

抗新型冠状病毒潜在药物法匹拉韦研究进展

曹联攻^{1,2,3,4}, 邵仲柏⁴, 蒋凯俊⁴, 王有宪⁴, 刘书豪⁴, 刘玮炜^{1,2,3,4*} (1.江苏海洋生物资源与环境重点实验室, 江苏连云港 222005; 2.江苏海洋大学, 江苏省海洋药物活性分子筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3.江苏省海洋生物产业技术协同创新中心, 江苏连云港 222005; 4.江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005)

摘要: 2019 年新型冠状病毒肺炎疫情暴发, 病毒感染威胁极大, 法匹拉韦是作用机制新颖的广谱抗病毒药物, 作为抗新型冠状病毒感染的潜在药物, 目前正在开展相关临床试验。本文综述了法匹拉韦的结构、作用机制、药动学、抗病毒活性以及合成方法研究进展, 希望能为抗病毒治疗提供参考。

关键词: 法匹拉韦; 机制; 抗病毒活性; 合成

中图分类号: R961 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2020)07-0769-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.07.001

引用本文: 曹联攻, 邵仲柏, 蒋凯俊, 等. 抗新型冠状病毒潜在药物法匹拉韦研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(7): 769-776.

Progress of Favipiravir: The Potential Anti SARS-CoV-2 Drug

CAO Liangong^{1,2,3,4}, SHAO Zhongbai⁴, JIANG Kaijun⁴, WANG Youxian⁴, LIU Shuhao⁴, LIU Weiwei^{1,2,3,4*} (1.Jiangsu Key Laboratory of Marine Bioresources and Environment, Lianyungang 222005, China; 2.Jiangsu Key Laboratory of Marine Pharmaceutical Compound Screening, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 3.Co-innovation Center of Jiangsu Marine Bio-industry Technology, Lianyungang 222005, China; 4.School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China)

ABSTRACT: The outbreak of COVID-19 poses a great threat to human. Favipiravir is a broad-spectrum antiviral drug with a novel mechanism. As a potential drug against SARS-CoV-2, favipiravir is currently conducting clinical trials. This article reviews the structure, mechanism, pharmacokinetics, antiviral activity and synthetic methods of favipiravir, in order to provide a reference for antiviral therapy.

KEYWORDS: favipiravir; mechanism; antiviral activity; synthesis

新型冠状病毒肺炎(COVID-19)于 2019 年底开始暴发, 截至 2020 年 3 月 26 日全世界确诊病例已达 462 684 例^[1]。COVID-19 诊疗方案推荐现有经批准治疗感染艾滋病病毒、乙肝病毒和流感等疾病的抗病毒药物作为治疗方法之一^[2], 但目前仍然缺乏广谱抗病毒药物^[3]。针对新型冠状病毒(SARS-CoV-2), 研究者对现有化合物数据库进行筛选, 基于 SARS-CoV-2 基因组开发新的特异性药物以及对现有的广谱抗病毒药物的使用进行分析^[4], 以期能找出有效抗击疫情的广谱抗病毒药物。

法匹拉韦(favipiravir)是作用机制新颖的广谱抗病毒药物, 于 2014 年 3 月在日本批准上市, 并在 2020 年 2 月于中国获批上市, 用于治疗新型和

复发型流行性感冒。法匹拉韦用于治疗埃博拉病毒感染患者的临床试验数据显示出良性结果^[5]。另外, 法匹拉韦在体外具有广泛的抗 RNA 病毒活性, 还可以抑制其他多种病毒的转录, 如沙粒病毒^[6]、黄热病毒^[7]、狂犬病毒^[8]等。法匹拉韦在抗病毒治疗中很少有耐药病毒产生^[9]。本文对法匹拉韦基本信息、作用机制、药动学、抗病毒活性以及合成方法等方面进行概述, 希望能为抗病毒治疗用药提供参考。

1 法匹拉韦基本信息

法匹拉韦商品名: Avigan; 别名: T-705; CAS 登记号: 259793-96-9; 化学名称: 6-氟-3-羟基-2-吡嗪甲酰胺(6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-

基金项目: 江苏省高校优势学科建设工程资助项目(PAPD); 江苏省研究生科研与实践创新计划项目(KYCX19-2277, KYCX19-2281); 连云港市“521 工程”资助项目(LYG52105-2018023)

作者简介: 曹联攻, 男, 硕士生 Tel: 18360572259 E-mail: 1141596698@qq.com *通信作者: 刘玮炜, 女, 博士, 教授 Tel: 13705133357 E-mail: liuweimei323@163.com

carboxamide); 开发企业: 日本富山化工制药公司。结构式见图 1。

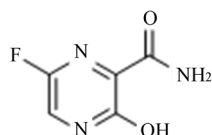


图 1 法匹拉韦的结构式

Fig. 1 Structure of favipiravir

2 作用机制

核苷类似物具有多种作用机制, 包括诱导突变、特定或非特定链终止和核苷酸生物合成的抑制作用等。法匹拉韦是核苷类似物的代表性药物之一。

法匹拉韦(1)是一种新型的病毒 RNA 聚合酶抑制剂^[10], 作为一种前药在进入体内后在一系列催化作用下, 生成其核苷类似物三磷酸(T-705 RTP)的形式, 从而干扰病毒的复制和转录^[11], 见图 2。



图 2 法匹拉韦转化为活性物质 T-705 RTP

Fig. 2 Conversion from favipiravir to active substance T-705 RTP

法匹拉韦作用原理主要有 2 种:

①法匹拉韦在细胞内一系列酶的作用下形成法匹拉韦-呋喃核糖基-5-三磷酸(T-705 RTP), 这种形式的药物被病毒 RNA 聚合酶识别, 作为鸟嘌呤或腺嘌呤衍生物形式的核苷类似物在病毒基因组复制周期的早期到中期通过对鸟苷三磷酸(GTP)或腺苷三磷酸(ATP)的竞争性抑制, 作为嘌呤合并到一个新生的病毒 RNA 中, 在 RNA 合成过程中导致链终止。通过这种机制可阻断多种 RNA 病毒的合成^[12]。

②T-705 RTP 也可以进入到病毒基因组, 插入到病毒 RNA 链, 诱发病毒的致命性突变, 发挥抗病毒作用^[13]。Goldhill 等^[14]使用高通量测序发现法匹拉韦是一种倾向于转变的诱变剂, 可与鸟嘌呤(主)和腺嘌呤(次)竞争, 进入到 RNA 基因组中, 导致过度突变的积累。Abdelnabi 等^[15]证明在单链核糖核酸(ssRNA)病毒的 RNA 依赖性 RNA 聚合酶(RdRp)F1 基序中的赖氨酸在法匹拉韦用药下发生突变, 它是酶正常功能的关键氨基酸, 并且很可能是法匹拉韦与其他 ssRNA 病毒的 RdRp 相互作

用的关键因素。由于 RdRp 的催化结构域在各种 RNA 病毒中的高保真性, 这种作用机制使法匹拉韦可能有更广泛的抗病毒活性。

T-705 RTP 对病毒 RNA 聚合酶活性具有剂量依赖性^[13], 见图 3。研究发现法匹拉韦在体外或体内对多种 RNA 病毒有良好的抑制活性, 独特的抗病毒特性将使法匹拉韦成为一种潜在的有前景的治疗 RNA 病毒感染的药物^[16]。

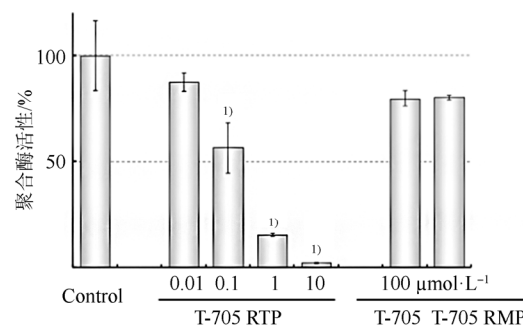


图 3 随着 T-705 RTP 增加病毒聚合酶活性降低与对照组比较, ¹⁾P<0.05。

Fig. 3 As T-705 RTP increased, the activity of virus polymerase decreased Compared with control group, ¹⁾P<0.05.

3 药动学

3.1 吸收

法匹拉韦可以通过口服给药, 如对雄性大鼠单次口服 ¹⁴C 标记的 20 mg·kg⁻¹ 法匹拉韦后 0.5~1 h 达最大血药浓度, 所有组织中的放射性水平也均达到最大值^[17]。除此之外, 也可以进行静脉注射给药: 雌鼠单次口服或单次静脉注射 8 mg·kg⁻¹ 的法匹拉韦, 生物利用度可达 97.6%。人体试验未发现明显性别差异^[17]。

3.2 分布

法匹拉韦与人血清蛋白结合率为 53.4%~54.4%^[17-18], 表观分布体积范围为 15~20 L^[19]。法匹拉韦给药流感病毒感染的雌性小鼠^[17], 剂量 20 mg·kg⁻¹, 在给药 4 h 后肺中法匹拉韦有效转化为 T-705 RTP, T-705 RTP 在肺中的半衰期(*t*_{1/2})为 4.21 h。用 ¹⁴C 标记的法匹拉韦给药大鼠和猴子^[17], 剂量 20 mg·kg⁻¹, 给药后 8 h, 细胞内分布率为 16.30%~24.99%, 给药后 24 h, 细胞内分布率为 36.30%~73.26%, 随时间的推移呈上升趋势。

对埃博拉病毒感染小鼠口服给药法匹拉韦^[20], 剂量 150 mg·kg⁻¹, 每日 2 次, 共 14 d。平均药物有效性在治疗开始后第 1, 2, 3, 6 天分别为 50%,

95%, 98.5%, 99.6%。在仓鼠感染沙粒病毒 7 d 后使用法匹拉韦治疗^[21], 发现法匹拉韦可以分布到血浆、大脑、肾脏、肺、脾脏各个组织器官。

3.3 代谢

大鼠口服给药 ^{14}C 标记的法匹拉韦, 剂量为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 以研究其主要代谢产物^[17]。给药后 0.5, 4, 8 h, 在肺、肝、肾、睾丸中检出 M1(10.75%~34.44%)。给药后 24 h 尿、粪和胆汁中检测到 M1(尿 43.03%, 粪 42.81%, 胆汁 51.99%和 55.04%), 尿中还检测到 M2(22.76%)。M1 和 M2 是法匹拉韦主要失活的代谢产物。见图 4。

在肝细胞浆样本中取样研究法匹拉韦至 M1 的代谢与醛氧化酶(aldehyde oxidase, AO)和黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)活性的关系^[17]。发现 M1 生成与 AO 活性相关系数为 0.675。法匹拉韦主要通过 AO 代谢为 M1(0~8 h, 95.35%; 8~24 h, 75.13%)。数据表明法匹拉韦通过醛氧化酶(主)和黄嘌呤氧化酶(次)代谢为 M1。其次法匹拉韦也可以通过结合葡萄糖苷酸残基转化为 M2, 见图 4。

另外, 法匹拉韦可以在一系列细胞内酶催化下通过核苷单磷酸化、二磷酸化以及三磷酸化分别生成 T-705 RMP、T-705 RDP、T-705 RTP^[17]; T-705 RMP 也可以脱磷酸化生成 T-705 R。T-705 RTP 是法匹拉韦的活性代谢产物, 其形成具有以浓度和时间依赖的特性。法匹拉韦去除后 T-705 RTP 的半衰期 $t_{1/2}$ 为 2.05 h。

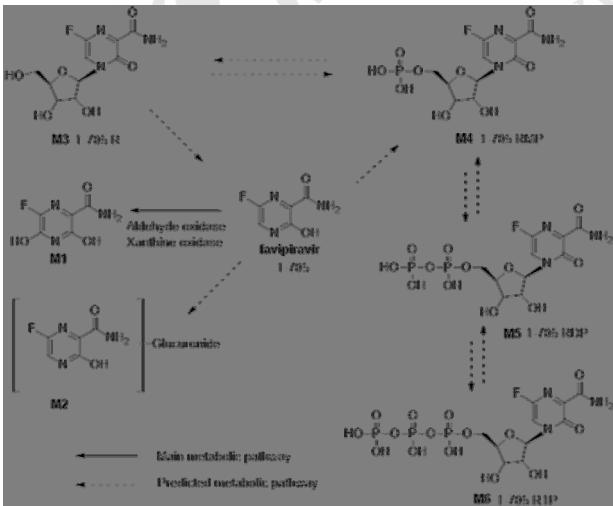


图 4 法匹拉韦代谢途径

R-核糖基; RMP-核糖单磷酸; RDP-核糖二磷酸; RTP-核糖三磷酸。

Fig. 4 Metabolic pathway of favipiravir

R-ribosyl; RMP-ribosyl monophosphate; RDP-ribosyl diphosphate; RTP-ribosyl triphosphate.

3.4 排泄

^{14}C 标记的法匹拉韦给药雄猴, 剂量 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 在 24 h 内尿液和粪便的累积排泄量占所给剂量的放射性同位素的 91.14%和 4.32%。相同剂量给药雄性大鼠(胆管插管), 48 h 内胆汁、尿液和粪便的累积放射性排泄率分别为 16.17%, 59.88%和 3.83%。研究表明^[17]法匹拉韦的排泄主要经尿排出, 少部分经胆汁排泄。

4 抗病毒活性

4.1 体外抗病毒活性

法匹拉韦具有广谱抗病毒活性, 对多种病毒均显示抑制作用^[7, 22-26], 见表 1。

表 1 对多种病毒的体外抗病毒活性测试

Tab. 1 Antiviral activity test for a variety of viruses *in vitro*

病毒名称	半最大效应浓度 $EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	半抑制浓度 $IC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
甲型流感 H1N1	0.19~0.53	—
甲型流感 H3N2	0.45~5.99	—
B 型流感病毒	0.57~5.30	—
黄热病	330	—
西尼罗病毒	318	—
新布尼亚病毒	—	6
诺如病毒	124±42	—
瓜纳瑞托病毒	15	—
鸫宁病毒	12	—
马秋波病毒	14	—

4.2 体内抗病毒活性

4.2.1 流感病毒 法匹拉韦和奥司他韦治疗 H3N2 感染的小鼠药效对比^[27], 使用 $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的奥司他韦生存率可达到 60%, 用量 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时无效; 法匹拉韦在 $50\sim 100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时为 >70% 存活率, 但在 $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时无保护作用; 当联合使用时($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)可将小鼠存活率提高到 90%。法匹拉韦在 H5N1 病毒感染前 2 h 开始治疗可观察到对 H5N1 感染的抗病毒活性增强^[27]。法匹拉韦在用量 $40, 80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时具有 100% 的存活率, 在 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 时不起作用。

Kiso 等^[28]发现法匹拉韦可以有效地保护小鼠不受对奥司他韦敏感或高耐药性 H5N1 病毒感染, 因此, T-705 可用于治疗感染奥司他韦耐药高致病性 H5N1 流感病毒的患者。

小鼠感染野生型或对奥司他韦耐药的 B 型流感病毒后^[29], 用法匹拉韦分别以 50, 150, $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量口服给药小鼠, 以奥司他韦

为对照。表型分析显示 T-705 耐药病毒在 T-705 处理后没有出现, T-705 可以有效地保护小鼠免受野生型和耐奥司他韦 B 型流感病毒感染。

4.2.2 埃博拉病毒 法匹拉韦对埃博拉病毒^[30]感染小鼠, 每天给药 1 次, 50% 生存率时的有效保护剂量为 $1.6 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 。

Oestereich 等^[31]在埃博拉病毒感染的小鼠体内实验, 给药法匹拉韦可使病毒迅速清除, 存活率达 100%。它能够减少口服给药后的埃博拉病毒血症。研究结果表明, T-705 是治疗埃博拉出血热的候选药物。

JIKI 试验^[5]是一项历史对照、多组织、单臂临床试验, 法匹拉韦在患者中显示出良好的耐受性, 但没有显示出很强的抗病毒作用。单药治疗对高病毒血症患者不太明显, 对中至高病毒血症患者值得进行进一步研究。

Guedj 等^[32]在毛里求斯猕猴感染前 2 d 开始治疗时, 以浓度依赖的方式静脉注射法匹拉韦病毒血症降低, 诱变增加, 病毒传染性降低。分别在 150 和 $180 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量下观察到 40% 和 60% 的存活率。

4.2.3 其他病毒 关于法匹拉韦对沙粒病毒、黄热病毒、狂犬病毒、布尼亚病毒等的试验也在持续展开。

Rosenke 等^[6]在拉沙病毒感染猕猴体内测试了法匹拉韦, 剂量 $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续 2 周成功治疗了感染。

Julander 等^[7]使用法匹拉韦在细胞培养和仓鼠模型中对抑制黄热病毒活性进行了测试, 发现细胞培养在 $330 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 产生抗病毒效果, 受感染仓鼠的存活率和疾病参数均有显著改善。

Smreczak 等^[8]对感染银毛蝙蝠狂犬病病毒-18 (SHBRV-18) 的小鼠通过使用法匹拉韦(每只 6 mg)联合其他治疗方式, 发现治疗组小鼠生存期明显延长。Yamada 等^[33]对感染狂犬病毒的小鼠从接种后 1 h ($300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 或 2 d (600 或 $900 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 开始给药法匹拉韦, 生物荧光成像显示, 法匹拉韦可有效抑制病毒在接种部位的复制以及随后在中枢神经系统中的复制。此外, 生存分析显示, 即刻给药可显著延长生存时间, 但生存率并没有提高。较高剂量可改善延迟治疗的感染小鼠的抗病毒作用。

Tani 等^[24]比较法匹拉韦和利巴韦林对缺乏 I

型干扰素受体 (IFNAR) 的小鼠被布尼亚病毒 (SFTSV) 感染后的治疗效果, 发现法匹拉韦在生存率和疾病进展(包括体质量减轻)方面比利巴韦林更有效, 可显著提高存活率(100% 存活率)。法匹拉韦呈现出明显的抗病毒作用, 且未影响细胞活性。

4.3 SARS-CoV-2

SARS-CoV-2 是 RNA 病毒, 其基因组序列的研究显示, 与非典(SARS-CoV)具有很强的同源性^[34]。基于这一理论基础, 多种药物被用于尝试治疗 COVID-19。

法匹拉韦是被批准用于治疗流感病毒的药物, 流感病毒与 SARS-CoV-2 同属于 RNA 病毒。就作用机制看来, 法匹拉韦对各种 RNA 病毒均有潜在抗病毒活性。因此, 法匹拉韦作为广谱抗病毒药物, 在阻断 RNA 合成方面, 法匹拉韦可能对流感病毒、埃博拉病毒、SARS-CoV-2 都有效。

最近的 1 项研究显示, 法匹拉韦对 COVID-19 测得半最大效应浓度(EC_{50})为 $61.88 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[35], 见图 5。

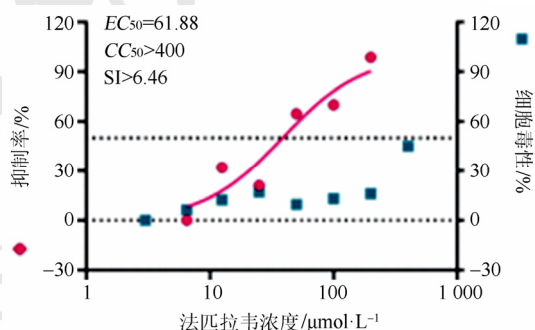


图 5 法匹拉韦对 COVID-19 的抑制效果曲线

Fig. 5 Curve of inhibitory effect of favipiravir on COVID-19

日前, 在深圳进行了 80 例感染 SARS-CoV-2 患者对照试验, 给药法匹拉韦, 数据显示出不错的效果, 未发现明显不良反应, 不良反应率也较低。在治疗后第 3~4 天, 用药组的病毒核酸转阴率显著高于对照组。专家建议再进一步扩大试验, 考察患者的治疗效果。另外, 评估法匹拉韦+干扰素 α (ChiCTR2000029600) 和法匹拉韦+巴洛沙韦 (ChiCTR2000029544) 疗效的 2 项治疗 COVID-19 患者随机试验正在积极招募之中。

5 合成方法

5.1 以氨基丙二酸二乙酯盐酸盐为起始原料^[36-37]

此法^[36]以氨基丙二酸二乙酯(2)为起始原料, 经成环、硝化、氯代、氟代等步骤最后合成目标

化合物法匹拉韦, 见图 6。该法对比王欢等^[37]的合成路线做了一些改进, 不用液溴做溴代反应, 可避免液溴的毒性带来的生产危险和环境污染; 而且工艺路线也得到缩短; 所用原料价廉易得, 试剂也较为常见, 操作流程较为简便, 适合工业放大生产。

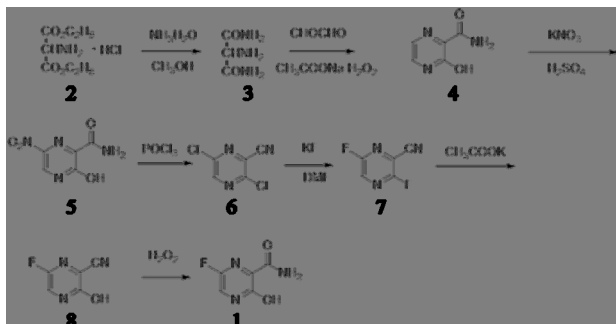


图 6 合成路径 1

Fig. 6 Synthetic path 1

5.2 以 3-氨基-2-羧基吡嗪为起始原料

5.2.1 路线① 该路线^[38]以 3-氨基吡嗪-2-羧酸(9)为原料(path 1)经羟基化取代、酯化反应、酯的氨解反应、硝化、还原以及重氮化氟原子取代反应, 见图 7。该工艺路线较短, 生产操作也较简单, 反应较温和, 各步反应收率较合理。缺点是使用贵重金属钯的还原反应不仅会增加成本, 而且反应步骤离目标产物较近, 不易控制重金属残留; 涉及具有危险性的重氮化反应以及硝化反应, 另外 H_2 的使用也使工业化生产中存在更大安全隐患。

Shi 等^[39]针对上述路线做了一些改进, 以 3-羟基吡嗪-2-羧酸(10)直接合成 3-羟基吡嗪-2-甲酰胺(4) (path 2), 见图 7。该路线工艺流程减少; 对于 Pd/C 还原步骤, 采用雷尼镍进行催化, 收率更高, 副产物较少, 而且纯化更容易。总的来说, 更有效、更经济。

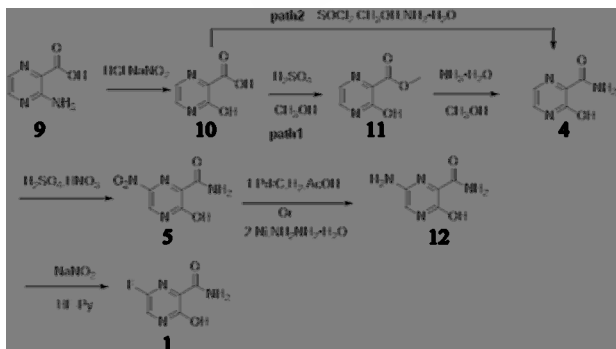


图 7 合成路径 2

Fig. 7 Synthetic path 2

5.2.2 路线② 该路线^[40-43]以 3-氨基吡嗪-2-羧酸(9)为原料合成目标产物, 最佳工艺路线可大致分为 6 步反应, 见图 8。首先经酯化、溴代、重氮化羟基取代氨基、酯的氨解、氯代等五步步骤合成重要中间体 3,6-二氯-2-氰基吡嗪(6), 而后经一锅法生成目标化合物法匹拉韦。合成过程中采用重结晶法提纯, 避免了柱层析分离提纯; 最后 3 步反应采用一锅法实现了一步法高产, 不但使操作更简单方便, 而且有效降低成本, 并提高效率。总之, 经不断改进后的合成路线高效、经济, 收率较合理。

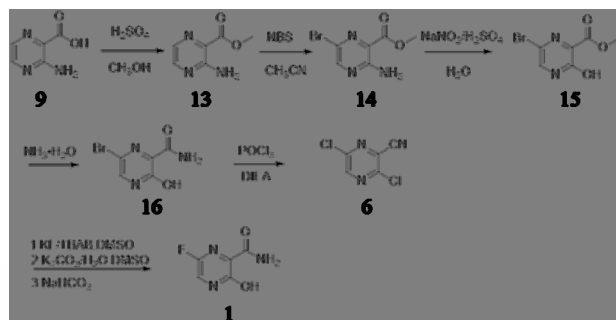


图 8 合成路径 3

Fig. 8 Synthetic path 3

5.3 以 2-氨基吡嗪为起始原料

该方法^[44]是以 2-氨基吡嗪(17)这种廉价的商用原料为起始原料, 见图 9。工艺路线共包括 7 个步骤, 以合成中间体 3,6-二氯-2-氰基吡嗪(6)为重点。该中间体由氯化反应、溴化反应、钯催化的氰化反应和桑德迈耶反应 4 个连续步骤合成。该方法避免了以前中间体合成方法中有害的物质三氯氧磷($POCl_3$)的使用, 对于中间体的合成新颖且高效, 并拥有较高的产率。后续经由 3 步反应: 亲核反应、腈水合反应和羟基取代反应迅速地生成了目标产物法匹拉韦, 高效、经济, 适用于工业大批量生产。

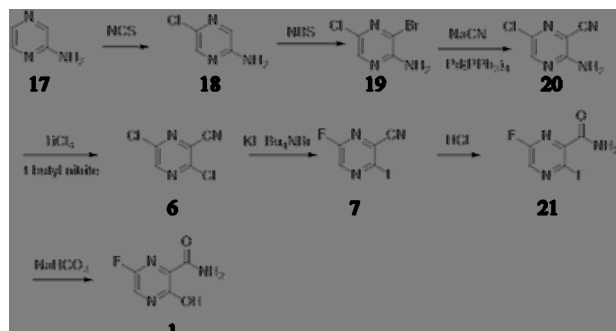


图 9 合成路径 4

Fig. 9 Synthetic path 4

5.4 以 3-羟基吡嗪-2-甲酰胺为起始原料

该合成路线(path 1)^[45-48]以 3-羟基吡嗪-2-甲酰胺(4)作为起始原料, 经过硝化、氯代和氟代等一系列反应得到最终产物, 见图 10。原料 3-羟基吡嗪-2-甲酰胺可以在市场上方便购买得到。但所用试剂有危险性、反应不够温和、后处理不便以及产率偏低等问题仍存在, 需要作出改进以便克服上述问题。

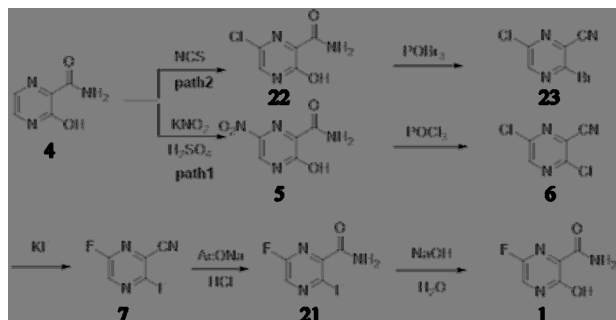


图 10 合成路径 5

Fig. 10 Synthetic path 5

CN107641106A 文献针对上述路线^[49]做出相应改进(path 2), 经选择性氯代、溴代和氟代等反应得到目标产物, 见图 10。原料如三溴氧磷, 价格低, 市场易得; 反应条件较温和, 产率较高并且后处理简便, 仅需要常规处理即可用于下一步。该路线主要改进在于 NCS+POCl₃ 的组合, POCl₃ 可产生高产率的溴代, 使用 Br 来代替 Cl, 以避免双氯原子的敏感性问题, 并且所生成化合物(23)活性更高, 进而使氟代反应生成 3,6-二氟-2-氨基吡嗪(7)更容易进行, 减少副产物的生成, 不仅后处理过程得到一定程度简化, 而且产率有所提高, 可用于工业放大生产。

5.5 以 3-氨基-6-溴吡嗪-2-甲酸为起始原料

该路线^[50]以 3-氨基-6-溴吡嗪-2-甲酸(24)为起始原料, 经酯化反应、重氮化反应、上苄基保护基取代反应、氟代反应、还原以及氨解 6 步反应生成终产物, 见图 11。反应工艺路线较短; 各步反应收率较高(均>80%), 总收率较高; 产品纯度较高, 所含杂质较少; 工艺操作简便, 反应条件温和, 总生产成本较低, 适合工业化生产。

5.6 以吡嗪-2-取代物为起始原料

该路线^[51-52]起始原料-R 基团通常为氰基或者酰胺, 工艺路线共 5 步反应, 见图 12。以生成中间体 3,6-二氯-2-氰基吡嗪为重点, 该路线以 2-氰基吡嗪(28)或者吡嗪-2-甲酰胺(29)作为起始原料,

首先经有机酸+氧化剂反应生成吡嗪二氮氧化物, 然后生成重要中间体 3,6-二氯-2-氰基吡嗪(6), 之后氟代、酰化、羟基化 3 步反应生成目标产物。所用原料简单易得, 价格低廉; 合成工艺路线简单, 步骤少; 反应条件温和; 绿色环保; 具有很好的工业化价值。

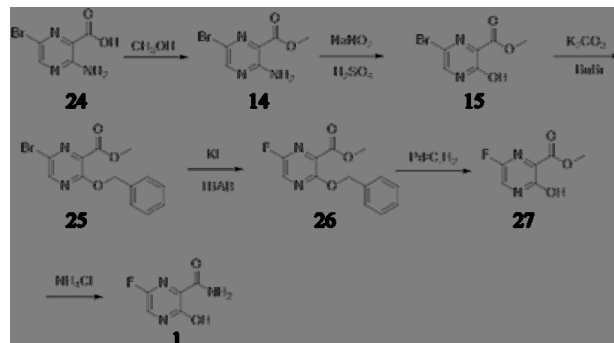


图 11 合成路径 6

Fig. 11 Synthetic path 6

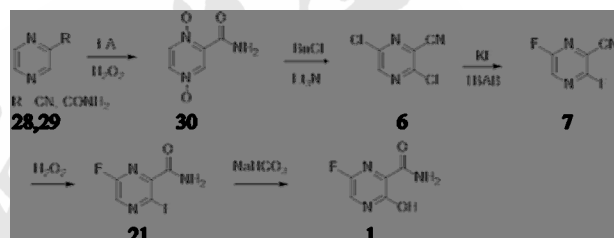


图 12 合成路径 7

Fig. 12 Synthetic path 7

5.7 以 3-氨基-6-溴吡嗪-2-甲酰胺为起始原料

该路线^[53]以 3-氨基-6-溴吡嗪-2-甲酰胺(31)为起始原料, 首先用 Boc 酸酐在氢化钠存在条件下上 Boc 保护基, 然后以四丁基溴化铵作催化剂加入 KF 发生氟代反应, 之后酸性条件下脱保护基, 最后重氮化反应合成终产物, 见图 13。反应简便易行, 整体工艺路线步骤少, 仅有 4 步反应, 反应总收率在 45%左右, 适合工业化生产。

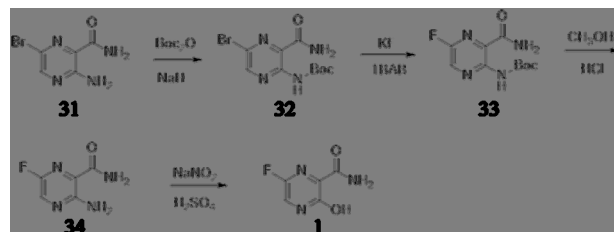


图 13 合成路径 8

Fig. 13 Synthetic path 8

5.8 以一种关键中间体(G)为纽带

该反应是通过合成关键中间体 G: 5-氨基-4-(2,2-二乙氧基乙酰胺)异恶唑-3-羧酸甲酯, 而后

经一系列反应生成 3,6-二氟-2-氨基吡嗪(7), 并最终生成目标产物法匹拉韦(1), 见图 14。目前合成关键中间体 G 的方法有 2 种:

①以 2,2-二乙氧基乙酸乙酯(35)为起始原料^[54-55], 经水解、酸化等一系列反应合成重要中间体 G (path 1)。路线太长, 总收率太低。

②以顺丁烯二酸酐(36)为原料^[56], 经过胺解反应、氧化反应等 5 步反应合成关键中间体 G (path 2)。该方法顺丁烯二酸酐原材料价格低廉, 市场易购买, 工艺反应条件温和, 收率较高, 为关键中间体 G 的大批量工业制造提供了可能。若生产法匹拉韦, 路线太长, 总收率低。

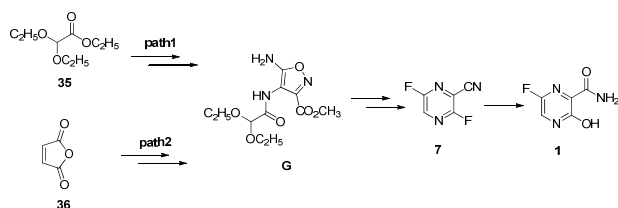


图 14 合成路径 9

Fig. 14 Synthetic path 9

6 小结

法匹拉韦是一种具有独特机制的广谱抗病毒药物, 作用于 RNA 依赖性 RNA 聚合酶, 目前未发现耐药病毒产生。虽然目前仅获批用于治疗流感病毒, 但根据目前的研究成果来看, 未来法匹拉韦必然会得到多方面的应用。加强其临床试验, 扩大药物应用, 对于 RNA 病毒感染的患者而言意义重大。在此过程中合成方法不断创新和完善仍旧是必不可少的工作。根据其作用机制可知, 法匹拉韦是一种前药, 吸收入体内之后需要经多步酶促反应生成 T-705 RTP 发挥作用, 为提高 T-705 RTP 的浓度和转化速度, 考虑制作单磷酸、二磷酸药物或者一些可以更好发挥作用的类似物或可作为后续的研究方向之一。

日前, 法匹拉韦已作为抗 SARS-CoV-2 病毒潜在药物投入临床试验, 从作用机制上来看, 法匹拉韦对各种 RNA 病毒都具备潜在的药效, 因为没有进行 I 期、II 期、III 期完整的试验过程, 缺乏一些可依赖的统计学数据, 安全性和有效性尚需进一步验证。目前, COVID-19 患者接受法匹拉韦治疗临床使用剂量是参考流感治疗剂量进行的(第 1 天 3 200 mg, 第 2~14 天, 1 200 mg·d⁻¹, 分 2 次口服, 疗程至病毒清除或最长 14 d), 在试验中应该注意法匹拉韦的用量要仔细控制, 要根

据年龄、性别、疾病严重程度等因素对药物用量予以调整。在使用过程中, 要密切观察患者的症状, 注意观察有无不良反应产生。法匹拉韦治疗新冠病毒仅属于试验性用药, 受治患者太少, 数据不足, 其治疗效果尚需进一步验证。

REFERENCES

- [1] WHO. Coronavirus disease 2019 (COVID-19) 26 March 2020 [EB/OL]. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.
- [2] LI G D, DE CLERCQ E. Therapeutic options for the 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) [J]. Nat Rev Drug Discov, 2020, 19(3): 149-150.
- [3] ADALJA A, INGLESBY T. Broad-spectrum antiviral agents: A crucial pandemic tool [J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2019, 17(7): 467-470.
- [4] LU H Z. Drug treatment options for the 2019-new coronavirus (2019-nCoV) [J]. Biosci Trends, 2020, 14(1): 69-71.
- [5] SISSOKO D, LAOUEANAN C, FOLKESSON E, et al. Experimental treatment with favipiravir for Ebola virus disease (the JIKI trial): A historically controlled, single-arm proof-of-concept trial in Guinea [J]. PLoS Med, 2016, 13(3): e1001967. DOI: 10.1371/journal.pmed.1001967.
- [6] ROSENKE K, FELDMANN H, WESTOVER J B, et al. Use of favipiravir to treat Lassa virus infection in macaques [J]. Emerging Infect Dis, 2018, 24(9): 1696-1699.
- [7] JULANDER J G, SHAFER K, SMEE D F, et al. Activity of T-705 in a hamster model of yellow fever virus infection in comparison with that of a chemically related compound, T-1106 [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(1): 202-209.
- [8] SMRECZAK M, ORŁOWSKA A, MARZEC A, et al. The effect of combined drugs therapy on the course of clinical rabies infection in a murine model [J]. Vaccine, 2019, 37(33): 4701-4709.
- [9] SHIRAKI K, DAIKOKU T. Favipiravir, an anti-influenza drug against life-threatening RNA virus infections [J]. Pharmacol Ther, 2020: 107512.
- [10] FURUTA Y, GOWEN B B, TAKAHASHI K, et al. Favipiravir (T-705), a novel viral RNA polymerase inhibitor [J]. Antiviral Res, 2013, 100(2): 446-454.
- [11] SANGAWA H, KOMENO T, NISHIKAWA H, et al. Mechanism of action of T-705 ribosyl triphosphate against influenza virus RNA polymerase [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11): 5202-5208.
- [12] DE CLERCQ E. New nucleoside analogues for the treatment of hemorrhagic fever virus infections [J]. Chem Asian J, 2019, 14(22): 3962-3968.
- [13] FURUTA Y, TAKAHASHI K, KUNO-MAEKAWA M, et al. Mechanism of action of T-705 against influenza virus [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2005, 49(3): 981-986.
- [14] GOLDHILL D H, LANGAT P, XIE H Y, et al. Determining the mutation bias of favipiravir in influenza virus using next-generation sequencing [J]. J Virol, 2019, 93(2): e01217-e01218.
- [15] ABDELNABI R, MORAIS A T S, LEYSSEN P, et al. Understanding the mechanism of the broad-spectrum antiviral activity of favipiravir (T-705): Key role of the F₁ motif of the viral polymerase [J]. J Virol, 2017, 91(12): e00487-e00417.
- [16] FURUTA Y, KOMENO T, NAKAMURA T. Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase [J]. Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci, 2017, 93(7): 1-5.

- 449-463.
- [17] PMDA(Pharmaceuticals and Medical Devices Agency). Report on the Deliberation Result [EB/OL]. 4 Mar 2014. <https://www.pmda.go.jp/files/000210319.pdf#page=15>.
 - [18] NGUYEN T H, GUEDJ J, ANGLARET X, et al. Favipiravir pharmacokinetics in Ebola-Infected patients of the JIKI trial reveals concentrations lower than targeted [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2017, 11(2): e0005389. Doi: 10.1371/journal.pntd.0005389.
 - [19] MADELAIN V, NGUYEN T H, OLIVO A, et al. Ebola virus infection: Review of the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of drugs considered for testing in human efficacy trials [J]. Clin Pharmacokinet, 2016, 55(8): 907-923.
 - [20] MADELAIN V, OESTEREICH L, GRAW F, et al. Ebola virus dynamics in mice treated with favipiravir [J]. Antiviral Res, 2015(123): 70-77.
 - [21] GOWEN B B, SEFING E J, WESTOVER J B, et al. Alterations in favipiravir (T-705) pharmacokinetics and biodistribution in a hamster model of viral hemorrhagic fever [J]. Antiviral Res, 2015(121): 132-137.
 - [22] SLEEMAN K, MISHIN V P, DEYDE V M, et al. *In vitro* antiviral activity of favipiravir (T-705) against drug-resistant influenza and 2009 a(H1N1) viruses [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2517-2524.
 - [23] MORREY J D, TARO B S, SIDDHARTHAN V, et al. Efficacy of orally administered T-705 pyrazine analog on lethal West Nile virus infection in rodents [J]. Antiviral Res, 2008, 80(3): 377-379.
 - [24] TANI H, FUKUMA A, FUKUSHI S, et al. Efficacy of T-705 (favipiravir) in the treatment of infections with lethal severe fever with thrombocytopenia syndrome virus [J]. mSphere, 2016, 1(1): e00061-e00015.
 - [25] ROCHA-PEREIRA J, JOCHMANS D, DALLMEIER K, et al. Favipiravir (T-705) inhibits *in vitro* Norovirus replication [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 424(4): 777-780.
 - [26] MENDENHALL M, RUSSELL A, JUELICH T, et al. T-705 (favipiravir) inhibition of arenavirus replication in cell culture [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(2): 782-787.
 - [27] SMEE D F, HURST B L, WONG M H, et al. Effects of the combination of favipiravir (T-705) and oseltamivir on influenza A virus infections in mice [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(1): 126-133.
 - [28] KISO M, TAKAHASHI K, SAKAI-TAGAWA Y, et al. T-705 (favipiravir) activity against lethal H5N₁ influenza A viruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2010, 107(2): 882-887.
 - [29] FANG Q Q, HUANG W J, LI X Y, et al. Effectiveness of favipiravir (T-705) against wild-type and oseltamivir-resistant influenza B virus in mice [J]. Virology, 2020(545): 1-9.
 - [30] BIXLER S L, BOCAN T M, WELLS J, et al. Intracellular conversion and *in vivo* dose response of favipiravir (T-705) in rodents infected with Ebola virus [J]. Antiviral Res, 2018(151): 50-54.
 - [31] OESTEREICH L, LÜDTKE A, WURR S, et al. Successful treatment of advanced Ebola virus infection with T-705 (favipiravir) in a small animal model [J]. Antiviral Res, 2014(105): 17-21.
 - [32] GUEDJ J, PIORKOWSKI G, JACQUOT F, et al. Antiviral efficacy of favipiravir against Ebola virus: A translational study in cynomolgus macaques [J]. PLoS Med, 2018, 15(3): e1002535. DOI: 10.1371/journal.pmed.1002535.
 - [33] YAMADA K, NOGUCHI K, KIMITSUKI K, et al. Reevaluation of the efficacy of favipiravir against rabies virus using *in vivo* imaging analysis [J]. Antiviral Res, 2019(172): 104641.
 - [34] MORSE J S, LALONDE T, XU S Q, et al. Learning from the past: Possible urgent prevention and treatment options for severe acute respiratory infections caused by 2019-nCoV [J]. ChemBioChem, 2020, 21(5): 730-738.
 - [35] WANG M L, CAO R Y, ZHANG L K, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. Cell Res, 2020, 30(3): 269-271.
 - [36] WANG W, LIU M, XIAO X R, et al. Synthesis of favipiravir [J]. J Int Pharm Res(国际药学研究杂志), 2015, 42(2): 220-224.
 - [37] WANG H, LI X Z, ZHONG W. Synthesis of favipiravir [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2014, 45(11): 1009-1012.
 - [38] ZHENG J Q, ZHANG T, LIU M C, et al. Manufacture method for 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinamide: China, 201210301602.1 [P]. 2012-11-14.
 - [39] SHI F Y, LI Z T, KONG L J, et al. Synthesis and crystal structure of 6-fluoro-3-hydroxypyrazine-2-carboxamide [J]. Drug Discov Ther, 2014, 8(3): 117-120.
 - [40] REN Y L, LIU F L. Synthesis of favipiravir [J]. Guangzhou Chem Ind(广州化工), 2017, 45(18): 52-53.
 - [41] ZHANG T, KONG L J, LI Z T, et al. Synthesis of favipiravir [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(9): 841-843.
 - [42] LIU F L, LI C Q, XIANG H Y, et al. A practical and step-economic route to favipiravir [J]. Chem Pap, 2017, 71(11): 2153-2158.
 - [43] LIU F L, LI C Q. A synthetic method of favipiravir: China, 201710195236.9 [P]. 2017-06-20.
 - [44] GUO Q, XU M S, GUO S, et al. The complete synthesis of favipiravir from 2-aminopyrazine [J]. Chem Pap, 2019, 73(5): 1043-1051.
 - [45] BELDAR S V, JORDIS U. Synthetic studies towards the antiviral pyrazine derivative T-705: 13th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry, November 1-30, 2009 [C]. Vienna University of Technology.
 - [46] HARA T, NORIMATSU N, KURUSHIMA H, et al. Method for producing dichloropyrazine derivative: US8835636 [P]. 2014-09-16.
 - [47] HARA T, NORIMATSU N, KURUSHIMA H, et al. Method for producing dchloropyrazine dervative: US, 8586741B2 [P]. 2013-11-19.
 - [48] HARA T, NORIMATSU N, KURUSHIMA H, et al. Method for producing dchloropyrazine dervative: US, 8835636B2 [P]. 2014-09-16.
 - [49] CHEN Y G, YU S, ZHAO X J, et al. synthetic methods of intermediate of favipiravir and favipiravir: China, 201610585418.2 [P]. 2018-01-30.
 - [50] BAO J Y, HUANG H, JIANG Y W, et al. A synthetic method of favipiravir: China, 201410769599.5 [P]. 2015-04-08.
 - [51] LI M Y. A synthetic method of favipiravir: China, 201710579926.4 [P]. 2017-10-03.
 - [52] WANG K, SUN X Y, YAO S, et al. Synthetic process of favipiravir: China, 201610742415.5 [P]. 2017-03-08.
 - [53] ZHENG J Q, ZHANG T, FENG B, et al. Manufacture method for 6-fluoro-3-hydroxy-2-pyrazinamide: China, 201110316778.X [P]. 2012-07-25.
 - [54] NAKAMURA K, MURAKAMI T, NAITOU H, et al. PYRAZINO [2, 3-D]ISOOXAZOLE DERIVATIVE: WO, 2012063931A1 [P]. 2012-05-18.
 - [55] NAKAMURA K, MURAKAMI T, NAKAKI N, et al. PYRAZINO [2, 3-D]ISOOXAZOLE DERIVATIVE: US, 20130245264 [P]. 2013-09-19.
 - [56] ZHENG G X, YANG L, MA Z J, et al. A method for preparing critical intermediate of favipiravir from maleic anhydride: China, 201510203008.2 [P]. 2015-08-05.

收稿日期: 2020-03-06

(本文责编: 曹粤锋)