

专论与综述

抗流感病毒药物研究进展

徐 颂, 贺 星, 田 红, 陈常青

(天津药物研究院 医药信息中心, 天津 300193)

摘 要:对抗流感病毒药物中的神经氨酸酶抑制剂和血凝素抑制剂的研究进展进行综述,介绍了已有的神经氨酸酶抑制剂扎那米韦、奥司米韦,具有开发前景的帕洛米韦、CS-8958,以及新型抗流感化合物等的研发状况。

关键词:抗流感病毒药; M2 离子通道蛋白抑制剂; 神经氨酸酶抑制剂; 血凝素抑制剂

中图分类号: R282.71

文献标识码: A

文章编号: 1674-5515(2009)02-0065-06

流行性感(流感)是由流感病毒引起的一种急性呼吸道传染病,其波及范围之广,造成经济损失之大位于传染性疾之首。据世界卫生组织统计,每年北半球有1亿人感染流感,造成的经济损失超过100亿美元。流感严重危害人类的健康和生命,它不仅在全世界引起广泛关注,也是我国重点预防与控制的病毒传染性疾。

根据流感病毒核蛋白(NP)和膜蛋白(MP)的不同,可将流感病毒分为A、B、C3种类型。流感病毒A型常以流行的形式出现,可在鸟类和哺乳类宿主体间传播,是对人类威胁最大的亚型;流感病毒B型常造成局部爆发,只在人与人之间传播;C型则多散发,是对人类危害较小的非临床病原体。3种类型流感病毒均可感染人类。流感病毒的传播与其表面的两种糖蛋白有关,即血凝素(hemagglutinin, HA)和神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。HA的作用是使病毒黏附到宿主细胞上;流感病毒的HA与宿主细胞表面的神经氨酸残基结合后,病毒开始侵入细胞,并在细胞内进行复制,生成新的子代病毒,后者以出芽方式从宿主细胞表面释放。由于流感病毒利用宿主细胞膜合成自身的包膜,因此新合成的子代病毒表面也含有神经氨酸残基。NA则是通过对受体神经氨酸的作用,使新生病毒从宿主细胞中释放出来。根据流感病毒A型外膜HA和NA的不同,可将其分为15个H亚型(H1~H15)和9个N亚型(N1~N9),任何一种HA与任何一种NA结合后即成为一种血清亚型。下面按照作用机制的不同对抗流感药物的研究进展做一综述。

1 M2 离子通道蛋白抑制剂

20世纪90年代以前,预防和治疗由流感病毒A型引起的流感(简称A型流感)的首选药物是金刚烷胺类。包括1966年上市的金刚烷胺(Amatidine)和1987年上市的金刚乙胺(Rimantidine),通过阻断流感病毒M2离子通道蛋白阻止病毒脱壳,使病毒RNA不能释放到细胞质中,中断病毒复制的早期阶段,是目前临床上常用的治疗流感的药物。

金刚烷胺只对流感病毒A型具有抑制作用,其抗病毒机制是:改变宿主细胞的表面电荷,抑制病毒穿入敏感细胞和释放核酸的过程,使病毒的增殖受到抑制。金刚乙胺系金刚烷胺的衍生物,只抑制流感病毒A型,1987年由Roche公司研制成功并投放市场。虽体外实验显示金刚乙胺的抗病毒活性强于金刚烷胺,但临床上多次对比研究表明二者的疗效相似。金刚乙胺的抗病毒机制可能有以下几个方面:(1)与宿主细胞膜作用,改变表面电荷,阻止病毒进入或脱壳;(2)被溶酶体摄取提高pH值(因为病毒颗粒与溶酶体融合与pH有关),从而阻止病毒脱壳;(3)与病毒的M蛋白质作用,阻止其发挥编码蛋白质功能。

金刚烷胺类药物的毒副作用主要表现为失眠、注意力分散和神经质,一般在用药后几小时出现。金刚乙胺的毒副作用相对较小。另外,金刚烷胺类药物在临床应用中和实验条件下易使流感病毒产生抗药毒株。传统的治疗流感的金刚烷胺类药物由于副作用大、耐药率高及对流感病毒B型无效等缺点,其

临床应用受到一定限制。

接种流感疫苗虽然是预防流感最有效的方法,但因流感病毒抗原性的变异,有可能导致疫苗无效。因此人们致力于探索新的、安全且有效的抗流感病毒药物。

2 神经氨酸酶抑制剂

2.1 神经氨酸酶

早在1942年,人们就发现流感病毒表面有一种酶能使病毒本身从红细胞上脱落,这种酶即为神经氨酸酶(NA)。NA是流感病毒表面一种蘑菇云状的包膜糖蛋白突起,由453~466个氨基酸组成,分为颈部和头部。其颈部有一个疏水域使之易于插入双层脂质膜中;头部有酶和抗原活性,能够催化唾液酸(或N-乙酰神经氨酸)与D-半乳糖或半乳糖相连的 α -酮基水解,因而可以切割细胞表面HA受体上的唾液酸残基,对病毒感染起到至关重要的作用。装配成熟的病毒颗粒由于自身表面的HA与细胞膜表面的HA受体相结合而停留在细胞表面。NA的切割使病毒出芽释放,新释放的病毒颗粒表面覆盖有细胞膜,因而同时具有HA和HA受体;NA的切割还可以防止新释放的病毒颗粒相互凝集,增强病毒感染其他细胞的能力;同时NA还可以消化呼吸道黏膜表面的唾液酸残基,这有利于病毒的扩散。

NA存在于流感病毒A和B型的表面,在病毒的生命周期中起着极其重要的作用。如果NA被抑制,病毒则黏附到宿主细胞表面,相互凝集,不能感染新的靶细胞,不能在体内播散、复制,也不能透过呼吸道的黏膜层。无法感染黏膜层下靶细胞的流感病毒虽有高度变异性,存在许多不同毒株,但为病毒复制所必需的所有A、B型流感病毒株的NA活性位点的分子结构高度保守,因此NA是抗病毒药物理想的攻击靶。

NA作为流感病毒表面的一种重要抗原,在病毒感染宿主细胞时,主要起着识别细胞表面的流感病毒受体,促进病毒进入靶细胞内的作用。此外,NA可为将要出芽的病毒粒子清理通道,有助于病毒粒子的成熟与释放。一旦病毒进入体内,其表面的HA与呼吸道上皮细胞的唾液酸结合,结合过程诱导宿主细胞将病毒卷入、开始复制。病毒RNA和蛋白通过宿主细胞复制,合成新颗粒。新病毒颗粒移向细胞表面,仍通过血凝素-唾液酸键进行再结合^[1]。

2.2 神经氨酸酶抑制剂的发展

鉴于NA在流感病毒复制过程中起重要作用。因此人们致力于开发其选择性抑制剂,1969年合成了第一个NA抑制剂Neu5Ac2en,结构见图1。Neu5Ac2en是一种脱水的神氨酸衍生物,在酶反应过程中酷似过渡的几何形状,但由于该抑制剂活性及特异性太低,无临床使用价值。为增加Neu5Ac2en与形成酶活性部位的氨基酸残基间的相互作用,将其4位碳原子上的羟基用胍基置换,这就是1993年成功合成的第一个强效的、特异性的流感病毒NA抑制剂扎那米韦(Zanamivir),结构见图1。Woods等^[2]的研究表明,扎那米韦的抑制活性比金刚烷胺高500~1000倍,但流感病毒A长时间暴露在扎那米韦下,也会产生变异^[3]。用环己烯以及亲脂侧链取代极性的甘油,这就是1997年合成的第二个NA抑制剂奥司米韦(Osetamivir),结构见图1。奥司米韦可经肝脏酯酶转化成活性的羧酸盐。扎那米韦和奥司米韦均是有效的选择性流感病毒NA抑制剂。

大量研究表明,NA抑制剂对于流感具有较好的疗效。扎那米韦和奥司米韦已于1999年被美国食品与药品管理局(FDA)批准用于流感的治疗,奥司米韦还被批准用于流感的预防。

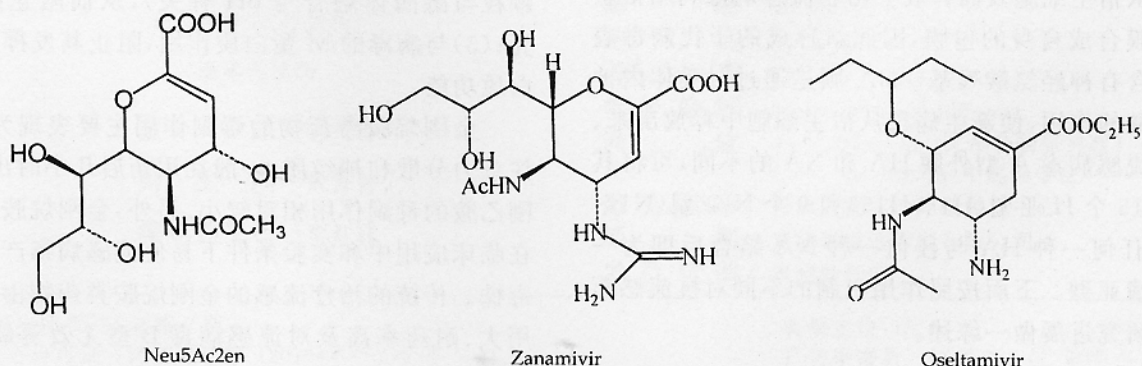


图1 NA抑制剂的结构

2.2.1 扎那米韦

扎那米韦是根据流感病毒 NA 与唾液酸的复合物结构,通过计算机分子模拟设计而成,其结构中的胍基与流感病毒 NA 活性部位的氨基酸通过氢键、静电力及范德华力的作用,与酶紧密结合,作用强度及选择性均较高。扎那米韦对流感病毒 A、B 型的 NA 有同样的抑制效果。预先给小鼠鼻腔内滴入 0.027 mg/kg 扎那米韦,每日 2 次,然后再使其感染流感病毒 A 型。结果表明,与未用药小鼠相比,用药小鼠体内的病毒复制量降低约 90%;而使用金刚烷胺和病毒唑虽也能达到此效果,但用量分别为 3.5、33.9 mg/kg。扎那米韦对流感病毒 B 型的效果也强于病毒唑。但目前尚存在一些问题,如局部用药对某些患者不适用,而全身用药的有效性尚需研究,这些限制了该药物的临床应用^[1]。

2.2.2 奥司米韦

磷酸奥司米韦 (Oseltamivir phosphate),化学名为(3*R*,4*R*,5*S*)-4-乙酰胺基-5-氨基-3-(1-乙基丙氧基)-1-环己烯-1-甲酸乙酯磷酸盐。它是在新型碳环流感病毒 NA 抑制剂 GS 4071 的结构基础上,经乙酰化,引入疏水基团形成的乙酯型前药,是美国 Gilead Sciences 公司研发的 NA 抑制剂,1999 年 10 月首次在瑞士上市,商品名达菲 (Tamiflu)。实验证实,其与流感病毒 NA 的亲合力比对人的同类酶大 100 万倍,被认为是目前发现的特异性最高的抗流感药物。以(-)-奎尼酸、(-)-莽草酸、D-甘露糖、苯及其衍生物为原料可以合成奥司米韦,烯类化合物经 Diels-Alder 反应亦可以合成奥司米韦^[4]。

奥司米韦主要通过干扰病毒从被感染宿主细胞表面的释放减少病毒传播,是治疗高致病性禽流感(例如 H5N1 亚型流感病毒导致的禽流感)的有效药

物。研究表明,奥司米韦对流感病毒 NA 的抑制活性为扎那米韦的 3~6 倍;对 MDCK 细胞的 EC_{50} 值也低于扎那米韦;对实验室 H1N1 型流感病毒株的抗病毒活性比扎那米韦强 48 倍。奥司米韦能降低流感及流感病毒感染的发生率,预防总有效率约 74%。奥司米韦口服有效,在多种动物体内均有很高的生物利用度;人口服的生物利用度为 80%,其血浆半衰期长达 7~9 h,经胃肠道吸收后主要被肝脏转化为奥司米韦羧酸而起效^[5]。

2.3 在研的神经氨酸酶抑制剂

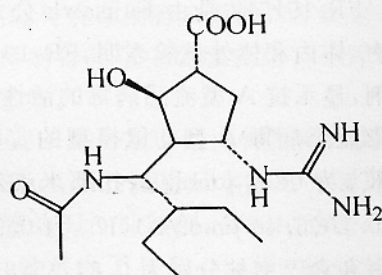
2.3.1 帕洛米韦

由美国 BioCryst 公司研制的帕洛米韦 (Peramivir, RWJ-270201, BCX-1812),是除扎那米韦和奥司米韦以外的第 3 个 NA 抑制剂,是具有胍基和亲脂链的环戊烷衍生物,结构见图 2。它对流感病毒 NA 的抑制效果相当于扎那米韦和奥司米韦,是广谱抗流感病毒药物,口服有效,该药目前处于 III 期临床阶段^[6],其注射剂正在研究中。帕洛米韦能有效抑制各种流感病毒株的复制过程,且耐受性好、毒性低,是一个前景看好的口服抗流感新药^[7]。

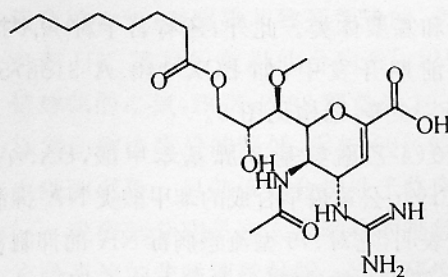
目前,美国生物制药公司 BioCryst 和 SCOLR 公司正在合作研制一种帕洛米韦的控释试剂。

2.3.2 CS-8958

日本三共公司研制的 CS-8958(R-118958)是一种 NA 抑制剂 R-125489 的前体药物(结构见图 2),能够快速代谢成活性形式,从而抑制肺内流感病毒 A 和 B 型的复制。用鼠流感病毒感染模型进行的实验表明,在病毒感染前 7 d 或感染后 24 h,一次鼻内给予 CS-8958 后,与吸入性 NA 抑制剂扎那米韦相比,在预防和治疗上均具有更好的效果。在英国的 I 期临床试验中,32 位健康男性志愿者对 CS-8958



Peramivir



CS-8958

图 2 在研的 NA 抑制剂的结构

1~10 mg 显示出较好的耐受性,吸入 6 d 后仍能检测到药物,而扎那米韦超过 18 h 就未检出。

2.3.3 新型神经氨酸酶抑制剂

全新的 NA 抑制剂 α -和 β -氨基酸,有苯基甘氨酸类(phenylglycine)和吡咯烷类(pyrrolidine)^[8]。结晶学研究显示苯基甘氨酸的 α -氨基与 NA 的 Asp-152 的羧基形成氢键;吡咯烷的 β -氨基与 NA 的 Tyr-406 羟基形成氢键。实验证明它们可产生有效抗病毒活性。一些苯基甘氨酸类和吡咯烷类化合物如图 3 所示。

新型苯磺酸类 NA 抑制剂多磺酸盐分子 CB3GA 可与 NA 相结合^[9]。不同光谱分析显示,这些化合物与底物可逆结合,具有较高的亲和力。部分新型苯磺酸类 NA 抑制剂见图 4。

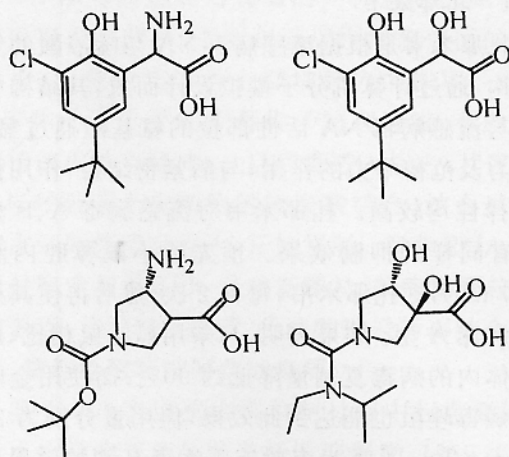


图3 具有抗流感病毒 NA 活性的苯基甘氨酸类和吡咯烷类化合物

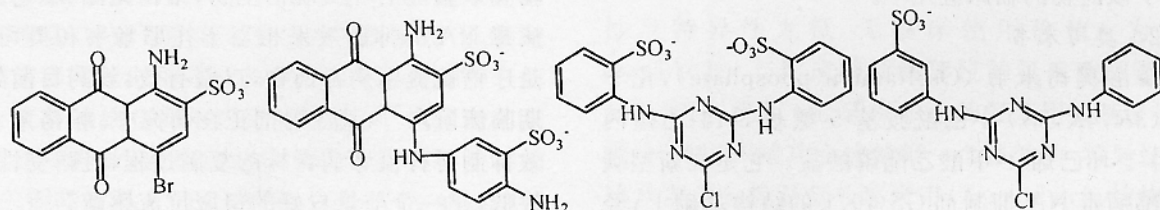


图4 新型苯磺酸类 NA 抑制剂

氯喹具有很好的抗疟活性,研究发现它亦具有抑制病毒复制的作用。体外实验表明,氯喹能抑制流感病毒 A 型的复制,对流感病毒 A 型 H1N1 和 H3N2 的 IC_{50} 低于其治疗疟疾时的血浆浓度。氯喹作为抗流感药物的潜力有待于进一步研究^[10]。

2.3.4 其他

目前大部分 NA 抑制剂具有多个手性中心,制备困难。为得到价廉、易得的 NA 抑制剂,人们根据 NA 与抑制剂的作用模式,合成了不同环状结构的化合物。较为成功的有苯甲酸类、环己烯类、环戊烷类、吡咯烷类和寡聚体类。此外,还有若干种 NA 抑制剂正处于前期开发中,如 BCX-140、A-315675、FR-191512、F-36 等,结构见图 5。

BCX-140(4-乙酰氨基-3-胍基苯甲酸,BANA-113),是 BioCryst 公司最早合成的苯甲酸类 NA 抑制剂。体外试验表明,它对 N9 型流感病毒 NA 的抑制常数比奥司米韦低 3 个数量级,但鼻腔内给予 BCX-140 不能阻止已感染流感病毒的大鼠体质量的减轻。对 BCX-140 的体内活性还有待进一步深入研究。

Abbott 公司合成了以吡咯烷为核心的高效 NA 抑制剂 A-315675。它能选择性抑制流感病毒

A、B 型的 NA, K_i 值与扎那米韦、奥司米韦的相当或比后两者抑制活性更好。从 A-315675 抑制 NA 活性的曲线可以发现,A-315675 对 NA 的抑制活性具有高度的时间相关性。X 射线晶体衍射分析显示,A-315675 的慢结合性抑制活性可能是其与流感病毒 NA 活性位点结合的解离速率低的原因有关。体外流感病毒复制试验显示:A-315675 对所有流感病毒血清型的抑制活性是奥司米韦的 3~7 倍。对于流感病毒 B 型,A-315675 的抑制活性比奥司米韦高 4~12 倍。

FR-191512 是由 Fujisawa 公司研制的多酚化合物。体内和体外试验表明,FR-191512 作为 NA 抑制剂,显示抗 A 型流感病毒的活性。在以呼吸系统感染流感病毒 A 型的鼠模型的实验中,FR-191512 的 IC_{50} 为 0.28 $\mu\text{mol/L}$ (扎那米韦和利巴韦林分别为 0.10、6.40 $\mu\text{mol/L}$), IC_{80} 为 0.92 $\mu\text{mol/L}$ (扎那米韦和利巴韦林分别为 0.87、15.8 $\mu\text{mol/L}$)。

F-36 是从黄芩根提取物中得到的 NA 抑制剂,由 Teijin 公司研制,目前处于临床前研究阶段。给小鼠肺部 im 0.5 mg/kg,iv 4 mg/kg 及 MDCK 给药,均可抑制流感病毒 A/PR/8/34(H1N1 亚型)的复

制,体外 IC_{50} 为 $55 \mu\text{mol/L}$,保护小鼠免于感染致命的 A/PR8 病毒。

此外,张等^[11]以 *L*-羟脯氨酸为原料,设计合成了一系列吡咯烷二肽衍生物,部分化合物具有较好

的活性。除了以上正在研究和开发中的环己烯衍生物、环戊烷衍生物、苯甲酸衍生物、吡咯烷衍生物之外,还发现吡唑类衍生物也有一定的抗流感病毒活性^[12]。

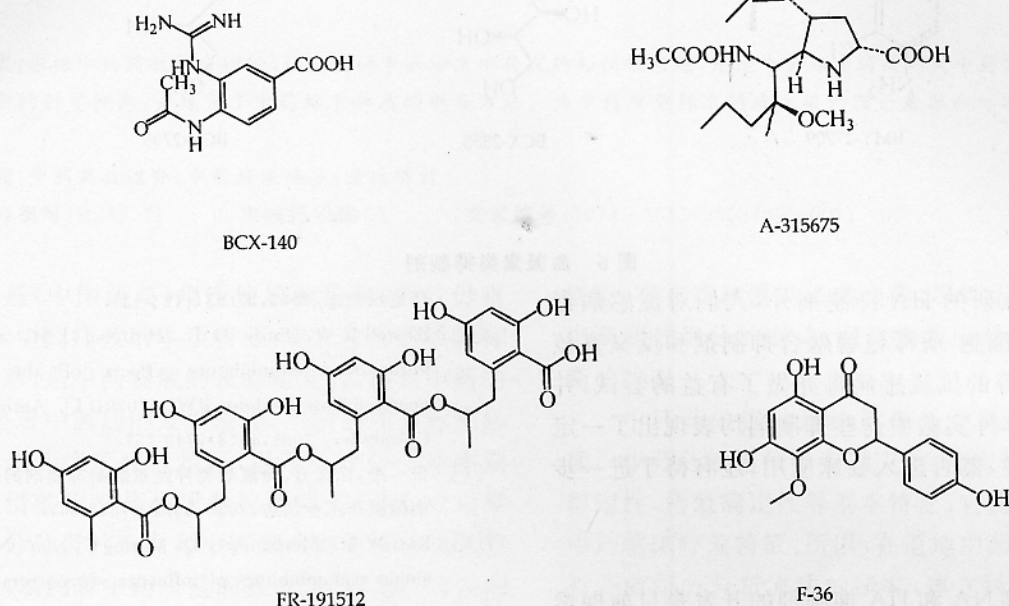


图5 处于前期开发的NA抑制剂的结构

3 血凝素抑制剂

血凝素(HA)是流感病毒膜上的另一重要酶,能与受体上的唾液酸结合,并引起病毒与受体的融合。如果能研制成既抑制HA,同时又能抑制NA的化合物,将大大提高预防和治疗流感的效果^[13]。

3.1 Pharmaprojects No. 4803 等

Pharmaprojects No. 4803 是HA和NA双重抑制剂,这个聚合物由美国哈佛大学的 Whitesides 博士开发。Pharmaprojects No. 4803 含有聚丙烯酰胺和许多硅酸侧链,能与病毒表面的膜蛋白HA相结合;硅酸侧链还能与病毒细胞表面的NA结合,在病毒周围形成阻碍病毒与宿主细胞膜结合的障碍,从而阻止进一步感染。

Pharmaprojects No. 5172 是由美国百时美-施贵宝公司研制。Stachyflin 是由日本盐野义制药公司开发的治疗流感的HA抑制剂,其衍生物去乙酰基SQ-02-S-V2也显示出了与Stachyflin相似的抗病毒活性。BMY-27709(见图6)由百时美-施贵宝公司研制,是一个作用于HA,抑制流感病毒融合的抑制剂,目前处于临床前研究阶段。

3.2 BCX-2855

BCX-2855(见图6)是由美国BioCryst公司开发的HA抑制剂和NA抑制剂,用于治疗副流感病毒引起的儿童和青年人呼吸道感染,目前处于临床前研究阶段。

3.3 BCX-2798

BCX-2798(见图6)是由美国BioCryst公司开发的人副流感病毒抑制剂,用于治疗副流感病毒引起的儿童和青年人呼吸道感染。在体外,BCX-2798具有抑制人副流感病毒结合及抑制NA活性的作用。能够抑制HA、NA活性和I、II、III型人副流感病毒的生长。对感染非致死剂量的、含I型人副流感病毒HN基因的重组仙台病毒[rSV(hHN)]和肺链球菌的小鼠,BCX-2798剂量为 $10 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 可抑制动物体质量的降低,保护80%的小鼠免于二次细菌感染。目前该化合物处于临床前研究阶段。

硫酸脑苷脂是在人及动物的神经组织、气管、肺充分表达的非唾液酸糖脂。新近研究发现它不仅在人免疫缺陷病毒、细菌、疟疾寄生虫与受体结合的过程中发挥作用,而且还可以作用于NA^[18]。还有研究显示,N2、N9亚型NA也可作为未来药物设计的基础^[14]。

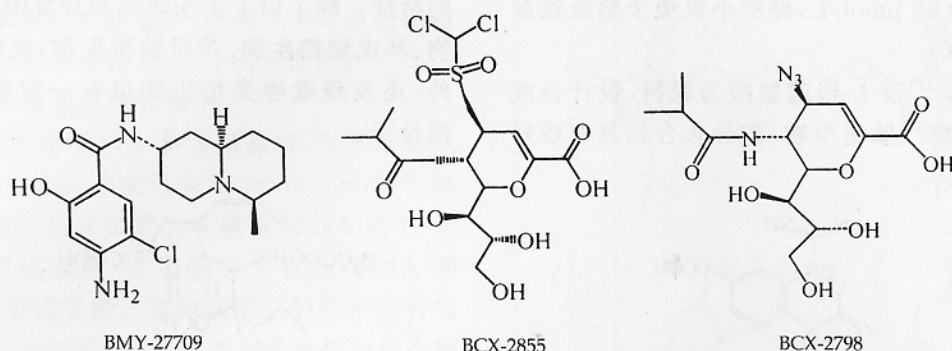


图6 血凝素类抑制剂

除上述在研的HA抑制剂外,人们对流感病毒吸附抑制剂、细胞-病毒包膜融合抑制剂和反义寡核苷酸(ODN)等的抗流感病毒亦做了有益的尝试,并且在体内和体外实验中这些抑制剂均表现出了一定的抗病毒活性,能否进入临床应用,还有待于进一步的研究^[15]。

4 结语

流感病毒NA和HA抑制剂的开发是目前探索抗流感化学治疗药研究中的重点。随着更多类型药物在临床上的推广、使用,将极大地减弱流感对人类健康的威胁;随着新方法和新技术的不断涌现,必将出现更多新的、高效、低毒的抗流感病毒药物。

参考文献

- [1] 王全英,乔传玲,申之义. 禽流感病毒神经氨酸酶的结构及其生物学功能[J]. 动物医学进展, 2005, 26(12): 40-43.
- [2] Woods J M, Bethell R C, Coates J H, *et al.* 4-Guanidino-2, 4-Dideoxy-2, 3-Dehydro-N-acetylneuraminic acid is a highly effective inhibitor both of the sialidase (neuraminidase) and of growth of a wide range of influenza A and B viruses *in vitro*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 1993, 37(7): 1473-1479.
- [3] Gubareva L V, Benthell R, Hart G J, *et al.* Characterization of mutants of influenza A virus selected with the neuraminidase inhibitor 4-guanidino-Neu5Ac2en[J]. J Virol, 1996, 70(3): 1818-1827.
- [4] 贺丽敏,胡艾希,董敏宇,等. 奥斯米韦合成进展[J]. 有机化学, 2007, 27(3): 339-346.
- [5] 钱方. 神经氨酸酶抑制剂在对抗流感病毒中的作用[J]. 医

药论坛杂志, 2006, 27(23): 124-125.

- [6] Sidwell R W, Smee D F, Huffman J H, *et al.* *In vivo* influenza virus-inhibitory effects of the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(3): 749-757.
- [7] 张杰,徐文方. 唾液酸类神经氨酸酶抑制剂的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2005, 36(10): 643-647.
- [8] Kati W M, Montgomery D, Maring C, *et al.* Novel α - and β -amino acid inhibitors of influenza virus neuraminidase[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(9): 2563-2570.
- [9] Platiss D, Smith B J, Huyton T, *et al.* Structure-guided design of a novel class of benzyl-sulfonate inhibitors for influenza virus neuraminidase[J]. Biochem J, 2006, 399: 215-223.
- [10] Ooi E E, Chew J S W, Loh J P, *et al.* *In Vitro* Inhibition of human influenza A virus replication by chloroquine[J]. J Virol, 2006, 3: 39-41.
- [11] 张杰,王强,徐文方,等. 吡咯烷类神经氨酸酶抑制剂的设计、合成与初步活性研究[J]. 中国药理学杂志, 2008, 43(4): 314.
- [12] 黄长江,刘冰妮,张士俊,等. 吡唑类化合物的合成与药理活性研究[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(24): 2043-2044.
- [13] 邵华一,李卓荣. 神经氨酸酶抑制剂的新用途及新结构[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(17): 1440-1443.
- [14] Russell R J, Haire L F, Stevens D J, *et al.* The structure of H5N1 avian influenza neuraminidase suggests new opportunities for drug design[J]. Nature, 2006, 443: 45-49.
- [15] 牛有红,曹小平,叶新山. 流感病毒唾液酸苷酶抑制剂研究进展[J]. 化学进展, 2007, 19(2/3): 420-430.

(收稿日期 2008-10-16)

欢 迎 投 稿

欢 迎 订 阅