靶向流感病毒进入(细胞)抑制剂研究进展

李曼, 李海伟, 梁烁斌, 田振宇, 周德敏, 肖苏龙*

北京大学药学院, 天然药物及仿生药物国家重点实验室, 北京 100191

*通讯作者, E-mail: slxiao@bjmu.edu.cn

收稿日期: 2018-04-23; 接受日期: 2018-07-23; 网络版发表日期: 2018-10-16

国家自然科学基金(编号: 91753202, 81573269, 21572015, 21702007)及国家重点研发计划(编号: 2016YFA0501500)资助项目

摘要 目前临床上抗流感病毒感染的药物主要有M2离子通道抑制剂及神经氨酸酶抑制剂两大类。随着流行性感冒、季节性流感、高致病性禽流感的爆发以及耐药流感病毒株的出现, 使得对具有新作用机制的抗流感药物的需求更加紧迫。近年来, 随着流感病毒进入细胞分子机制研究的深入, 为以“病毒进入细胞为靶”的抗流感抑制剂的研究带来了契机。本文在介绍流感病毒进入细胞分子机制的基础上, 重点介绍了靶向流感病毒进入的抑制剂及其作用机制的最新研究进展。

关键词 流感病毒, 进入抑制剂, 血凝素, 膜融合

1 引言

2017年7月, *Science*出版了专辑“Emerging Infectious Diseases”^[1], 以应对突发传染性疾病给人类带来的巨大危害, 而流感病毒感染是目前世界上最主要的传染性疾病之一。

流感是由流感病毒引起的一种急性、传染性呼吸系统疾病。流感病毒在病毒分类学上属于正黏病毒科(*Orthomyxoviridae*), 根据其核蛋白(nucleoprotein, NP)和基质蛋白(matrix protein, M)抗原决定簇的不同, 可分为A型、B型和C型3种。其中A型(甲型)流感病毒具有广泛的宿主性, 可以感染飞鸟、家禽及人类, 从而引起全球大规模爆发性流行, 且变异性最强, 具有极高的发病率和死亡率。自20世纪以来, 甲型流感病毒主要引起了4次大型流感, 即1918年的西班牙流感(H1N1)、1957年的亚洲流感(H2N2)、1968年的香港

流感(H3N2)以及2009年墨西哥流感(H1N1)^[2,3]。其中1918年席卷全球的西班牙流感导致了5000多万人丧生。最近爆发的一次流感大流行是2009年墨西哥流感, 共造成1万多人死亡, 并在几周内迅速蔓延至全球200多个国家和地区。除了流感大流行以外, A型及B型流感病毒引起的季节性流感每年可致使全球29.1~64.6万人死亡^[4]。近年来高致病性禽流感的局部爆发, 如1997年香港流行的H5N1^[5]及2013年东南亚流行的H7N9^[6], 也同样给社会 and 经济发展带来非常严重的影响。

流感防治的一个主要策略是疫苗免疫, 但疫苗的有效性取决于疫苗毒株与某一特定流行季节中流行株之间的抗原匹配度以及疫苗接种者的年龄及健康状况。流感病毒变异的速度非常快, 容易导致流感疫苗失效。据美国疾病预防控制中心(CDC)统计^[7], 2014~2015年流感疫苗对各年龄层的总体有效性仅为23%, 而对18~49岁族群的有效性只有12%。为了应对流感病毒的

引用格式: Li M, Li H, Liang S, Tian Z, Zhou D, Xiao S. Recent progress of novel anti-influenza entry inhibitors. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 1347–1364, doi: 10.1360/N032018-00100

变异, 流感疫苗必须持续地更新换代. 最近, 世界卫生组织(WHO)基于当前流感的流行病学、病毒的特性和候选疫苗的适用性, 发布了2018~2019年度北半球季节性流感四价疫苗的组分^[8].

抗流感病毒药物在流感的早期防治中具有非常重要的作用. 迄今为止, 食品药品监督管理局(FDA)批准的抗流感药物主要有两类: M2离子通道蛋白抑制剂(金刚烷胺和金刚乙胺)^[9]和神经氨酸酶抑制剂(奥司他韦、扎那米韦及帕拉米韦)^[10]. 此外, 1993年在俄罗斯上市的盐酸阿比朵尔是一种广谱的抗病毒抑制剂, 对甲型及乙型流感病毒均具有一定的抑制作用^[11]. 2010年及2018年在日本上市的两款抗流感病毒药物拉尼米韦及Xofluza (Baloxavir marboxila)分别为神经氨酸酶抑制剂和CAP依赖型核酸内切酶抑制剂^[12,13], 对甲型及乙型流感病毒也均具有较好的防治作用. 但是各类抗流感药物的长期使用也带来了相应的耐药性问题. 据美国疾病预防控制中心抽样调查发现, 1992~2005年间, 美国分离的季节性流感H3N2亚型流感病毒中具有金刚烷胺抗性的比例从0.3%急剧上升到92.3%; 在2008~2009年流行的H3N2病毒和2009年大流行的H1N1病毒中, 100%的毒株对金刚烷类药物都具有显著的耐药性, 99.6%的季节性H1N1流感病毒对达菲具有耐药性^[14]; 此外, H7N9禽流感病毒在短时间内也已出现了对达菲耐药的毒株^[15].

流感病毒是一类以RNA基因组为遗传物质的病原体, 其显著特点是病毒复制过程中所依赖的聚合酶在RNA合成过程中高错配率以及缺乏“校正”机制, 容

易导致病毒包膜上的3种糖蛋白, 即血凝素(hemagglutinin, HA)、神经氨酸酶(neuraminidase, NA)及M2离子通道蛋白(M2 protein ion channel)发生突变, 这些突变在子代病毒的RNA基因中保留下来^[16]. 另外, 动物流感病毒可与人流感病毒之间发生重组, 甚至直接传播给人类. 正是RNA病毒基因复制的高突变率以及跨种属病毒之间重组现象的发生, 导致耐药性突变株的快速出现.

鉴于目前针对病毒复制和释放为主的抗流感药物容易失去活性, 人们重新去认识流感病毒的生命周期以发现新的抗流感病毒药物. 病毒进入细胞是病毒感染的第一步, 实际上就是病毒与宿主细胞相互识别的过程. 近年来, 对流感病毒膜蛋白与宿主细胞表面受体的相互作用, 进而进入细胞的研究已取得了较大的进展^[17,18], 使得以病毒进入细胞为靶的抗流感抑制剂的研究成为抗流感药物研发的热点^[19,20]. 本文首先简要介绍了流感病毒进入细胞的机制, 然后重点阐述了靶向流感病毒抑制剂的研究进展和现状.

2 流感病毒进入细胞的机制

作为一种典型的包膜病毒, 流感病毒进入宿主细胞的过程主要包含以下3个步骤(图1): (1) 流感病毒通过HA蛋白识别宿主细胞的受体分子唾液酸(sialic acid, SA), 触发了宿主细胞对流感病毒的内吞作用, 内体包载病毒运输到细胞核附近; (2) 内体的pH变为酸性, 使HA蛋白发生构象变化, 将融合肽插入宿主膜中, 诱导

图1 流感病毒进入细胞的过程(网络版彩图)

Figure 1 The process by which influenza virus enters into the cell (color online).

膜融合; (3) 流感病毒的基因片段通过融合孔释放到细胞内^[21].

2.1 吸附阶段

流感病毒进入细胞的第一个阶段是吸附, HA在该过程中扮演了非常重要的角色. 流感病毒表面存在着大量的HA蛋白, 而宿主细胞表面上存在着可被HA识别的SA受体. HA与SA的相互作用是吸附的关键. 在通常情况下, 该吸附过程是多步骤的. 首先大量的低亲和力受体使病毒与宿主细胞接触, 随后高亲和力受体的结合使病毒完全附着并触发对病毒颗粒的吸收.

HA是存在于流感病毒包膜上的糖蛋白, 具有融合肽、受体结合位点、亚稳态结构序列和跨膜结构域. HA具有多种亚型, 功能多样, 主要是介导病毒的吸附与融合. HA蛋白在病毒表面以同源三聚体的形式存在(图2(a)), 可分为呈球状的头部分(HA1)及呈杆状的基底部(HA2)两部分(图2(b))^[22]. HA2通过短的疏水序列将HA与病毒包膜连接, 该区域的保守部位高度糖基化, 以维持分子的结构稳定性; HA1也有糖基化, 但不同的HA亚型的糖基化类型是高度可变的. HA的结合口袋(receptor-binding pocket, RBP)位于HA1的远端, 在不同的HA亚型中高度保守, 该位置和邻近部位的突变可改变HA受体的特异性.

宿主细胞表面富含糖蛋白和脂质, 而唾液酸是它们所含的寡糖链中的远端残基. 在通常情况下, 唾液

酸通过 α -2,3或 α -2,6糖苷键与半乳糖相连^[23], 这种连接带来的结构性差异决定了流感病毒与其受体结合的选择性. 唾液酸 α -2,3半乳糖苷为禽源流感病毒受体, 主要分布在下呼吸道表面细胞(肺泡表面细胞)上, 而唾液酸 α -2,6半乳糖苷为人源流感病毒受体, 主要分布在上呼吸道表面细胞上. 唾液酸残基是流感病毒与宿主细胞结合的主要靶点, 占据了整个受体结合口袋. 单个唾液酸残基与单个HA之间的亲和力较弱, 但此过程存在明显的多价效应, 即多个HA分子结合多个糖蛋白上的SA, 使得病毒与宿主细胞表面结合时具有高亲和力和高特异性.

2.2 内吞过程

流感病毒颗粒附着于宿主细胞后, 通过多种内吞的途径被细胞摄入胞内. 成像研究显示, 病毒主要通过受体介导的内吞进入细胞, 形成网格蛋白包被的囊泡^[24]. 也有研究表明, 流感病毒能够利用网格蛋白和非网格蛋白的途径进入细胞, 而非仅仅通过网格蛋白介导的内吞. 最近的研究还发现, 巨噬细胞的巨胞饮作用是流感病毒内吞的替代途径^[25]. 巨胞饮是指巨噬细胞通过肌动蛋白形成大的内吞囊泡, 以摄取较大尺寸的物质. 如果在感染过程中没有血清, 流感病毒主要通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞; 如果在感染过程中存在血清, 流感病毒则主要通过肌动蛋白参与的替代途径进入细胞.

图2 HA蛋白的结构. (a) HA三聚体; (b) HA单体; (c) pH诱导HA构象的变化^[21] (网络版彩图)

Figure 2 Structure of HA protein. (a) HA trimer; (b) HA monomer; (c) pH induces HA conformation change^[21] (color online).

迄今为止, 对于HA与末端为SA取代的多糖链的结合是否足以引起病毒颗粒的内吞尚不清楚。但研究表明, 内吞过程可能需要其他的受体来协助病毒的摄取。网格蛋白包被的细胞凹陷的形成速度在病毒附着点处比细胞表面的其他区域更快, 这表明流感病毒不仅可以特异性地通过网格蛋白介导的内吞作用触发对病毒颗粒的摄取, 还可能与细胞表面其他受体发生相互作用以激活内吞所需的下游信号转导过程。内吞辅助蛋白Epsin-1可以定位流感病毒附着位点, 这正好与网格蛋白包被凹陷的位点重合^[26]。降低Epsin-1的表达可以抑制网格蛋白介导的流感病毒的内吞作用, 但不能抑制其他配体(如转铁蛋白)的胞吞作用, 提示Epsin-1只在网格蛋白介导病毒进入的过程中发挥作用, 表明流感病毒触发的某些通路与经典的网格蛋白介导的胞吞有所不同。

此外, 受体酪氨酸激酶(RTKs)在摄取流感病毒颗粒的过程中发挥着重要作用。流感病毒吸附宿主细胞时可激活表皮生长因子(EGFR), 从而促进病毒进入细胞。最近的研究发现, 激活磷酸肌醇特异性磷脂酶c1(PLCc1, 作用于EGFR的下游)是H1N1病毒进入细胞所必需的。非常有趣的是, H1N1和H3N2病毒都能在附着后激活EGFR, 但只有H1N1病毒能激活PLCc1, 这表明不同的流感病毒亚型能够特异性激活不同的信号传导途径以促进病毒进入细胞。

2.3 内体的运输

流感病毒通过受体介导的内吞作用或者巨胞饮作用进入细胞后, 病毒首先定位于初级内体(EEs), 然后到达次级内体(LEs)。内体可利用不同运输系统向细胞内部迁移, 并使pH发生变化。

病毒的内体运输需要肌动蛋白和微管的协助^[27]。通过荧光标记病毒观察单个病毒的运动轨迹, 可将病毒运输分成3个不同的阶段^[28]: 第一阶段, 内体在细胞膜附近运输, 该过程依赖肌动蛋白, 为早期内体; 第二阶段, 含病毒颗粒的早期内体在肌动蛋白的帮助下发生快速定向运动; 第三阶段, 病毒颗粒沿着微管移动到核周区域, 在这个位置发生第一次酸化(pH约6.0)。这种转运模式与内体途径息息相关: 包载物质的初级内体(EEs)通过肌动蛋白依赖性转运离开细胞表面, 然后通过肌动蛋白和动力蛋白沿着微管运输到细胞核。同时, EEs不断与高尔基体网络交换囊泡, 从而不断成

熟^[29]。次级内体(LEs)是EEs在依赖微管转运至细胞核附近的过程中形成的, 这个过程需要其与溶酶体或其他次级内体交换囊泡。从EEs到LEs的过程由“Rab开关”控制, Rab蛋白是在调节内体运输中起关键作用的细胞GTP酶, 不同的囊泡运输需要用到不同的Rab蛋白。

此外, 蛋白激酶C- β II (PKC- β II)也与流感病毒在内体中的运输有关。若用PKC- β II抑制剂预先处理细胞, 再感染病毒, 会导致病毒颗粒积聚在次级内体中而不发生融合。此外, 作为E3泛素连接酶复合物的骨架蛋白Cullin 3也被证明与次级内体中流感病毒的进入有关^[30], Cullin 3的消耗会抑制其他物质(如表皮生长因子)的运输, 表明该蛋白对于多种物质的运输是必需的。

2.4 HA介导的膜融合阶段

在流感病毒遗传物质的核转运之前, 病毒和内体膜会发生融合并将vRNPs释放到细胞质中。该过程是由低pH环境和流感病毒的HA蛋白所驱动的, 在次级内体的酸性环境中(pH约5.0)诱导病毒发生膜融合。在内体的酸化过程中, 质子泵具有重要的作用, 它能将质子输送到内体的腔内, 使其逐步酸化。一旦流感病毒处于次级内体的酸性环境中, HA就会发生构象变化, 使融合肽暴露并定位于内体膜。在最终的构象变化之后, 融合肽插入膜中, 使得病毒膜与内体膜紧密靠近。在融合过程中, HA三聚体同时产生构象变化, 释放折叠能量来促进膜融合(图2(c))。最后两种膜彼此融合并形成融合孔。通过融合孔, vRNPs可以释放到细胞质中。在融合期间, v-ATP酶复合物对于内体的酸化来说是必需的, 其能水解ATP作为酸化的驱动力。

在病毒和内体膜融合后, vRNPs释放到细胞质中, 流感病毒脱壳完成。该过程需要病毒基质蛋白M1和膜蛋白M2的协同作用。M1蛋白的中间结构域是RNP上的NP结合的位点, 将含有糖蛋白的病毒膜与位于病毒核心的RNP连接起来。在脱壳的过程中, 也需要病毒膜蛋白M2的作用。M2蛋白为流感病毒第七RNA节段编码的第二种蛋白质, 为跨膜蛋白, 其N端含有23个氨基酸残基, 位于细胞膜外; 其C端含有54个氨基酸残基, 位于细胞质。M2蛋白具有选择性的离子通道活性, 受pH调节。在较低的pH下, 离子通道活性增加。另外, 研究发现M1蛋白在酸性条件下可从RNP结构中被选择

性去除. 在内体酸化时, M2介导质子从内体进入病毒颗粒, 导致病毒颗粒内的pH降低, 这将促进病毒粒子从RNP中去除M1蛋白, 导致vRNPs释放到细胞质中^[23].

完成脱壳过程后, RNP通过细胞核转运蛋白途径被运送到核内. NP将在细胞核中累积, 而M1在细胞质和细胞核之间分布. RNP的3种聚合酶亚基和NP蛋白都具有核定位信号(NLS), 然而RNP的进入只取决于NP蛋白中的NLS. 此外, CSE1L是细胞核和细胞质之间的核转运蛋白循环所需的细胞因子, 并且已被证明是RNP进入所必需的. 在感染后期单个聚合酶蛋白进入细胞核时, 聚合酶亚基上的NLS发挥主要作用. RNP进入细胞核后, 核黄素与RanGTP结合, 使RNP释放, 这标志着病毒进入过程的完成.

3 靶向流感病毒进入的抑制剂

3.1 天然产物类

天然产物一直是新药研究和开发的重要源泉^[31]. 我国有着非常丰富的中药资源, 板蓝根、甘草、金银花、大青叶及柴胡等中药对流感均有一定的抑制作用, 在流感的防治方面具有独特的优势和广阔的发展前景. 对中药抗流感病毒有效成分及作用靶点开展研究, 有望发现结构新颖、作用机制独特的抗流感先导化合物^[32].

3.1.1 五环三萜类

五环三萜类化合物以游离或者与糖形成苷、酯的形式广泛分布于自然界的动物、植物以及微生物中, 是自然界第二大类次生代谢产物. 五环三萜母核由30个碳原子组成, 其结构根据异戊二烯规则可视为六个异戊二烯聚合而成, 含有A、B、C、D 4个六元环, E环又包括五元环和六元环两种类型. 基于骨架结构衍生出的五环三萜类型中, 以齐墩果烷型、乌苏烷型、羽扇豆烷型以及木栓烷型研究最为深入. 五环三萜类化合物存在于多种药用植物中, 如人参、甘草、黄芪等, 具有抗肿瘤、肝保护、抗炎、杀菌等活性. 近年来, 五环三萜类化合物的抗流感病毒的活性日益受到关注^[33].

甘草是我国传统中药材, 应用历史悠久, 具有广谱的抗病毒活性. 甘草次酸(glycyrrhizic acid, **1**)及甘草

酸(glycyrrhizin, **2**)是甘草中最主要的活性成分(图3). 甘草酸是由一分子甘草次酸和两分子葡萄糖醛酸组成. 1983年, Pompei等^[34]首次报道甘草次酸能够抑制鸡胚中流感病毒的繁殖. 通过流式细胞内化分析的研究发现甘草酸能够抑制流感病毒内吞进入细胞^[35]. 最近, 从甘草中分离得到的甘草皂苷uralsaponin M (**3**)和uralsaponin T (**4**)对A/WSN/33流感病毒具有一定的抑制作用(半数抑制浓度 IC_{50} : 39.6~48.0 μ M)^[36]. 白桦脂酸主要存在于白桦树的树皮中, 对多种肿瘤及HIV病毒均有明显的抑制作用^[37]. 近年来人们发现, 从中药鹅掌柴中分离得到的酸性白桦脂酸衍生物(**5**和**6**)具有较弱的抗流感病毒的活性(IC_{50} : 2.3~358.4 μ M)^[38].

Song等^[39]对皂苷衍生物库的抗流感病毒活性进行了筛选, 发现了马铃薯三糖薯蓣皂苷chlorogenin 3-O- β -chacotrioside (**7**)和chlorogenin 6- α -O-actyl-3-O- β -chacotrioside (**8**)具有较强的抗H5N1禽流感病毒进入的活性, IC_{50} 分别为7.22和9.25 μ M. 以此为先导化合物, 该课题组^[40~42]进一步在五环三萜C3-OH引入马铃薯三糖并研究了它们的抗流感病毒的构效关系. 研究表明, 五环三萜苷元对其抗流感活性非常重要, 马铃薯三糖齐墩果酸皂苷的17-位羧基酯化(**9**)或者酰胺化(**10**)可以显著提高其抗H5N1病毒活性, 酰胺化修饰还可以降低其对靶细胞的毒性. 11-位氧化成羰基(**11**)以及3-位手性碳由 β 构型转换为 α 构型等均可以显著提高抗病毒活性. 该研究发现, 马铃薯三糖熊果酸皂苷**12**的活性最好, IC_{50} 达到了0.98 μ M. 由于该系列化合物对VSVG假病毒及神经氨酸酶NA均没有抑制作用, 表明其能特异性地与H5N1假病毒的HA蛋白结合.

本课题组建立了抗流感病毒进入的筛选平台, 并对一系列五环三萜皂苷衍生物的抗流感病毒活性进行了筛选, 发现刺囊酸半乳糖皂苷Q8 (**13**)具有很好的抗A/WSN/33流感病毒的活性(半数有效浓度 EC_{50} =5.0 μ M). 在此基础上进一步合成了Q8的类似物Y3 (**14**)及Y5 (**15**), 二者也显示出了较好的抗流感病毒活性, EC_{50} 分别为14.2和15.1 μ M. 除A/WSN/33流感病毒外, Y3对其他A型及B型流感病毒, 如A/波多黎各/8/34、A/辽宁振兴/1109/2010、A/江西东湖/312/2006、A/湖南株晖/1222/2010及B/深圳/155/2005, 也均具有显著的抑制作用(EC_{50} : 2.72~7.41 μ M), 而且没有表现出明显的耐药性^[43]. 初步的机制探究表明, Y3能与HA的唾液酸口袋结合, 从而抑制流感病毒与宿主细胞的

图3 五环三萜衍生物(1~17)及其多价物(18~22)的结构(网络版彩图)

Figure 3 Structures of pentacyclic triterpene derivatives 1–17 and their multivalent conjugates 18–22 (color online).

膜融合而发挥抗病毒作用。基于Y3中半乳糖能与HA口袋226位谷氨酰胺、137位丙氨酸以及145位丝氨酸形成较强的氢键作用,我们进一步设计并合成了五环三萜与多羟基的维生素C及唾液酸等分子的偶联物^[44,45],发现白桦脂酸衍生物16及齐墩果酸衍生物17具有较好的抗A/WSN/33流感病毒进入的活性,EC₅₀分别为8.7和8.3 μM。

自然界多价态的存在,不仅在于高亲和力的需要,而且保证了准确的生物作用所需的高特异性,如流感病毒HA蛋白就是以三聚体形式与宿主细胞表面的唾液酸受体结合^[46]。理论上,多价化的五环三萜衍生物应该比单体化合物具有更强的与HA蛋白结合的亲和

力,从而增强其抗流感病毒的活性。本课题组^[47,48]基于环糊精良好的水溶性及生物相容性,设计并合成了一系列α-、β-或γ-环糊精与五环三萜形成的多价物。其中全甲基化-β-环糊精-刺囊酸七价物(18)及β-环糊精-齐墩果酸七价物(19)抗A/WSN/33流感病毒的IC₅₀分别达到了4.7和1.6 μM。进一步的加药时间点、血凝抑制以及表面等离子共振(SPR)实验表明多价物的作用靶点是流感病毒的HA蛋白。Yang等^[49]在人血清白蛋白(HSA)表面通过PEG-2000等连接臂偶联多个齐墩果酸,发现化合物(20~22)具有明显的抗病毒进入以及吸附病毒的活性,表明了多价化策略可以用来提高五环三萜的抗流感病毒的活性。

3.1.2 多酚类

羟基酪醇(hydroxytyrosol, **23**, 图4)是一种从橄榄中提取出来的多酚类化合物, 具有抗氧化、抗菌以及保护心血管的活性^[50]. 近来人们发现羟基酪醇对多种流感亚型, 如H1N1、H3N2、H5N1及H9N2等, 也具有抑制作用. 其作用机制可能是通过影响病毒的形态而破坏病毒的结构, 达到干扰病毒进入细胞的目的^[51]. Yang等^[52]对羟基酪醇衍生物抗流感活性的构效关系进行了研究, 发现其同系物**24**具有较强的抗流感活性, 对A/越南/1194/2004(H5N1)流感病毒株的 IC_{50} 达到了 $1.78\ \mu\text{M}$, 选择指数SI在80以上. 分子模拟实验表明, 该分子主要作用于流感病毒的HA2节段, 通过与2-位及108-位亮氨酸、109-位天冬氨酸及322-位精氨酸形成氢键结合而发挥作用. 此外, 该课题组^[53]还发现, 多酚类化合物棉酚(gossypol, **25**)也具有抗流感病毒进入的活性. 棉酚是一种黄色多酚羟基双萜醛类化合物, 主要存在于锦葵植物棉花的根、茎、叶和种子内, 棉籽仁中含量最高, 具有抗氧化、抗肿瘤以及抗病毒活性^[54]. 对手性棉酚的醛基进行一系列修饰后发现, 与氨基酸偶联的衍生物的抗流感活性明显提升, 化合物**26**~**28**对A/越南/1194/2004(H5N1)的 IC_{50} 分别为0.47、0.25和 $0.32\ \mu\text{M}$ ^[53].

黑茶中的茶黄素(theaflavin, **29**)及其衍生物(**30**~**32**)具有良好的抗流感病毒活性^[55]. 血凝抑制实验

显示, 化合物**29**对A/波多黎各/8/34(H1N1)及A/悉尼/5/97(H3N2)的最小有效浓度(MEC)分别为 6.55 及 $4.36\ \mu\text{M}$. 进一步的研究发现, 在病毒与细胞共孵育前加入化合物**29**~**32**的活性比共孵育及感染后加入化合物的活性强, 其中以化合物**30**的抗流感活性最强($IC_{50}=0.81\ \mu\text{M}$), 另外3种化合物(**29**、**31**及**32**)的活性略弱, IC_{50} 为 2.43 ~ $9.62\ \mu\text{M}$.

姜黄素(curcumin, **33**)是从姜黄中药中分离出来的一种多酚类化合物, 具有一系列药理活性, 包括抗炎、抗氧化以及抗肿瘤活性等^[56]. Hsu等^[57]发现, $30\ \mu\text{M}$ 的姜黄素能抑制90%以上的病毒, 进一步通过噬斑实验测定姜黄素抗流感活性的 EC_{50} 为 $0.47\ \mu\text{M}$, 选择指数为92.5. 通过对姜黄素**33**及其类似物**34**和**35**抗流感活性的研究, 发现姜黄素分子中的甲氧基的数量对其抗流感活性的影响并不是很大. 除了流感病毒以外, 姜黄素对其他包膜病毒(如I型牛疱疹病毒^[58]、HCV^[59]、寨卡病毒、基孔肯雅病毒^[60]及诺瓦克病毒^[61])均具有抑制作用, 而对非包膜病毒(如肠病毒71^[62]、科萨基病毒^[60])则没有抑制作用. 由此可见, 姜黄素对于包膜病毒(包括流感)感染宿主细胞的抑制作用主要是通过干扰病毒包膜与宿主细胞的膜融合过程.

槲皮素(quercetin, **36**)是植物界广泛分布的一种黄酮类化合物, 近年来发现槲皮素具有抗多种病毒的活性^[63]. Wu等^[64]发现, 槲皮素具有广谱的抗流感病毒进入的活性, 对A/波多黎各/8/34(H1N1)、A/FM-1/47/1

图4 多酚类化合物(**23**~**37**)的结构

Figure 4 Structures of polyphenols **23**~**37**.

(H1N1)以及A/爱知/2/68(H3N2)的 IC_{50} 分别为25.68、20.61和9.07 μM 。此外,在基于假病毒模型的药物筛选中还发现,槲皮素可以抑制H5N1禽流感病毒进入宿主细胞的活性。表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG, **37**)是茶多酚中最有效的活性成分,最近研究发现,EGCG能和流感病毒表面的唾液酸竞争性结合,从而抑制病毒的黏附作用^[65]。

3.1.3 其他类

Dang等^[66]基于罗汉松酸(**38**)的结构设计了一系列二萜类衍生物(图5),部分衍生物对于奥司他韦和金刚烷胺耐药的A/波多黎各/8/34(H1N1)流感病毒株具有纳摩尔级别的抑制活性,其中**39**及**40**的 EC_{50} 分别为0.16和0.14 μM ,比罗汉松酸($EC_{50}=18.2 \mu M$)的活性提高了大约100倍。中药*Rhizoma Curcuma*的主要成分germacrone (**41**)能明显抑制A/波多黎各/8/34病毒的吸附及进入作用($IC_{50}=6.04 \mu M$)^[67]。

近年来,真菌代谢物的抗病毒活性引起了人们的关注。Sacramento等^[68]发现,*Chaetomium coarctatum*的代谢物aureonitol (**42**)可以有效地抑制甲型和乙型流感病毒的复制。该化合物对B型流感病毒及实验室所驯化的A (H3N2)型流感病毒的 EC_{50} 分别为2.0 μM 和100 nM,而它的细胞毒性很低($CC_{50}=1426 \mu M$)。进一步的研究发现,aureonitol具有血凝抑制活性,而对NA没有抑制作用。分子模拟显示,该化合物主要结合在流

感病毒HA蛋白的唾液酸结合口袋,从而阻止病毒进入。我国学者从深海真菌*Spiromastix sp.* MCCC 3A00308中分离得到了一系列卤代spiromastilactones衍生物并对其抗流感构效关系进行了研究^[69],发现化合物**43**具有较强的抗A/WSN/33(H1N1)流感病毒的活性($IC_{50}=6.0 \mu M$)。由于该化合物可以同时靶向流感病毒的HA蛋白和核糖核蛋白(RNP),因而可同时抑制流感病毒进入和复制两个环节,为双靶点抗流感病毒抑制剂。此外,Chen等^[70]还从深海赤霉菌F33中分离得到了15种异戊二烯取代的吡咯哌嗪二酮生物碱,发现这一类化合物的抗流感病毒的活性与哌嗪二酮基上取代基及不饱和度密切相关,其中化合物 neoechinulin B (**44**)显示出了中等程度的抗流感病毒进入的活性($IC_{50}=27.4 \mu M$)。上述研究表明,海底真菌可为新型抗病毒药物的研发提供结构新颖的先导化合物。

糖肽抗生素可以阻断病毒进入细胞核,因而具有广谱的抗病毒活性^[71-73]。替考拉宁(teicoplanin, 又称太古霉素)是由游动放线菌属经发酵、提取后得到的一种糖肽类抗生素,可抑制细菌细胞壁合成。对聚乙二醇连接的替考拉宁拟糖苷衍生物的抗流感病毒活性的研究发现,其糖链被两个脂肪性的正辛基取代时具有较强的抗流感病毒进入的活性^[74]。其中化合物**45**对A/PR/8/34(H1N1)、A/弗吉尼亚/ATCC3/2009(H1N1)以及A/HK/7/87(H3N2)均具有较强的抑制活性, EC_{50} 分别为0.80、1.4和1.8 μM ;其类似物**46**对后两种流感病毒

图5 天然产物(**38-44**)及太古霉素衍生物(**45-46**)的结构

Figure 5 Structures of natural products **38-44** and teicoplanin derivatives **45-46**.

株也有很好的抑制作用, EC_{50} 分别为1.8和2.3 μM ^[74].

3.2 多肽类

由病毒自身融合肽衍生而来的多肽具有抑制病毒进入宿主细胞的能力, 如已上市的抗HIV-1药物恩夫韦地(Enfuvirtide, T20), 是由gp41 HR2序列衍生而来的含有36个氨基酸的合成多肽, 可竞争性地结合于HR1三聚体螺旋结构, 从而阻止HR1-HR2六螺旋束的形成^[75]. 恩夫韦地作为抗HIV-1进入抑制剂的研发成功, 为多肽类抗流感病毒药物的研究带来了曙光. 多肽主要通过两种途径达到抑制流感病毒进入细胞的目的, 一是与HA头部(HA1)唾液酸受体结合, 从而阻碍病毒与细胞吸附; 二是与HA茎部(HA2)结合, 抑制HA在酸性pH诱导下的变构, 从而阻碍病毒与细胞的膜融合过程.

3.2.1 靶向HA头部(HA1)的多肽

基于高致病性禽流感H5N1病毒的HA蛋白, Chen等^[76]构建了含有18个氨基酸残基的59个HA片段肽库. 结果发现, 由HA1蛋白第221~238位氨基酸组成的多肽HA-pep25 (SKVNGQSGRMEFFWTILK, **47**)能与宿主细胞表面的唾液乳糖产生较强的结合作用, 从而屏蔽宿主细胞表面的受体, 达到阻止H1N1、H5N1及H7N9等流感病毒进入细胞的目的(IC_{50} =12.0~51.0 μM).

Tkip (**48**, FP1)是细胞因子信号抑制因子(suppressor of cytokine signaling, SOCS)蛋白的模拟物, 为由12个氨基酸组成的酪氨酸激酶抑制剂, 具有抗炎的活性^[77]. 噬斑实验发现, Tkip及其系列衍生肽(**49**~**54**)对A/WSN/33(H1N1)流感病毒株具有较好的抑制活性^[78]. 其中仅含有10个氨基酸的截短型多肽FP7就可以与HA结合, 从而抑制A/WSN/33(H1N1)病毒的感染(IC_{50} =155 nM) (表1). FP4具有广谱的抗流感病毒的活性, 对A/WSN/33(H1N1)、PR8/Eng09(H1N1)、PR8/Vic(H3N2)及PR8/Viet(H5N1)等亚型的流感病毒株均有一定的抑制作用.

Jones等^[79]发现, 成纤维细胞生长因子-4 (FGF-4)信号序列中含有20个氨基酸的多肽EB (**55**, 图6)具有广谱的抗流感病毒活性, 包括高致病性禽流感A/香港/483/97(H5N1)病毒, 其半数有效抑制浓度为3.5 μM . 初步的机制研究认为, EB可能与HA1蛋白的受体结合口袋相互作用, 从而阻断了流感病毒与其受体的结合. 通过对截短型EB衍生物抗流感活性的筛选发现, 含有18

表1 FluPep系列多肽的抗流感病毒活性^[78]

Table 1 Antiviral activities of FluPeps on A/WSN/33 (H1N1) virus [78]

多肽	序列	IC_{50} (μM)
48 (FP1)	WLVEFVIFYFFR	0.094
49 (FP2)	WLVEFVIAYFAR	0.00087
50 (FP3)	WLVEFVIFYFFRRRKK	0.00003
51 (FP4)	RRKKWLVEFVIFYFFR	0.00004
52 (FP7)	RRKKIFYFFR	0.155
53 (FP8)	WLVEFVRRKK	0.64
54 (FP9)	FFVIFYRRKK	1.48

55: RRKKAVALPALLPAVLLALLAP

56: RRKKVALLPAVLLALLAP

57: RRKKLPAVLLALLAP

58: RRKKVALLAVLLALLA

59: RRKKLAVLLALLA

66: NTYDHSKYREEAMQNRIDPVKLSSGYKDV-GSGSG-Chol

74: GCKKYRRFRWKFKGKFWFWG

图6 多肽(**55**~**59**, **66**及**74**)的氨基酸序列

Figure 6 Amino acid sequences of peptides **55**~**59**, **66** and **74**.

个和16个氨基酸的EB衍生物(B7: **56**, B10: **57**)同样具有较好的抗流感病毒活性; 在上述基础上, 进一步去除两个脯氨酸后的16肽(B7^{NP}: **58**)和13肽(B10^{NP}: **59**)也具有较好的抗A/波多黎各/8/34(H1N1)流感病毒活性, EC_{50} 分别为0.3和5.0 μM ^[80]. B10^{NP}为保持其抗流感病毒活性的最小多肽, 继续截短使得活性迅速消失.

3.2.2 靶向HA茎部(HA2)的多肽

流感病毒的HA蛋白具有较好的保守性, 近来发现基于HA蛋白氨基酸序列衍生的多肽能够竞争性抑制HR1-HR2六股螺旋束的形成, 从而产生抗病毒活性. 将流感病毒HA2蛋白N端第1~20个氨基酸组成的多肽HA-FP-1 (**60**)中一些带负电或中性氨基酸替换为带正电的赖氨酸, 可以获得一系列带正电的融合肽(positively charged fusion peptides, pFPs, **61**~**65**), 该类多肽对多种流感病毒(包括奥司他韦耐药株)均有抑制作用, 其中由H3亚型衍生的多肽**61**对A/波多黎各/8/34(H1N1)及A/爱知/2/68(H3N2)流感病毒抑制作用最强(表2), IC_{50} 分别为9.61和5.90 μM . 进一步的机制研究发现, 该类多肽主要作用于流感病毒的HA2蛋白, 通过干扰HA2构象转换从而阻断流感病毒进入细胞^[81].

表 2 A型流感病毒衍生肽的抗流感病毒活性^[81,82]

Table 2 Anti-influenza activities of peptides derived from influenza type A viruses ^[81,82]

多肽	氨基酸序列	流感亚型	IC ₅₀ (μg/mL)	
			H1N1	H3N2
60 (HA-FP-0)	GLFGAIAGFIENGWEGMIDG	H3	NA	NA
61 (HA-FP-1)	GLFGAIAGFIKNGWKGMKKG	H3	9.61±1.15	5.90±0.62
62 (HA-FP-2)	GLFGAIAGFIKGGWQGMVKG	H5	11.96±0.80	15.64±0.11
63 (HA-FP-2-1)	GLFGAIAGFIKKGWKGVMKG	H5	11.19±0.63	28.17±1.96
64 (HA-FP-3)	GLFGAIAGFIKGGWPGLVKG	H9	15.17±3.69	34.91±4.21
65 (HA-FP-3-1)	GLFGAIAGFIKKGWPGLVKG	H9	10.37±0.05	27.57±0.43

基于流感病毒膜融合的机制, 通过固相合成技术对H7N9流感病毒HA蛋白胞外区肽段(P155~185)进行结构修饰, 首先在其C-末端上引入半胱氨酸, 然后借助半胱氨酸的巯基引入胆固醇, 得到修饰后的P155-185-chol (66)^[83]. 抗流感活性显示, 该多肽能特异阻止甲型流感病毒株A/安徽/1/2013(H7N9)进入细胞(IC₅₀=0.19 μM), 并且与NA抑制剂奥司他韦及扎那米韦具有协同作用.

根据具有广谱中和抗体与HA蛋白的结合模式, 计算机辅助药物设计技术也被广泛用于设计能与HA蛋白高度保守区结合的多肽. Fleishman等^[84]设计的两种蛋白HB36 (67)和HB80 (68)与HA蛋白具有很强的亲和力. 在此基础上, 他们进一步优化蛋白并获得了HB36.3 (69)-SC1918 HA (A/南卡罗来纳/1/1918)的晶体结构, 发现通过计算机模拟设计的多肽与HA蛋白的结合模式与晶体结构非常吻合, 这是蛋白从头设计方法的一个成功实例. 最近, Kadam课题组^[85]基于广谱中和抗体FI6v3和CR9114与HA蛋白抗原结合区域的氨基酸序列设计合成了一种含有非蛋白质氨基酸的环状短肽, 经过不断的结构优化, 得到了由11个氨基酸组成的短肽P7 (70), 其能与H1和H5亚型的HA蛋白很好地结合, 通过阻碍低pH诱导的HA构象变化达到抑制膜融合的目的.

基于富含精氨酸、赖氨酸及色氨酸的多肽的抗菌活性, 通过筛选发现四肽KKWK (71)具有抗流感病毒进入活性, 在其N-端引入脂肪链可进一步增强其活性并且随着碳链的延长而增大. 脂肽C20-KKWK (72)抗A/泰国/Kan353/2004(H5N1)甲型流感病毒的进入活性的IC₅₀为2.72 mg/L; 将其中的赖氨酸替换成鸟氨酸后所得到的短肽C20-OOWO (73)同样具有较强的抗病

毒进入的活性(IC₅₀=2.14 mg/L)^[86]. 抗脂多糖肽(SALPs)能与包膜病毒的硫酸乙酰肝素集合, 从而产生广谱的抗病毒活性, 如HIV、HBV和HSV等^[87]. 最近, Hoffmann等^[88]发现, 聚阳离子多肽SALP PEP 19-2.5 (74)能阻止多种流感病毒(如H1N1、H3N2及H7N7等)对宿主细胞的黏附作用.

3.3 合成类

3.3.1 阿比朵尔及其衍生物

阿比朵尔(arbidol, 75, 图7)是一种广谱的抗病毒抑制剂, 对多种包膜病毒及非包膜病毒均具有抑制活性^[11]. 1993年, 盐酸阿比朵尔在俄罗斯首次上市, 用于防治流行性感冒和其他急性呼吸道感染.

阿比朵尔属于吡啶类小分子化合物, 对甲型和乙型流感病毒均有抑制作用. 近年来的研究表明, 该抑制剂可通过影响流感病毒的HA构象, 达到阻断病毒与宿主细胞膜融合的作用. 在流感病毒感染宿主细胞的过程中, HA介导了病毒包膜与宿主细胞膜的融合, 这种膜融合过程需要低pH条件引起的HA构象变化, 使HA2亚基中N-端融合肽暴露, 并与宿主细胞膜相互作用. Boriskin等^[11]研究表明, 阿比朵尔可以增强病毒HA的稳定性, 并可以抑制酸性条件诱导的HA蛋白向融合态的过渡. Wright等^[89]研究了阿比朵尔与H3N2和H7N9流感病毒的HA蛋白的结合作用, 确证了阿比朵尔稳定HA的前融合构象的分子机制, 并且发现阿比朵尔4-位的氨基与2-位的苯硫酚基团的合理修饰可以改善其与HA蛋白不同亚型的特异结合. 通过利用生物膜层干涉技术(biolayer interferometry, BLI)对阿比朵尔类似物与H1和H2亚型的HA蛋白的结合作用进行研究, 发现化合物76与H1亚型的HA蛋白的结合能力是阿比

图7 化合物(75~107)的结构

Figure 7 Structures of compounds 75–107.

朵尔的98倍(0.48 μM)，阿比朵尔4-位的二甲氨基去掉之后的衍生物77与H1亚型的HA蛋白的结合能力提升8倍(18 μM)。

3.3.2 唾液酸及其衍生物

流感病毒与宿主细胞的黏附及成熟的子代病毒从宿主细胞中的释放过程均与唾液酸有关。唾液酸(sialic acid, SA)是一类九碳糖，主要通过C-2位羟基以 α -糖苷键连接于糖蛋白及糖脂的末端。目前，分离和鉴定的唾

液酸类化合物有50余种，其中N-乙酰神经氨酸在自然界分布最广，因此人们常将N-乙酰神经氨酸称为唾液酸。SA是流感病毒HA蛋白的天然配体，由于单个SA与HA之间的结合力较弱，二者的结合常数较小，因此流感病毒感染宿主细胞时为多拷贝SA/HA结合，以增强其结合的亲和力和特异性。

由于流感病毒的HA蛋白是同源三聚体，因此三价配体比单价配体理应具有更强的亲和力。Waldmann等^[46]基于H5亚型HA的晶体结构中唾液酸口袋与HA

蛋白中心的距离(~ 30 Å), 以1,3,5-三羧基苯作为骨架, 以大约30 Å长度的脂肪链或肽链为连接臂, 合成了一系列三价的唾液酸糖肽。表面等离子共振实验显示, 该化合物**78**与H5亚型的HA蛋白的结合常数(K_D)及抑制常数(K_I)分别为446 nM和15 μ M。这种3价糖肽类似物不仅可以与H5亚型的HA蛋白结合, 也可与其他亚型流感病毒的HA蛋白结合。

为了研究多价物骨架的几何形状和配体的密度对其抗流感活性的影响, Bhatia等^[90]设计并合成了以线性和树突状聚甘油为骨架的唾液酸糖苷LPGSA (**79**)和dPGSA (**80**, **81**)。在相同分子量的情况下, 由于LPGSA比dPGSA的骨架体积更大, 在最佳配体密度下线性唾液酸化的聚甘油对病毒的抑制作用强于树突状唾液酸化的聚甘油类似物。此外, 他们的研究还发现多价物结构上的高配体密度并不是其抗流感活性所必需的。对于LPG₁₀SA系列的多价物, 当唾液酸配体功能化的程度(degree of functionalization, DF)值为0.4时(化合物LPG₁₀SA_{0.4})对A/X31/1(H3N2)流感病毒的抑制活性最强, IC₅₀为0.14 μ M。DF值增加或减少时, 活性反而降低。并且LPG₁₀SA_{0.4}对两种禽流感病毒株A/Mallard/439/2004(H3N2)和A/turkey/Italy/472/1999(H7N1)也具有明显的抗病毒作用。

利用唾液酸分别与人血清白蛋白(HSA)以及牛血清白蛋白(BSA)缀合得到的多价唾液酸缀合物(**82**和**83**)可以大大提高其对HA蛋白的亲和力^[91]。通过对唾液酸和蛋白质反应当量的控制可以制备出不同化合价的唾液酸缀合物。血凝抑制实验表明, 这些多价的唾液酸-糖蛋白缀合物对H3N2及H9N2的HA的抑制作用明显高于低价唾液酸苷, 而对H1N1的HA蛋白则几乎没有亲和力, 显示出对不同流感病毒亚型具有较好的选择性。

聚合物囊泡是一类由两亲性共聚物组成的自组装双层膜, 具有与细胞膜相似的结构特征。最近, Nazemi等^[92]设计了基于聚乙二醇-聚己内酯的聚合物囊泡, 通过点击化学的方法在囊泡的表面偶联了多个唾液酸, 从而抑制病毒血凝素与宿主细胞唾液酸受体的结合。通过酶联凝集素测定法发现树突状唾液酸化的聚合物囊泡对*Limax flavus*凝集素的亲和力增加了2000倍。

3.3.3 CL-385319及其衍生物

CL-385319 (**84**)为一种N-取代的哌啶类化合物。

1999年, Plotch等^[93]利用5-氟-3-三氟甲基-苯甲酰氯和1-(2-氨基乙基)哌啶反应合成得到了该化合物, 并发现其对H1及H2亚型流感病毒的进入具有明显的抑制作用, 对A/WSN/33(H1N1)及A/FM/47(H1N1)流感病毒株的IC₅₀分别为0.31和0.94 μ M。通过计算机同源模建发现CL-385319的5-位F原子可以与流感病毒HA2蛋白N-末端甘氨酸形成一个额外的氢键, 这可能是它比其他N-取代哌啶类似物, 如CL-61917 (**85**), 具有更强活性的原因。进一步研究发现, CL-385319具有广谱的抗H5N1亚型(包括A/泰国/Kan353/2004、A/青海/59/2005、A/新疆/1/2006、A/安徽/1/2005及A/香港/156/1997等)高致病性禽流感病毒的活性(IC₅₀=0.37~4.0 μ M), 而对VSVG没有抑制作用^[94]。由于该化合物不能抑制HA1与唾液酸受体结合引起的红细胞的溶血, 表明其可能作用于HA2蛋白从而抑制膜融合的过程。

以CL-385319为先导化合物, 其哌啶环被噻吩取代后的衍生物**86**能显著抑制高致病性禽流感H5N1型流感病毒感染宿主细胞^[95]。与哌啶基团相比, 噻吩可以与HA2蛋白M24₁和F110₂的侧链有着更强的 π - π 相互作用。

3.3.4 BMY-27709及其衍生物

Luo等^[96]发现水杨酸衍生物BMY-27709 (**87**)对A/WSN/33流感病毒具有很强的抑制活性, 对多种H1和H2亚型流感病毒有效(IC₅₀=3~8 μ M), 而对H3亚型流感病毒、B型流感病毒(如B/Lee/40)及VSVG无效。该化合物能够抑制病毒引起的红细胞溶血, 并且在BMY-27709耐药株中发现位于HA2蛋白的第110-位苯丙氨酸突变成了丝氨酸, 表明其主要作用于流感病毒的HA蛋白, 从而阻断了病毒的膜融合。Yu等^[97]进一步对其构效关系进行了研究, 发现喹诺里西啶的甲基能与HA蛋白形成疏水性作用, 脱去甲基则使其抗流感活性显著降低, 如BMY-27709的衍生物**88**的活性只有其1/6。当BMY-27709的5-位喹诺里西啶基为 α -构型(**89**)时则无抗流感活性。此外, 水杨酸中的取代基对其抗流感活性也具有重要的影响, 水杨酸的5-位被甲基取代后的衍生物**90**的活性提高了大约5倍(EC₅₀=0.83 μ M)。

Deshpande等^[98]基于BMY-27709及**90**先导结构, 发现了一系列的芳酰胺及芳硫酰胺衍生物具有潜在的抗流感病毒的活性, 如化合物**91**和**92**的EC₅₀为0.06~0.46 μ M。Tang等^[99]进一步对化合物BMY-27709的芳

酰胺基进行结构修饰, 合成了一系列苯磺酰胺类化合物, 发现化合物**93**及其衍生物**94**可有效预防由A/Weiss/43 (H1N1)流感病毒引起的细胞病变效应(CPE), EC_{50} 分别为210和86 nM. 由于该类抑制剂具有较好的代谢稳定性, 因而被认为是第一代可口服的HA抑制剂.

3.4 基于高通量筛选发现的抑制剂

White等^[100]利用表达了海肾萤光素酶的重组A/WSN/33流感病毒进行超高通量筛选(ultra-high-throughput screen), 从919960个化合物中发现了一些具有潜在抗流感病毒进入的抑制剂, IC_{50} 在 μmol 以下. 其中化合物S20 (**95**)对H1亚型流感病毒具有良好的活性($IC_{50}=80$ nM)而细胞毒性较低($CC_{50}=40$ μM), 选择指数SI高达500. 此外, S20对H3亚型流感病毒、B型流感病毒及VSVG均无效, 说明该化合物是H1N1及H5N1亚型的流感病毒的特异性抑制剂. 进一步的抗病毒作用机制研究表明, S20可与HA蛋白相互作用, 通过稳定HA蛋白的融合前构象达到抑制病毒膜融合的目的.

Basu等^[101]基于假病毒的高通量筛选模型发现了两个能够抑制流感病毒进入的新型小分子化合物MBX2329 (**96**)和MBX2546 (**97**), 分别为氨基酚醚和磺酰胺骨架. 这两个抑制剂均能特异性抑制A型流感病毒(如A/波多黎各/8/34(H1N1)、A/华盛顿/10/2008(H1N1)、A/佛罗里达/21/2008(H1N1-H275Y) (奥司他韦耐药株)、A/加利福尼亚/10/2009(H1N1)、A/香港(H5N1))进入细胞(IC_{50} : 0.3~5.9 μM); 并且与奥司他韦联合用药具有协同效应. 作用机制的研究表明, MBX2329和MBX2546能与HA蛋白以非重叠的方式结合, 进一步的鸡红细胞溶血实验、单克隆抗体C179的竞争抑制实验以及突变分析实验表明, 这两个化合物结合在HA蛋白三聚体的茎区, 从而抑制HA介导的融合过程.

Tang等^[102]以9种已知的HA抑制剂的最大交叠集(maximum overlapping set, MOS)相似性为基础, 对罗氏公司的化合物库进行基于配体相似性的虚拟筛选(ligand similarity-based virtual screening), 从中筛选出近2000个化合物用于进一步的细胞水平实验. 基于A/Weiss/43流感病毒感染MDCK细胞的CPE实验, 发现化合物**98**和**99**可以有效地保护MDCK细胞免于流感病毒的感染, EC_{50} 分别为2.1和27.9 μM , 而且二者对MDCK没有明显的细胞毒性($CC_{50}>100$ μM). 随后以**98**

为先导化合物, 对其进行系统的结构修饰及抗流感构效关系的研究, 发现了抑制剂**100** ($EC_{50}=0.098$ μM), 其活性较先导化合物**98**强20倍而毒性较小. 在胰蛋白酶敏感性实验中, 该化合物能与HA蛋白结合从而稳定该蛋白, 说明其能够抑制酸性条件诱导的HA构象的变化, 从而阻止膜融合的过程.

3.5 其他化合物

笼型骨架经常被用来设计抗流感病毒药物, 包括已经上市的金刚烷胺和金刚乙胺^[103]、异冰片和冰片基胺衍生物^[104]、五环十一烷^[105]等, 它们大多数是作用于流感病毒的M2蛋白. 最近的研究发现, 某些笼型化合物具有抗流感病毒进入的活性. Zarubaev等^[106]以双环庚烷为骨架合成了含有氨基的苄烯衍生物camphene (**101**), 该化合物对A/加利福尼亚/07/09(H1N1)pdm09病毒株及金刚乙胺耐药病毒株A/波多黎各/8/34(H1N1)流感病毒具有很好的抑制活性, IC_{50} 分别为3.6及8.3 μM , 且对没有M2蛋白的B型流感病毒也具有一定的抑制作用($IC_{50}=52.7$ μM), 这说明化合物**101**的作用靶点与以往金刚烷胺类化合物不同. 通过加药时间点实验显示, 该化合物主要作用于流感病毒感染的早期阶段(0~2 h), 并且对于A型和B型流感病毒的HA蛋白均具有血凝抑制活性. 动物实验也进一步验证了该化合物的抗流感病毒活性. 对于感染A/加利福尼亚/07/09(H1N1)pdm09及B/Lee/40型流感病毒的小鼠, 每天给予口服100 mg/kg的化合物**101**后, 5 d存活率分别为66.7%和88.9%.

Vanderlinden等^[107]合成了一类新的病毒膜蛋白融合抑制剂——氮杂螺环酰胺衍生物, 其中化合物**102**及**103**对A/H3N2流感病毒具有明显的抑制作用, 如化合物**102**对5种H3N2型流感病毒株(包括A/X-31、A/HK/2/69、A/Victoria/3/75、A/HK/7/87及A/爱知/2/68)的 EC_{50} 为3~23 μM , 毒性较小($CC_{50}>100$ μM). 除A/H3N2以外, 这类化合物对A/H1N1、A/H5N1、A/H7N2及B型流感病毒均没有抑制活性, 提示H3亚型的HA蛋白是此类化合物的特异性的作用靶点.

Wang等^[12]发现5-位被呋喃环取代的3-*N*-环烷基-2-硫酮噻唑烷-4-酮衍生物(**104**)具有抗病毒膜蛋白融合作用. Rowse等^[108]通过噬斑实验进一步确认了化合物**104**在pM浓度下可抑制多种流感病毒的感染($EC_{50}=27.5\sim64.8$ pM), 而其类似物**105**的抗流感活性弱

很多, 如对A/X-31及VSV病毒的EC₅₀分别为137和1240 nM, 比**104**降低了约2900倍。加药时间点实验表明, 该化合物主要作用于流感病毒感染的早期阶段, 能与流感病毒紧密结合, 但是不能抑制酸性条件诱导的流感病毒HA构象的变化。

叔丁基对苯二酚(*tert*-butyl hydroquinone, TBHQ, **106**)是一种常用的脂溶性抗氧化剂。Russell等^[109]研究发现该分子可与HA单体之间形成的疏水性口袋结合, 从而稳定中性HA蛋白的结构, 进而抑制膜融合所需要的构象重排。X晶体衍射实验显示, TBHQ分子中的极性基团有助于与Thr-592残基相互作用。

双吡啶马来酰亚胺I (**107**)是一种选择性的PKC抑制剂。近年来发现, 该抑制剂可以阻止vRNPs入核, 从而抑制A型及B型流感病毒进入细胞^[110]。

4 总结与展望

长期以来, 流感病毒严重威胁着人类的健康。抗流

感病毒药物在流感的防治中占有十分重要的地位, 特别是对于重症流感的高危人群患者。但是, 由于多年来临床上的抗流感药物种类较少, 每当季节性流感及流感大爆发时, 单一用药模式往往导致流感病毒的快速变异而产生耐药性, 因而研发新的抗流感病毒药物具有重要的意义。2003年和2007年美国FDA分别批准了两种HIV进入抑制剂Enfuvirtide和Maraviroc上市, 为抗流感病毒进入药物的研发带来了曙光。

与传统的靶向流感病毒的复制和释放的药物相比, 靶向流感病毒进入的抑制剂可在病毒感染的早期阻断病毒的复制和传播, 兼具预防和治疗的功效。更为重要的是, 该类药物可为流感的联合用药提供更多新的选择, 有望延缓或降低因流感病毒的基因突变而带来的耐药性。尽管目前还没有流感病毒进入抑制剂进入临床研究, 但是流感病毒进入细胞机制研究的深入以及针对病毒进入过程的抑制剂的不断发现, 必将极大地推动结构新颖、作用机制独特的抗流感病毒进入抑制的研发。

参考文献

- 1 Ash C. *Science*, 2017, 357: 144–145
- 2 Kilbourne ED. *Emerg Infect Dis*, 2006, 12: 9–14
- 3 Zambon M. *Curr Opin Infect Dis*, 2014, 27: 560–565
- 4 Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, Cohen C, Gran JM, Schanzer D, Cowling BJ, Wu P, Kyncl J, Ang LW, Park M, Redlberger-Fritz M, Yu H, Espenhain L, Krishnan A, Emukule G, van Asten L, Pereira da Silva S, Aungkulanon S, Buchholz U, Widdowson MA, Bresee JS. *Lancet*, 2018, 391: 1285–1300
- 5 Yuen K, Chan P, Peiris M, Tsang D, Que T, Shortridge K, Cheung P, To W, Ho E, Sung R, Cheng A. *Lancet*, 1998, 351: 467–471
- 6 Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, Xu K, Xu X, Lu H, Zhu W, Gao Z, Xiang N, Shen Y, He Z, Gu Y, Zhang Z, Yang Y, Zhao X, Zhou L, Li X, Zou S, Zhang Y, Li X, Yang L, Guo J, Dong J, Li Q, Dong L, Zhu Y, Bai T, Wang S, Hao P, Yang W, Zhang Y, Han J, Yu H, Li D, Gao GF, Wu G, Wang Y, Yuan Z, Shu Y. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1888–1897
- 7 Flannery B, Clippard J, Zimmerman RK, Nowalk MP, Jackson ML, Jackson LA, Monto AS, Petrie JG, McLean HQ, Belongia EA, Gaglani M, Berman L, Foust A, Sessions W, Thaker SN, Spencer S, Fry AM. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2015, 64: 10–15
- 8 WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2018–2019 northern hemisphere influenza season. *Wkly Epidemiol Rec*, 2018, 93: 133–141
- 9 Moorthy NSHN, Poongavanam V, Pratheepa V. *Mini Rev Med Chem*, 2014, 14: 819–830
- 10 von Itzstein M. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6: 967–974
- 11 Boriskin Y, Leneva I, Pecheur EI, Polyak S. *Curr Med Chem*, 2008, 15: 997–1005
- 12 Wang G, Luo M, Yang Z. Compounds useful as antiviral agents, composition, and methods of use. USA Patent, US20130090339A1, 2011
- 13 Heo YA. *Drugs*, 2018, 78: 693–697
- 14 Sheu TG, Fry AM, Garten RJ, Deyde VM, Shwe T, Bullion L, Peebles PJ, Li Y, Klimov AI, Gubareva LV. *J Infect Dis*, 2011, 203: 13–17
- 15 Hay AJ, Hayden FG. *Lancet*, 2013, 381: 2230–2232
- 16 Lambert LC, Fauci AS. *N Engl J Med*, 2010, 363: 2036–2044

- 17 Marsh M, Helenius A. *Cell*, 2006, 124: 729–740
- 18 Harrison SC. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 690–698
- 19 Vanderlinden E, Naesens L. *Med Res Rev*, 2014, 34: 301–339
- 20 Rumschlag-Booms E, Rong L. *Adv Virol*, 2013, 2013: 1–9
- 21 Rossmann MG, Rao VB. *Viral Molecular Machines*. Heidelberg, Berlin: Springer, 2012
- 22 Knossow M, Lewis M, Rees D, Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. *Acta Crystlogr B-Struct Sci*, 1986, 42: 627–632
- 23 Edinger TO, Pohl MO, Stertz S. *J Gen Virol*, 2014, 95: 263–277
- 24 Böttcher C, Ludwig K, Herrmann A, van Heel M, Stark H. *FEBS Lett*, 1999, 463: 255–259
- 25 de Vries E, Tscherné DM, Wienholts MJ, Cobos-Jiménez V, Scholte F, García-Sastre A, Rottier PJM, de Haan CAM. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1001329
- 26 Chen C, Zhuang X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 11790–11795
- 27 Conto FD, Lonardo ED, Arcangeletti MC, Chezzi C, Medici MC, Calderaro A. *PloS One*, 2012, 7: 286
- 28 Lakadamyali M, Rust MJ, Babcock HP, Zhuang X. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 9280–9285
- 29 Huotari J, Helenius A. *EMBO J*, 2011, 30: 3481–3500
- 30 Huotari J, Meyer-Schaller N, Hubner M, Stauffer S, Katheder N, Horvath P, Mancini R, Helenius A, Peter M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 823–828
- 31 Shen B. *Cell*, 2015, 163: 1297–1300
- 32 Bednarek P, Osbourn A. *Science*, 2009, 324: 746–748
- 33 Xiao S, Tian Z, Wang Y, Si L, Zhang L, Zhou D. *Med Res Rev*, 2018, 38: 951–976
- 34 Pompei R, Paghi L, Ingiani A, Uccheddu P. *Microbiologica*, 1983, 6: 247–250
- 35 Wolkerstorfer A, Kurz H, Bachhofner N, Szolar OHJ. *Antiviral Res*, 2009, 83: 171–178
- 36 Song W, Si L, Ji S, Wang H, Fang X, Yu L, Li R, Liang L, Zhou D, Ye M. *J Nat Prod*, 2014, 77: 1632–1643
- 37 Cichewicz RH, Kouzi SA. *Med Res Rev*, 2004, 24: 90–114
- 38 Li Y, Jiang R, Ooi LSM, But PPH, Ooi VEC. *Phytother Res*, 2007, 21: 466–470
- 39 Song G, Yang S, Zhang W, Cao Y, Wang P, Ding N, Zhang Z, Guo Y, Li Y. *J Med Chem*, 2009, 52: 7368–7371
- 40 Li S, Jia X, Shen X, Wei Z, Jiang Z, Liao Y, Guo Y, Zheng X, Zhong G, Song G. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25: 4384–4396
- 41 Song G, Shen X, Li S, Li Y, Liu Y, Zheng Y, Lin R, Fan J, Ye H, Liu S. *Eur J Med Chem*, 2015, 93: 431–442
- 42 Song G, Shen X, Li S, Li Y, Si H, Fan J, Li J, Gao E, Liu S. *Eur J Med Chem*, 2016, 119: 109–121
- 43 Yu M, Si L, Wang Y, Wu Y, Yu F, Jiao P, Shi Y, Wang H, Xiao S, Fu G, Tian K, Wang Y, Guo Z, Ye X, Zhang L, Zhou D. *J Med Chem*, 2014, 57: 10058–10071
- 44 Wang H, Xu R, Shi Y, Si L, Jiao P, Fan Z, Han X, Wu X, Zhou X, Yu F, Zhang Y, Zhang L, Zhang L, Zhou D, Xiao S. *Eur J Med Chem*, 2016, 110: 376–388
- 45 Han X, Shi Y, Si L, Fan Z, Wang H, Xu R, Jiao P, Meng K, Tian Z, Zhou X, Jin H, Wu X, Chen H, Zhang Y, Zhang L, Xiao S, Zhou D. *MedChemComm*, 2016, 7: 1932–1945
- 46 Waldmann M, Jirmann R, Hoelscher K, Wienke M, Niemeyer FC, Rehders D, Meyer B. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 783–788
- 47 Tian Z, Si L, Meng K, Zhou X, Zhang Y, Zhou D, Xiao S. *Eur J Med Chem*, 2017, 134: 133–139
- 48 Xiao S, Si L, Tian Z, Jiao P, Fan Z, Meng K, Zhou X, Wang H, Xu R, Han X, Fu G, Zhang Y, Zhang L, Zhou D. *Biomaterials*, 2016, 78: 74–85
- 49 Yang Y, He HJ, Chang H, Yu Y, Yang MB, He Y, Fan ZC, Iyer SS, Yu P. *Eur J Med Chem*, 2018, 143: 1723–1731
- 50 Robles-Almazan M, Pulido-Moran M, Moreno-Fernandez J, Ramirez-Tortosa C, Rodriguez-Garcia C, Quiles JL, Ramirez-Tortosa M. *Food Res Int*, 2018, 105: 654–667
- 51 Yamada K, Ogawa H, Hara A, Yoshida Y, Yonezawa Y, Karibe K, Nghia VB, Yoshimura H, Yamamoto Y, Yamada M, Nakamura K, Imai K. *Antiviral Res*, 2009, 83: 35–44
- 52 Yang J, Yang JX, Zhang F, Chen G, Pan W, Yu R, Wu S, Tien P. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 2680–2684
- 53 Yang J, Chen G, Li LL, Pan W, Zhang F, Yang J, Wu S, Tien P. *Bioorg Med Chem Lett*, 2013, 23: 2619–2623
- 54 Lu Y, Li J, Dong CE, Huang J, Zhou HB, Wang W. *Future Med Chem*, 2017, 9: 1243–1275
- 55 Zu M, Yang F, Zhou W, Liu A, Du G, Zheng L. *Antiviral Res*, 2012, 94: 217–224

- 56 Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39: 283–299
- 57 Chen DY, Shien JH, Tiley L, Chiou SS, Wang SY, Chang TJ, Lee YJ, Chan KW, Hsu WL. *Food Chem*, 2010, 119: 1346–1351
- 58 Zhu L, Ding X, Zhang D, Yuan C, Wang J, Ndegwa E, Zhu G. *Acta Virol*, 2015, 59: 221–227
- 59 Anggakusuma, Colpitts CC, Schang LM, Rachmawati H, Frentzen A, Pfaender S, Behrendt P, Brown RJP, Bankwitz D, Steinmann J, Ott M, Meuleman P, Rice CM, Ploss A, Pietschmann T, Steinmann E. *Gut*, 2014, 63: 1137–1149
- 60 Mounce BC, Cesaro T, Carrau L, Vallet T, Vignuzzi M. *Antiviral Res*, 2017, 142: 148–157
- 61 Yang M, Lee G, Si J, Lee SJ, You HJ, Ko G. *Molecules*, 2016, 21, pii: E1401
- 62 Chen TY, Chen DY, Wen HW, Ou JL, Chiou SS, Chen JM, Wong ML, Hsu WL. *PLoS ONE*, 2013, 8: e62482
- 63 Maalik A, Khan F, Mumtaz A, Mehmood A, Azhar S, Atif M, Karim S, Altaf Y, Tariq I. *Trop J Pharm Res*, 2014, 13: 1561
- 64 Wu W, Li R, Li X, He J, Jiang S, Liu S, Yang J. *Viruses*, 2016, 8: 6
- 65 Colpitts CC, Schang LM. *J Virol*, 2014, 88: 7806–7817
- 66 Dang Z, Jung K, Zhu L, Xie H, Lee KH, Chen CH, Huang L. *ACS Med Chem Lett*, 2015, 6: 355–358
- 67 Liao Q, Qian Z, Liu R, An L, Chen X. *Antiviral Res*, 2013, 100: 578–588
- 68 Sacramento CQ, Martorelli A, Fintelman-Rodrigues N, de Freitas CS, de Melo GR, Rocha MEN, Kaiser CR, Rodrigues KF, da Costa GL, Alves CM, Santos-Filho O, Barbosa JP, Souza TML. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0139236
- 69 Niu S, Si L, Liu D, Zhou A, Zhang Z, Shao Z, Wang S, Zhang L, Zhou D, Lin W. *Eur J Med Chem*, 2016, 108: 229–244
- 70 Chen X, Si L, Liu D, Proksch P, Zhang L, Zhou D, Lin W. *Eur J Med Chem*, 2015, 93: 182–195
- 71 Vanderlinden E, Vanstreels E, Boons E, ter Veer W, Huckriede A, Daelemans D, Van Lommel A, Röth E, Sztaricskai F, Herczegh P, Naesens L. *J Virol*, 2012, 86: 9416–9431
- 72 Sipos A, Máté G, Röth E, Borbás A, Batta G, Bereczki I, Kéki S, Jóna I, Ostorházi E, Rozgonyi F, Vanderlinden E, Naesens L, Herczegh P. *Eur J Med Chem*, 2012, 58: 361–367
- 73 Pintér G, Bereczki I, Batta G, Otvös R, Sztaricskai F, Roth E, Ostorházi E, Rozgonyi F, Naesens L, Szarvas M, Boda Z, Herczegh P. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 2713–2717
- 74 Bereczki I, Kicsák M, Dobray L, Borbás A, Batta G, Kéki S, Nikodém ÉN, Ostorházi E, Rozgonyi F, Vanderlinden E, Naesens L, Herczegh P. *Bioorg Med Chem Lett*, 2014, 24: 3251–3254
- 75 Liu S, Lu H, Niu J, Xu Y, Wu S, Jiang S. *J Biol Chem*, 2005, 280: 11259–11273
- 76 Chen Q, Guo Y. *ACS Infect Dis*, 2016, 2: 187–193
- 77 Ahmed CM, Dabelic R, Waiboci LW, Jager LD, Heron LL, Johnson HM. *J Virol*, 2009, 83: 1402–1415
- 78 Nicol MQ, Ligertwood Y, Bacon MN, Dutia BM, Nash AA. *J Gen Virol*, 2012, 93: 980–986
- 79 Jones JC, Turpin EA, Bultmann H, Brandt CR, Schultz-Cherry S. *J Virol*, 2006, 80: 11960–11967
- 80 Jones JC, Settles EW, Brandt CR, Schultz-Cherry S. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 1810–1813
- 81 Wu W, Lin D, Shen X, Li F, Fang Y, Li K, Xun T, Yang G, Yang J, Liu S, He J. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0138426
- 82 Zhang B, Xu H, Chen J, Zheng Y, Wu Y, Si L, Wu L, Zhang C, Xia G, Zhang L, Zhou D. *Acta Biomater*, 2015, 19: 100–111
- 83 Si Y, Li J, Niu Y, Liu X, Ren L, Guo L, Cheng M, Zhou H, Wang J, Jin Q, Yang W. *PLoS ONE*, 2014, 9: e107235
- 84 Fleishman SJ, Whitehead TA, Ekiert DC, Dreyfus C, Corn JE, Strauch EM, Wilson IA, Baker D. *Science*, 2011, 332: 816–821
- 85 Kadam RU, Juraszek J, Brandenburg B, Buyck C, Schepens WBG, Kesteley B, Stoops B, Vreeken RJ, Vermond J, Goutier W, Tang C, Vogels R, Friesen RHE, Goudsmit J, van Dongen MJP, Wilson IA. *Science*, 2017, 358: 496–502
- 86 Wu W, Wang J, Lin D, Chen L, Xie X, Shen X, Yang Q, Wu Q, Yang J, He J, Liu S. *Biochim Biophys Acta-Biomembranes*, 2015, 1848: 2344–2350
- 87 Krepstakies M, Lucifora J, Nagel CH, Zeisel MB, Holstermann B, Hohenberg H, Kowalski I, Gutschmann T, Baumert TF, Brandenburg K, Hauber J, Protzer U. *J Infect Dis*, 2012, 205: 1654–1664
- 88 Hoffmann J, Schneider C, Heinbockel L, Brandenburg K, Reimer R, Gabriel G. *Antiviral Res*, 2014, 104: 23–33
- 89 Wright ZVF, Wu NC, Kadam RU, Wilson IA, Wolan DW. *Bioorg Med Chem Lett*, 2017, 27: 3744–3748
- 90 Bhatia S, Lauster D, Bardua M, Ludwig K, Angioletti-Uberti S, Popp N, Hoffmann U, Paulus F, Budt M, Stadtmüller M, Wolff T, Hamann A, Böttcher C, Herrmann A, Haag R. *Biomaterials*, 2017, 138: 22–34
- 91 Yang Y, Liu HP, Yu Q, Yang MB, Wang DM, Jia TW, He HJ, He Y, Xiao HX, Iyer SS, Fan ZC, Meng X, Yu P. *Carbohydr Res*, 2016, 435: 68–

75

- 92 Nazemi A, Haeryfar SMM, Gillies ER. *Langmuir*, 2013, 29: 6420–6428
- 93 Plotch SJ, O'Hara B, Morin J, Palant O, LaRocque J, Bloom JD, Lang SA, Jr, DiGrandi MJ, Bradley M, Nilakantan R, Gluzman Y. *J Virol*, 1999, 73: 140–151
- 94 Liu S, Li R, Zhang R, Chan CCS, Xi B, Zhu Z, Yang J, Poon VKM, Zhou J, Chen M, Münch J, Kirchhoff F, Pleschka S, Haarmann T, Dietrich U, Pan C, Du L, Jiang S, Zheng B. *Eur J Pharmacol*, 2011, 660: 460–467
- 95 Zhu Z, Yao Z, Shen X, Chen Z, Liu X, Parquette JR, Liu S. *Eur J Med Chem*, 2017, 130: 185–194
- 96 Luo G, Colonno R, Krystal M. *Virology*, 1996, 226: 66–76
- 97 Yu KL, Ruediger E, Luo G, Cianci C, Danetz S, Tiley L, Trehan AK, Monkovic I, Pearce B, Martel A, Krystal M, Meanwell NA. *Bioorg Med Chem Lett*, 1999, 9: 2177–2180
- 98 Deshpande MS, Wei J, Luo G, Cianci C, Danetz S, Torri A, Tiley L, Krystal M, Yu KL, Huang S, Gao Q, Meanwell NA. *Bioorg Med Chem Lett*, 2001, 11: 2393–2396
- 99 Tang G, Lin X, Qiu Z, Li W, Zhu L, Wang L, Li S, Li H, Lin W, Yang M, Guo T, Chen L, Lee D, Wu JZ, Yang W. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 603–607
- 100 White KM, De Jesus P, Chen Z, Abreu Jr. P, Barile E, Mak PA, Anderson P, Nguyen QT, Inoue A, Stertz S, Koenig R, Pellicchia M, Palese P, Kuhen K, Garcia-Sastre A, Chanda SK, Shaw ML. *ACS Infect Dis*, 2015, 1: 98–109
- 101 Basu A, Antanasijevic A, Wang M, Li B, Mills DM, Ames JA, Nash PJ, Williams JD, Peet NP, Moir DT, Prichard MN, Keith KA, Barnard DL, Caffrey M, Rong L, Bowlin TL. *J Virol*, 2014, 88: 1447–1460
- 102 Tang G, Qiu Z, Lin X, Li W, Zhu L, Li S, Li H, Wang L, Chen L, Wu JZ, Yang W. *Bioorg Med Chem Lett*, 2010, 20: 3507–3510
- 103 Scholtissek C, Quack G, Klenk HD, Webster RG. *Antiviral Res*, 1998, 37: 83–95
- 104 Garcia Martinez A, Teso Vilar E, Garcia Fraile A, de la Cerero S, Rodriguez Herrero ME, Martinez Ruiz P, Subramanian LR, Garcia Gancedo A. *J Med Chem*, 1995, 38: 4474–4477
- 105 Wang J, Ma C, Balannik V, Pinto LH, Lamb RA, Degrado WF. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2: 307–312
- 106 Zarubaev VV, Garshina AV, Tretiak TS, Fedorova VA, Shtro AA, Sokolova AS, Yarovaya OI, Salakhutdinov NF. *Antiviral Res*, 2015, 120: 126–133
- 107 Vanderlinden E, Göktas F, Cesur Z, Froeyen M, Reed ML, Russell CJ, Cesur N, Naesens L. *J Virology*, 2010, 84: 4277–4288
- 108 Rowse M, Qiu S, Tsao J, Xian T, Khawaja S, Yamauchi Y, Yang Z, Wang G, Luo M. *PLoS ONE*, 2015, 10: e0122536
- 109 Russell RJ, Kerry PS, Stevens DJ, Steinhauer DA, Martin SR, Gamblin SJ, Skehel JJ. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 17736–17741
- 110 Root CN, Wills EG, McNair LSL, Whittaker GR. *J Gen Virol*, 2000, 112: 2697–2705

Recent progress of novel anti-influenza entry inhibitors

Man Li, Haiwei Li, Shuobin Liang, Zhenyu Tian, Demin Zhou, Sulong Xiao^{*}

State Key Laboratory of Natural and Biomimetic Drugs, School of Pharmaceutical Sciences, Peking University, Beijing 100191, China

**Corresponding author (email: slxiao@bjmu.edu.cn)*

Abstract: Currently, two classes of drugs used against influenza virus are M2 protein ion channel inhibitors and neuraminidase inhibitors. With the outbreaks of pandemic influenza, seasonal influenza and highly pathogenic avian influenza and the rapid emergence of drug-resistant influenza strains, it is urgent for the discovery of new anti-influenza drugs. Recently, the studies on molecular mechanism that influenza virus entries into cells bring opportunities for developing new anti-influenza entry inhibitors. In this paper, the anti-influenza entry inhibitors, their mechanism of action as well as the entry process of influenza virus were reviewed.

Keywords: influenza virus, entry inhibitors, hemagglutinin, membrane fusion

doi: [10.1360/N032018-00100](https://doi.org/10.1360/N032018-00100)