

• 流感药物治疗专题报道 •

抗流感小分子药物研究进展

曹瑞源, 赵磊, 钟武*

(国家应急防控药物工程技术研究中心 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院, 北京 100850)

【摘要】 流感病毒种类多、变异快, 是对人类健康威胁最大的呼吸道病毒。季节性流感每年均会造成地区性疫情, 大流行流感每隔几年导致全球性的流感大暴发, 高致病性禽流感病情凶险, 死亡率高。而流感病毒极高的基因重配效率严重影响了流感疫苗的效果。因此, 抗流感药物成为流感疫情防控的核心手段。随着金刚烷胺、金刚乙胺的长期使用和作为动物饲料添加剂, 季节性流感和新发流感病毒对其几乎全部耐药, 而随着奥司他韦的广泛使用, 流感病毒对神经氨酸酶抑制剂耐药也存在潜在的趋势, 加快推进新型抗流感药物研发迫在眉睫。本文从流感病毒感染复制周期入手, 对近年来抗流感药物新靶点、新药物实体进行综述, 并重点阐述处于临床研究阶段的抗流感新药品种。

【关键词】 流感病毒; 抗病毒药物; 小分子; 临床研究

【中图分类号】 R978.7; R511.7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1672-3384(2018)01-0001-05

doi:10.3969/j.issn.1672-3384.2018.01.001

Research progress on anti-influenza drugs

CAO Rui-yuan, ZHAO Lei, ZHONG Wu*

(National Engineering Research Center for the Strategic Drug, Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

【Abstract】 The diversity and rapid evolution of influenza virus made it the greatest threat to human health. Seasonal influenza causes regional outbreaks each year. World-wide pandemic of influenza is unpredictable. Highly pathogenic avian influenza usually leads to high case fatality rate. However, the rapid gene reassortment rate of influenza virus limited the efficacy of influenza vaccines. Antiviral drugs thus became the critical countermeasure for control of influenza. As the application of anti-influenza drugs, the problem of drug resistance emerges, which highlights the development of novel antiviral drugs against influenza. In this article, we reviewed the major research progress of anti-influenza research according to the life cycle of influenza virus.

【Key words】 influenza virus; antiviral drug; hydrone; clinical research

流感病毒 (influenza virus) 属于正黏病毒科 (orthomyxoviridae) 成员, 分为甲型流感 (influenza virus A, IVA)、乙型流感 (influenza virus B, IVB)、丙型流感 (influenza virus C, IVC) 和丁型流感 (influenza virus D, IVD) 4 种类型。甲型流感病毒除感染人外, 在动物中广泛存在, 如禽类、猪、马、海豹以及鲸鱼和水貂等; 乙型流感病毒在人体内循环并引起季节性流行, 在海豹中也有分离记载; 丙型流感病毒可感染人类、猪和狗, 但感染后症状轻微。丁型流感病毒主要感染牛。甲型流感和乙型

流感是人类流感的主要病原体。甲、乙型流感病毒的基因组为负链 RNA, 分为 HA、NA、M、NP、PB1、PB2、PA、NS 8 个节段。结构蛋白 HA、NA 和 M2 蛋白嵌合在病毒包膜上, M1 基质蛋白位于病毒包膜以下, 病毒核心是由 NP 蛋白包裹病毒基因组 RNA 构成的核蛋白体。

流感病毒是呼吸道传播病毒, 具有极高的基因重配以及基因突变频率。季节性流感的局部流行、高致病性禽流感的出现以及大流行流感的暴发对世界公共卫生体系构成巨大威胁。据世界卫

【收稿日期】 2018-01-18

【基金项目】 国家自然科学基金重大项目 (81590766)

【作者简介】 曹瑞源, 男, 助理研究员; 研究方向: 抗病毒新药研发; E-mail: 21cc@163.com

【通讯作者】 * 钟武, 男, 研究员, 博士生导师; 研究方向: 药物设计与合成; Tel: (010) 66932624; E-mail: zhongwu@bmi.ac.cn

生组织 (WHO) 估算, 每年全世界季节性流感导致 3 000 000~5 000 000 例重症病例, 290 000~650 000 例死亡病例^[1]; 自 2003 年以来, H5N1 型禽流感已造成数百万例禽类感染, 数百例人类死亡病例^[2]; 2013 年以来的 H7N9 疫情造成超过 1 500 例感染^[2]; 2009—2010 年的甲型 H1N1 流感大流行横扫全球 214 个国家和地区, 造成 18 449 例死亡^[3]。

鉴于流感的巨大威胁, 针对流感的抗病毒药物研发成为一直以来的研究热点, 神经氨酸酶抑制剂奥司他韦、帕拉米韦等基于结构的药物设计取得了巨大成功。然而, 随着流感病毒的变异, 已有的抗流感药物面临严峻的耐药形势。由于季节性流感中已出现广泛的 M2 离子通道耐药位点, 目前 WHO 已不推荐烷胺类药物用于季节性流感的临床治疗。2009 年流感大流行分离株、2013 年 H7N9 禽流感分离株中也相继发现奥司他韦耐药位点, 说明该类药物的耐药趋势值得关注。本文将以流感病毒的感染复制周期为切入点, 综述目前抗流感药物的研究进展。

1 流感病毒的感染复制周期及药物概览

流感病毒的感染复制周期主要包括: 吸附、内吞、膜融合、基因组复制、蛋白表达、组装出芽、释放等阶段。对宿主细胞的吸附是流感病毒启动感染的第一步。细胞表面蛋白的唾液酸是流感病毒的主要受体。人类呼吸道上皮细胞表面的唾液酸主要为 α -2,6 糖苷键, 而禽类呼吸道上皮细胞主要为 α -2,3 糖苷键, 一般认为这种唾液酸构型之间的差异是决定人类流感病毒和禽流感病毒不同宿主嗜性的主要因素^[4]。然而这种差异并不绝对, 研究发现, 人类呼吸道上皮细胞同样存在少量的 α -2,3 唾液酸, 这是部分禽流感病毒能够感染人的因素之一。病毒 HA 蛋白的单点突变即可改变对不同唾液酸构型的结合能力, 进而改变病毒嗜性。一旦结合到细胞之上, 流感病毒通过 4 种机制完成内吞过程: 网格蛋白依赖的内吞, 小窝蛋白依赖的内吞, 非网格蛋白/小窝蛋白依赖的内吞以及胞吞。一般认为网格蛋白依赖的内吞途径是流感病毒的主要内吞途径^[5-7]。

内吞之后, 病毒表面的 HA0 被宿主蛋白酶切割为 HA1 和 HA2。在酸性的内吞体环境中, HA 变构之后暴露出 HA2 N 端的融合肽。最后融合肽

插入到细胞膜中, 触发膜融合过程。与此同时, 病毒表面的 M2 离子通道将内吞体中的 H^+ 泵入病毒内部, 诱发病毒内部结构的解体 (例如 NP 和 M 蛋白的解聚), 暴露出游离的核糖核蛋白复合体 (vRNP)。当膜融合过程完成后, vRNP 进入细胞质, 并转运至细胞核中, 完成基因组复制和转录。PA、PB1 和 PB2 组成流感病毒 RNA 依赖的 RNA 聚合酶 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[8]。RdRp 以 vRNA 为模板转录出 mRNA 和 cRNA, 进一步以 cRNA 为大量复制 vRNA。病毒的出芽依赖于 NA 的神经氨酸酶功能, NA 负责切断 HA 和唾液酸之间的连接, 使病毒颗粒释放。NA 的另一项功能是负责切掉病毒表面的糖蛋白, 防止病毒颗粒的聚集。

流感病毒感染复制的每一步都有病毒自身编码的蛋白和宿主细胞蛋白参与。目前, 针对流感病毒感染复制周期的各个阶段都有药物研发报道 (图 1)。

目前, 全球经过各国药品管理部门批准上市的抗流感药物有 4 大类 7 个品种, 分别为: M2 离子通道抑制剂金刚烷胺 (1966 年, 美国首先上市) 和金刚乙胺 (1993 年, 美国首先上市), 神经氨酸酶抑制剂扎那米韦 (1999 年, 澳大利亚和美国首先上市) 磷酸奥司他韦 (1999 年, 瑞士首先上市, 陆续在加拿大、欧洲、美国和中国上市) 和帕拉米韦 (2010 年, 韩国首先上市), RNA 聚合酶抑制剂法匹拉韦 (2014 年, 日本首先批准), 血凝素 HA 抑制剂阿比多尔 (1993 年, 俄罗斯上市)。

2 靶向病毒吸附内吞阶段的抗流感抑制剂

病毒表面的 HA 是病毒吸附的主要功能蛋白, 靶向 HA 的抗吸附抑制剂研发成为此类抑制剂研究的热点, 抗体类药物的作用机制多为阻断病毒的吸附过程。硫酸右旋糖酐是较早发现的抗吸附抑制剂, 其表面的负电荷能够抑制病毒颗粒和细胞表面的吸附, 对 HA 和 NA 介导的吸附均有抑制活性。

病毒的吸附涉及宿主表面的唾液酸, 靶向宿主唾液酸的抗病毒药物研究也取得了重要进展。DAS181 (fludase) 是该类药物的典型代表^[9]。DAS181 是由两个功能域构成的大分子药物, 一是肝素结合域, 二是唾液酸酶域。该药物能够切除呼吸道表面的唾液酸分子, 进而阻止流感病毒的吸

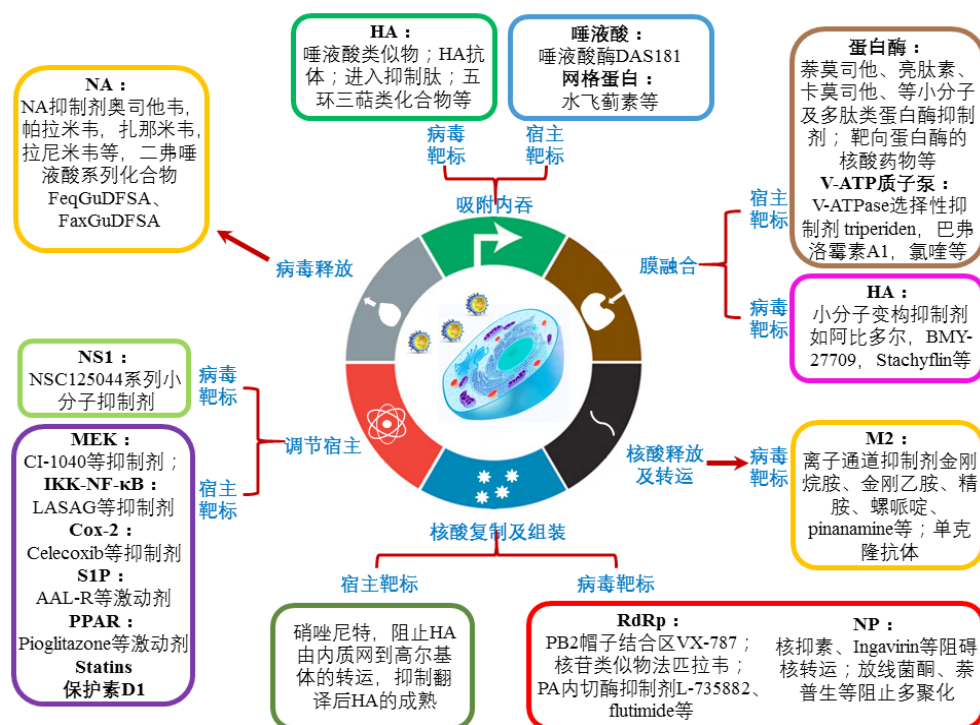


图1 针对流感感染复制全周期的抗流感药物潜在靶点和研究的药物

附。该药物对 H3N2, H7N9, H5N1, H1N1 等流感亚型在体内和体外均具有良好的抗病毒活性, 目前该药已经完成抗流感的 II 期临床试验, 并获得美国 FDA 突破性疗法认定。

吸附后的内吞过程需要多种宿主蛋白的参与, 该类抑制剂的主要作用靶标为宿主蛋白。水飞蓟素 (silymarin) 能够作用于网格蛋白介导的内吞途径, 进而抑制流感病毒吸附后的内吞^[10]。

3 靶向病毒膜融合阶段的抗流感抑制剂

流感病毒膜融合主要由 HA 的变构介导, 因此 HA 的变构抑制剂成为抗膜融合抑制剂的研究热点之一。BMY-27709 能够有效抑制 H1 和 H2 亚型的流感病毒, 其针对 A 型流感病毒的体外 IC_{50} 介于 3~8 μ M 之间^[11]。除此之外, 有研究发现 stachyflin 也可以抑制 HA 的变构, 从而抑制流感病毒的复制^[12]。阿比多尔是前苏联研发的抗流感药物, 其具有广谱抗病毒活性。研究表明, 阿比多尔作用于 HA 的膜融合, 以变构抑制剂的形式发挥抗流感活性^[13]。

流感病毒的膜融合依赖于内吞体酸化和宿主蛋白酶等一系列宿主酶类。蔡莫司他、亮肽素、卡莫司他、抑肽酶等一系列蛋白酶被报道有抗流感病毒

活性, 其作用机制被认为是抑制宿主蛋白酶对 HA0 的切割^[14-17]。V-ATPase 抑制剂如巴弗洛霉素 A1 等能够阻断氢离子进入内吞体, 抑制内吞体的酸化, 进而抑制酸性条件下 HA 所发生的变构, 从而发挥抗病毒活性^[18]。氯喹 (chloroquine) 能够通过调节宿主细胞 pH 从而抑制流感病毒的内吞过程。然而, 一项氯喹预防流感的随机、双盲、对照临床试验显示, 健康人群服用氯喹无法预防流感的发生^[19]。

4 靶向病毒核酸释放的抗流感抑制剂

该类抑制剂的作用靶标主要为 M2 离子通道抑制剂。M2 离子通道是最早成功的抗流感药物靶标, 1960 年代批准的金刚烷胺是经典的抗流感药物^[20]。经过多年的临床应用, 目前金刚烷胺、金刚乙胺类化合物已经出现广泛的耐药性, WHO 已不推荐其作为季节性流感的治疗药物。非烷胺类 M2 抑制剂成为目前研究的关注点之一, 该类物质主要包括聚胺类化合物 (如精胺、精脒), 螺哌啶及其衍生物, 以及 pinanamine 等天然产物^[21-23]。

5 靶向病毒核酸复制阶段的抗流感抑制剂

该类抑制剂主要分为 4 类: PB2 帽子结合区抑制剂, 核苷类似物, PA 核酸内切酶抑制剂,

干扰 RdRp 复合体组装的抑制剂。

PB2 帽子结合区抑制剂是近年来抗流感抑制剂研究的热点,其典型代表是 VX787。该类化合物对甲型流感的主要亚型以及奥司他韦耐药株均有良好的体外及体内抗病毒活性,其 IC_{50} 低至纳摩尔级。体内试验结果显示,感染后 96h 给药依然能达到 100% 的保护效果。II 期临床结果显示, VX-787 可以显著降低病毒数量以及流感样症状的严重程度和持续时间^[24]。

以法匹拉韦 (favipiravir, T-705) 为代表的核苷类似物由于具有广谱抗病毒活性,一直以来是抗流感药物研发的重点。法匹拉韦是有日本富士公司研发的广谱抗病毒药物,2014 年完成治疗流感的 III 期临床试验,被日本厚生劳动省批准作为抗流感药物上市。该药物对丝状病毒科、布尼亚病毒科、沙粒病毒科、披膜病毒科等烈性 RNA 病毒科成员以及正黏病毒科、副黏病毒科、小 RNA 病毒科、黄病毒科等非烈性 RNA 病毒科成员在体外及体内均具有良好的抑制效果。临床试验结果显示,法匹拉韦能够有效缩短流感病程时间,降低病毒载量。

除此之外,PA 核酸内切酶抑制剂以及干扰 RdRp 复合体组装的抑制剂也有文献报道, L-735822、flutimide 为核酸内切酶抑制剂的代表性抑制剂^[25]。

6 靶向病毒蛋白翻译和组装的抗流感抑制剂

硝唑尼特是目前抗流感药物研究的热点药物。该药是第一个噻唑类抗感染药物,可抑制包括神经氨酸酶抑制剂耐药的病毒株在内的多种类型流感病毒的复制,阻断翻译后阶段病毒血凝素的成熟。细胞培养研究发现,硝唑尼特可与神经氨酸酶抑制剂发生协同效应;还可抑制呼吸道病毒的复制,如副流感病毒、冠状病毒以及呼吸道合胞病毒。目前已经完成该药的 III 期临床试验,研究结果显示,硝唑尼特可减少急性无合并症流感患者的症状持续时间^[26]。

核抑素能够引起 NP 蛋白的聚集,阻碍该蛋白向细胞核内的转运,对 H1N1, H3N2 以及 H5N1 均有良好抗病毒活性^[27];放线菌酮和萘普生能够阻止 NP 蛋白的多聚化^[28-29];Ingavirin 能够直接干扰 NP 蛋白的核转运,进而发挥抗流感活性^[30]。

7 靶向病毒释放的抗流感抑制剂

病毒出芽后,需借助自身编码的 NA 切断病毒蛋白和宿主细胞表面唾液酸之间的连接。目前,该类抗流感药物上市品种最多,包括奥司他韦、帕拉米韦、扎那米韦、拉尼米韦等^[31]。

与 M2 离子通道抑制剂的机制不同,NA 抑制剂对 M2 离子通道抑制剂耐药株均有效,因此是继烷胺类药物之后的主流抗流感药物。扎那米韦是美国 FDA 批准的首个 NA 抑制剂,剂型为吸入剂;奥司他韦 1999 年被 FDA 批准上市,口服给药,是目前市场上的一线抗流感药物;帕拉米韦目前在中国、日本已经获批,给药方式为静脉注射,主要用于重症流感的救治;拉尼米韦在日本获批,剂型为吸入剂,有研究显示其对奥司他韦耐药株有效。目前 NA 抑制剂类药物的主要研究重点是在奥司他韦和扎那米韦的基础上进行进一步改造,以克服愈演愈烈的耐药问题。

NA 是流感病毒特有的酶,宿主细胞中没有类似的酶类,较低的毒性风险使得该酶一直是抗流感药物研发的热点靶标。目前对 NA 抑制剂的研究方向主要有新母核抑制剂筛选及衍生,共价抑制剂研究,以及多价抑制剂研究。但目前为止,未有推进到临床阶段的新抑制剂报道。

8 结语

流感病毒变异快、危害大,是一直以来最受关注的病毒。抗流感药物的研发因此成为抗病毒药物研发领域的热点。虽然目前抗流感药物上市品种最多,但随着各个一线药物耐药形势的恶化,对新型抗流感药物的需求也更加迫切。值得欣慰的是,随着法匹拉韦、硝唑尼特、VX787 等品种的陆续上市,一线药物的耐药威胁有望在近年内得到缓解。但面对流感病毒的快速变异,新的耐药株也将逐步出现,因此加强抗流感新机制、新品种研究,形成稳定的品种梯队,才能更加有效的对未来流感疫情进行防控。

【参考文献】

- [1] World Health Organization. Influenza (Seasonal)[EB/OL]. (2018-01-09) [2018-01-15]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>.
- [2] World Health Organization. Influenza (Avian and other zoonotic)[EB/OL]. (2018-01-09)[2018-01-15]. <http://www.who.int/mediacentre/>

- factsheets/avian_influenza/en/.
- [3] World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009[EB/OL]. (2010-08-06)[2018-01-15]. http://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/.
 - [4] Connor R J, Kawaoka Y, Webster R G, et al. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates[J]. *Virology*, 1994, 205(1):17.
 - [5] Conner S D, Schmid S L. Regulated portals of entry into the cell[J]. *Nature*, 2003, 422(6927):37-44.
 - [6] Melike L, Michael J. Rust, Xiaowei Zhuang. Endocytosis of influenza viruses[J]. *Microbes and infection/Institut Pasteur*, 2004, 6(10):929.
 - [7] Sieczkarski S B, Whittaker G R. Viral entry[J]. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 2005, 285(285):1.
 - [8] Braam J, Ulmanen I, Krug R M. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: Functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription[J]. *Cell*, 1983, 34(2):609-618.
 - [9] Malakhov M P, Aschenbrenner L M, Smee D F, et al. Sialidase Fusion Protein as a Novel Broad-Spectrum Inhibitor of Influenza Virus Infection[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4):1470-1479.
 - [10] Blaising J, Lévy P L, Gondeau C, et al. Silibinin inhibits hepatitis C virus entry into hepatocytes by hindering clathrin-dependent trafficking[J]. *Cellular Microbiology*, 2013, 15(11):1866-1882.
 - [11] Luo G, Torri A, Harte W E, et al. Molecular mechanism underlying the action of a novel fusion inhibitor of influenza a virus[J]. *Journal of Virology*, 1997, 71(5):4062.
 - [12] Yoshimoto J, Kakui M, Iwasaki H, et al. Identification of amino acids of influenza virus HA responsible for resistance to a fusion inhibitor, stachyflin[J]. *Microbiology&Immunology*, 2000, 44(8):677-685.
 - [13] Seizer P, Gawaz M, May A E. Platelet-monocyte interactions—a dangerous liaison linking thrombosis, inflammation and atherosclerosis[J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2008, 15(20):1976-1980.
 - [14] Tashiro M, Klenk H D, Rott R. Inhibitory effect of a protease inhibitor, leupeptin, on the development of influenza pneumonia, mediated by concomitant bacteria[J]. *Journal of General Virology*, 1987, 68(7):2039-2041.
 - [15] Puzis L E, Lozitsky V P. Action of epsilon-aminocaproic acid on the proteolysis system during experimental influenza in mice[J]. *Acta Virologica*, 1988, 32(6):515.
 - [16] Lee M G, Kim K H, Park K Y, et al. Evaluation of anti-influenza effects of camostat in mice infected with non-adapted human influenza viruses[J]. *Archives of Virology*, 1996, 141(10):1979-1989.
 - [17] Zhirnov O P, Klenk H D, Wright P F. Aprotinin and similar protease inhibitors as drugs against influenza[J]. *Antiviral Research*, 2011, 92(1):27-36.
 - [18] Ochiai H, Sakai S, Hirabayashi T, et al. Inhibitory effect of bafilomycin A1, a specific inhibitor of vacuolar-type proton pump, on the growth of influenza A and B viruses in MDCK cells[J]. *Antiviral Research*, 1995, 27(4):425-430.
 - [19] Morgan D J, Okeke I N, Laxminarayan R, et al. Non-prescription antimicrobial use worldwide: a systematic review[J]. *Lancet Infect Dis*, 2011, 11(9):692.
 - [20] Pielak R M, Chou J J. Influenza M2 proton channels[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2011, 1808(2):522.
 - [21] Bachrach U. Antiviral activity of oxidized polyamines[J]. *Amino Acids*, 2007, 33(2):267-272.
 - [22] Fytas C, Kolocouris A, Fytas G, et al. Influence of an additional amino group on the potency of aminoadamantanes against influenza virus A. II - synthesis of spiropiperazines and in vitro activity against influenza A H3N2 virus[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2010, 38(6):247-251.
 - [23] Zhao X, Jie Y, Rosenberg M R, et al. Design and synthesis of pinanamine derivatives as anti-influenza A M2 ion channel inhibitors[J]. *Antiviral Research*, 2012, 96(2):91-99.
 - [24] VRTX-GEN. VX-787 治疗流感 II 期试验成功 [J]. *中国处方药*, 2013, 11(1):23.
 - [25] Tomassini J E, Davies M E, Hastings J C, et al. A novel antiviral agent which inhibits the endonuclease of influenza viruses[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1996, 40(5):1189-1193.
 - [26] Haffizulla J, Hartman A, Hoppers M, et al. Effect of nitazoxanide in adults and adolescents with acute uncomplicated influenza: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b/3 trial[J]. *Lancet Infectious Diseases*, 2014, 14(7):609.
 - [27] Kao R Y, Dan Y, Laishan L, et al. Identification of influenza a nucleoprotein as an antiviral target[J]. *Nature Biotechnology*, 2010, 28(6):600-605.
 - [28] Cheng H M, Wan J T, Lin M I, et al. Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of 1H-1,2,3-Triazole-4-carboxamide derivatives as new anti-influenza a agents targeting virus nucleoprotein[J]. *J Med Chem*, 2012, 55(5):2144-2153.
 - [29] O'Dwyer K, Hackel M, Hightower S, et al. Comparative analysis of the antibacterial activity of a novel peptide deformylase inhibitor, GSK1322322[J]. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 2013, 57(5):2333.
 - [30] Luv O, Domracheva E V, Udovichenko A I, et al. Chromosomal aberrations in myelodysplastic syndrome[J]. *Terapevticheski Arkhiv*, 2005, 77(7):27-33.
 - [31] Lin F, Shelton S E, Espíndola D, et al. 3-D ultrasound localization microscopy for identifying microvascular morphology features of tumor angiogenesis at a resolution beyond the diffraction limit of conventional ultrasound[J]. *Theranostics*, 2017, 7(1):196-204.