- [20] Yang H, Yang C, Wang Y, et al. Preclinical characterization of the novel HCV NS3 protease inhibitor GS-9256 [J]. *Antiviral Ther*, 2017, 22: 413-420.
- [21] Sheng XC, Casarez A, Cai RC, et al. Discovery of GS-9256: a novel phosphinic acid derived inhibitor of the hepatitis C virus NS3/4A protease with potent clinical activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 1394-1396.
- [22] Bowsher M, Hiebert S, Li R, et al. The discovery and optimization of naphthalene-linked P2-P4 Macrocycles as inhibitors of HCV NS3 protease [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2018, 28: 43-48.
- [23] Watkins WJ, Ray AS, Chong LS. HCV NS5B polymerase inhibitors [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2010, 13: 441-465.
- [24] Membreno FE, Lawitz EJ. The HCV NS5B nucleoside and non-nucleoside inhibitors [J]. *Clin Liver Dis*, 2011, 15: 611-626.
- [25] Hedskog C, Dvory-Sobol H, Gontcharova V, et al. Evolution of the HCV viral population from a patient with S282T detected at relapse after sofosbuvir monotherapy [J]. *J Viral Hepat*, 2015, 22: 871-881.
- [26] Zhen L, Dai L, Wen X, et al. Discovery of novel nucleotide prodrugs with improved potency against HCV variants carrying NS5B S282T mutation [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 6077-6088.
- [27] Zhou S, Mahmoud S, Liu P, et al. 2'-Chloro,2'-fluoro ribonucleotide prodrugs with potent pan-genotypic activity against hepatitis C virus replication in culture [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 5424-5437.
- [28] Jonckers TH, Vandyck K, Vandekerckhove L, et al. Nucleotide prodrugs of 2'-deoxy-2'-spirooxetane ribonucleosides as novel inhibitors of the HCV NS5B polymerase [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1836-1844.
- [29] Jonckers TH, Tahri A, Vijgen L, et al. Discovery of 1-((2*R*,4*aR*,6*R*,7*R*,7*aR*)-2-isopropoxy-2-oxidodihydro-4*H*,6*H*-spiro[furo[3,2-*d*][1,3,2]dioxaphosphinine-7,2'-oxetan]-6-yl)pyrimidine-2,4(1*H*,3*H*)-dione (JNJ-54257099), a 3'-5'-cyclic phosphate ester prodrug of 2'-deoxy-2'-spirooxetane uridine triphosphate useful for HCV inhibition [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 5790-5798.
- [30] Cheng Y, Shen J, Peng RZ, et al. Structure-based optimization and derivatization of 2-substituted quinolone-based non-nucleoside HCV NS5B inhibitors with submicromolar cellular replicon potency [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 2900-2906.
- [31] Manfroni G, Cannalire R, Barreca ML, et al. The versatile nature of the 6-aminoquinolone scaffold: identification of submicromolar hepatitis C virus NS5B inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2014, 57:

- 1952-1963.
- [32] Court JJ, Poisson C, Ardzinski A, et al. Discovery of novel thiophene-based, thumb pocket 2 allosteric inhibitors of the hepatitis C NS5B polymerase with improved potency and physicochemical profiles [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 6293-6302.
- [33] Li P, Dorsch W, Lauffer DJ, et al. Discovery of novel allosteric HCV NS5B inhibitors. 2. Lactam-containing thiophene carboxylates [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8: 251-255.
- [34] Barnes-Seeman D, Boiselle C. Design and synthesis of lactam-thiophene carboxylic acids as potent hepatitis C virus polymerase inhibitors [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 3979-3985.
- [35] Yeung KS, Beno BR, Parcella K, et al. Discovery of a hepatitis C Virus NS5B replicase palm site allosteric inhibitor (BMS-929075) advanced to Phase 1 clinical studies [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 4369-4385.
- [36] Eastman KJ, Parcella K, Yeung KS, et al. The discovery of a pan-genotypic, primer grip inhibitor of HCV NS5B polymerase [J]. *Med Chem Commun*, 2017, 8: 796-806.
- [37] Parcella K, Eastman K, Yeung KS, et al. Improving metabolic stability with deuterium: the discovery of BMT-052, a pan-genotypic HCV NS5B polymerase inhibitor [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8: 771-774.
- [38] Meguellati A, Ahmed-Belkacem A, Nurisso A, et al. New pseudodimeric auronones as palm pocket inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 115: 217-229.
- [39] Randolph JT, Krueger AC, Donner PL, et al. Synthesis and biological characterization of aryl uracil inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase: discovery of ABT-072, a *trans*-stilbene analog with good oral bioavailability [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 1153-1163.
- [40] Camarasa M, Puig de la Bellacasa R, González ÀL, et al. Design, synthesis and biological evaluation of pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-(8H)-ones as HCV inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 115: 463-483.
- [41] Kaushik-Basu N, Ratmanova NK, Manvar D, et al. Bicyclic octahydrocyclohepta [b]pyrrol-4(1H)-one derivatives as novel selective anti-hepatitis C virus agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2016, 122: 319-325.
- [42] Belema M, Meanwell NA. Discovery of daclatasvir, a pan-genotypic hepatitis C virus NS5A replication complex inhibitor with potent clinical effect [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 5057-5071.
- [43] Bachand C, Belema M, Deon DH, et al. Hepatitis C virus inhibitors: US, 021927 [P]. 2008-11-27.
- [44] Bachand C, Belema M, Deon DH, et al. Hepatitis C virus inhibitors: US, 021928 [P]. 2008-12-04.
- [45] Bachand C, Belema M, Deon DH, et al. Hepatitis C virus inhibitors: US, 021936 [P]. 2008-12-18.
- [46] Li L, Zhong M. Inhibitors of HCV NS 5A: US, 065668 [P]. 2010-06-26.
- [47] Zhong M, Li L. Inhibitors of HCV NS 5A: US, 102010 [P]. 2010-06-10.
- [48] Li L, Zhong M. Inhibitors of HCV NS 5A: US, 065681 [P]. 2008-12-03.
- [49] Guo H, Kato D, Kirschberg TA, et al. Antiviral compounds: US, 092010 [P]. 2010-12-09.
- [50] Belema M, Lopez OD, Bender JA, et al. Discovery and development of hepatitis C virus NS5A replication complex inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 1643-1672.
- [51] Ivachtchenko AV, Mitkin OD, Yamanushkin PM, et al. Discovery of novel highly potent hepatitis C virus NS5A inhibitor (AV4025) [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 7716-7730.
- [52] DeGoey DA, Randolph JT, Liu D, et al. Discovery of ABT-267, a pan-genotypic inhibitor of HCV NS5A [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 2047-2057.
- [53] Franz AK, Wilson SO. Organosilicon molecules with medicinal applications [J]. *J Med Chem*, 2012, 56: 388-405.
- [54] Lazareva N, Lazarev I. Drug design based on the carbon/silicon switch strategy [J]. *Russ Chem Bull*, 2015, 64: 1221-1232.
- [55] Nair AG, Zeng Q, Selyutin O, et al. Discovery of silyl proline containing HCV NS5A inhibitors with pan-genotype activity: SAR development [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2016, 26: 1475-1479.
- [56] Liu B, Gai K, Qin H, et al. Design, synthesis and identification of silicon-containing HCV NS5A inhibitors with pan-genotype activity [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 148: 95-105.
- [57] Coburn CA, Meinke PT, Chang W, et al. Discovery of MK-8742: an HCV NS5A inhibitor with broad genotype activity [J]. *ChemMedChem*, 2013, 8: 1930-1940.
- [58] Rockstroh JK, Nelson M, Katlama C, et al. Efficacy and safety of grazoprevir (MK-5172) and elbasvir (MK-8742) in patients with hepatitis C virus and HIV co-infection (C-EDGE CO-INFECTION): a non-randomised, open-label trial [J]. *Lancet HIV*, 2015, 2: e319-27.
- [59] Tong L, Yu W, Chen L, et al. Discovery of ruzasvir (MK-8408): a potent, pan-genotype HCV NS5A inhibitor with optimized activity against common resistance-associated polymorphisms [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 290-306.
- [60] Lawitz E, Gane E, Feld JJ, et al. Efficacy and safety of a two-drug direct-acting antiviral agent regimen ruzasvir 180 mg and uprifosbuvir 450 mg for 12 weeks in adults with chronic hepatitis C virus genotype 1, 2, 3, 4, 5 or 6 [J]. *J Viral Hepat*, 2019, 26: 1127-1138.
- [61] Kazmierski WM, Maynard A, Duan M, et al. Novel spiroketal pyrrolidine GSK2336805 potently inhibits key hepatitis C virus genotype 1b mutants: from lead to clinical compound [J]. *J Med Chem*, 2014, 57: 2058-2073.
- [62] Vijgen L, Thys K, Vandebosch A, et al. Virology analysis in HCV genotype 1-infected patients treated with the combination of simeprevir and TMC647055/ritonavir, with and without riba-

- virin, and JNJ-56914845 [J]. *Virology*, 2017, 14: 101.
- [63] Dwyer MP, Keertikar KM, Chen L, et al. Matched and mixed cap derivatives of the HCV NS5A inhibitor MK-8742 [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26: 4106-4111.
- [64] Yu W, Zhou G, Coburn CA, et al. Substituted tetracyclic indole core derivatives of HCV NS5A inhibitor MK-8742 [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26: 4851-4856.
- [65] Tong L, Yu W, Coburn CA, et al. Structure-activity relationships of proline modifications around the tetracyclic-indole class of NS5A inhibitors [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26: 5354-5360.
- [66] Yu W, Tong L, Hu B, et al. Discovery of chromane containing HCV NS5A inhibitors with improved potency against resistance associated variants [J]. *J Med Chem*, 2016, 59: 10228-10243.
- [67] Yu W, Tong L, Selyutin O, et al. Discovery of MK-6169, a potent pan-genotype hepatitis C virus NS5A inhibitor with optimized activity against common resistance-associated substitutions [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 3984-4003.
- [68] Bae IH, Choi JK, Chough C, et al. Potent hepatitis C virus NS5A inhibitors containing a benzidine core [J]. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2013, 5: 255-258.
- [69] Bae IH, Kim HS, You Y, et al. Novel benzidine and diamino-fluorene prolinamide derivatives as potent hepatitis C virus NS5A inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2015, 101: 163-178.
- [70] You Y, Kim HS, Bae IH, et al. New potent biaryl sulfate-based hepatitis C virus inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2017, 125: 87-100.
- [71] Yeh TK, Kang IJ, Hsu TA, et al. A novel, potent, and orally bioavailable thiazole HCV NS5A inhibitor for the treatment of hepatitis C virus [J]. *Eur J Med Chem*, 2019, 167: 245-268.
- [72] Wagner R, Randolph JT, Patel SV, et al. Highlights of the structure-activity relationships of benzimidazole linked pyrrolidines leading to the discovery of the hepatitis C virus NS5A inhibitor pibrentasvir (ABT-530) [J]. *J Med Chem*, 2018, 61: 4052-4066.
- [73] Foster GR, Dore GJ, Wang S, et al. Glecaprevir/pibrentasvir in patients with chronic HCV and recent drug use: an integrated analysis of 7 phase III studies [J]. *Drug Alcohol Depend*, 2019, 194: 487-494.
- [74] Kang IJ, Hsu SJ, Yang HY, et al. Potent, selective, and orally bioavailable HCV NS5A inhibitor for treatment of hepatitis C virus: (S)-1-((R)-2-(cyclopropanecarboxamido)-2-phenylacetyl)-N-(4-phenylthiazol-2-yl)pyrrolidine-2-carboxamide [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 228-247.
- [75] Neklesa TK, Winkler JD, Crews CM. Targeted protein degradation by PROTACs [J]. *Pharmacol Ther*, 2017, 174: 138-144.
- [76] 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.