

新型神经氨酸酶抑制剂的设计合成和药理活性测试

张黎明¹, 张慧鑫¹, 郁洁², 王德传^{1*} (1.中国药科大学理学院, 南京 211198; 2.中国药科大学生命科学与技术学院, 南京 210038)

摘要: 目的 为防控流感, 设计合成新型神经氨酸酶抑制剂, 并进行药理活性测试。方法 基于苯甲酸类神经氨酸酶抑制剂的结构, 拼合具有抗病毒活性的酰基硫脲片段, 利用前药原理设计并合成了 I 和 II 系列共 28 个新型神经氨酸酶抑制剂并进行药理活性筛选。药理活性测试选用流感病毒菌株 A/FM/1/47(H1N1), 分别进行神经氨酸酶单一浓度($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)抑制率和病毒抑制活性测试。结果 药理结果显示化合物 I-2, I-5, I-11 和 I-12 具有较好的病毒抑制活性, 其中 I-11 的活性最佳, 病毒抑制率达到 70.50%, 优于 oseltamivir。结论 通过对 28 个化合物进行初步构效关系研究, 为后续此类新型神经氨酸酶抑制剂的研究提供基础。

关键词: 苯甲酸类; 神经氨酸酶; 流感病毒

中图分类号: R914.2

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2019)13-1656-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.13.012

引用本文: 张黎明, 张慧鑫, 郁洁, 等. 新型神经氨酸酶抑制剂的设计合成和药理活性测试[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(13): 1656-1664.

Design, Synthesis and Pharmacological Activity Testing of the Novel Neuraminidase Inhibitor

ZHANG Liming¹, ZHANG Huixin¹, YU Jie², WANG Dechuan^{1*} (1.College of Science, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2.Life Science and Technology College, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To design, synthesis novel neuraminidase inhibitors and detect their pharmacological activity for inhibit virus. **METHODS** The antiviral acyl thiourea fragments were integrated with the benzoic acid structure of neuraminidase inhibitors. Based on the pro-drug principle, 28 compounds were designed and synthesized and conduct the pharmacological activity screening. A/FM/1/47 (H1N1) strain was selected for the pharmacological activity test, and the single concentration($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) inhibition rate of neuraminidase and *in vitro* virus inhibition test were performed respectively. **RESULTS** The results showed that I-2, I-5, I-11 and I-12 had desirable virus inhibitory activity, I-11 was the best among them. The virus inhibition rate of compound I-11 could reach 70.50%, which was superior to oseltamivir. **CONCLUSION** Preliminary study on structure-activity relationship of these 28 compounds will provide a basis for the design of the new neuraminidase inhibitors in the following study.

KEYWORDS: benzoic acid; neuraminidase; influenza virus

流行性感冒(简称流感), 是一种由流感病毒引起的呼吸道疾病^[1], 季节性流感和流感大爆发一直威胁着人们的健康。根据流感病毒的生命周期进行药物设计可以有效地阻止病毒的复制和传播。

目前开发较为成功的药物靶点是神经氨酸酶(neuraminidase, NA)。NA 是存在于流感病毒被膜上的一种四聚体蛋白质, 在流感病毒的复制和传播中发挥着极其重要的作用。在新病毒颗粒脱离宿主细胞的过程中, 被释放的病毒颗粒通过唾液酸黏附在宿主细胞上, NA 可以将唾液酸受体水解, 切断病毒颗粒与宿主细胞之间的联系, 促进子代病毒的释放而形成新的感染^[2]。

目前上市的 NA 抑制剂有 zanamivir(1)^[3-4]、oseltamivir(2)^[5-6]、peramivir(3)^[7]和 laninamivir(4)^[8],

结构式见图 1。Zanamivir 是第 1 个上市的 NA 抑制剂, oseltamivir 是第 1 个上市的口服类 NA 抑制剂。Zanamivir 和 laninamivir 通过吸入装置给药, peramivir 通过静脉注射给药^[9], 给药方式的不便捷性限制了这 3 种药物的使用; 同时不断变异的耐药病毒株的出现^[10-11], 更加局限了目前已有药物的使用, 开发新型 NA 抑制剂类药物势在必行。

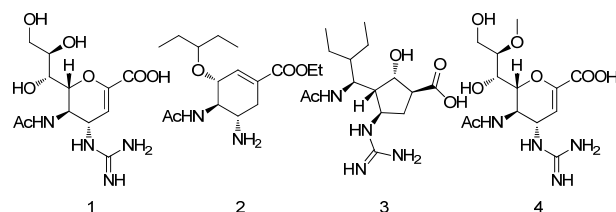


图 1 已上市的 NA 抑制剂类药物

Fig. 1 The structure of NA inhibitor drugs launched

作者简介: 张黎明, 男, 硕士生 Tel: 15951070506
Tel: 13951791036 E-mail: wdc@cpu.edu.cn

E-mail: Jere_cpu@163.com

*通信作者: 王德传, 男, 博士, 副教授

Sudbeck 等^[12]发现化合物 **5** 对 A 型流感病毒 N9 具有中等抑制活性($IC_{50}=20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 见图 2。分子对接显示苯甲酸的羧基可以与 NA 的 Arg 119、Arg 294 和 Arg 392 形成紧密结合; 胍基与 Glu 278 形成盐桥; 吡咯烷酮结构可以占据 Trp 180 和 Ile 224 形成的疏水空腔, 羟甲基可以与 NA 的 S4 区紧密结合。酰基硫脲类化合物具有广泛的生物活性, 其中包括广谱的抗流感病毒活性。

本研究以化合物 **5** 为先导化合物, 针对胍基位置进行结构修饰, 通过引入酰基硫脲片段, 以期增加与 NA 活性中心的结合作用, 从而达到抑制 NA 效果; 同时通过前药设计, 对羧基进行酯化修饰, 以增加生物利用度, 设计得到 I 系列化合物。为了进一步提高与 NA 活性中心的结合作用, 本研究通过增加吡咯环上羟基的数目, 增加与 NA 的结合作用, 设计合成 II 系列化合物, 见图 2。

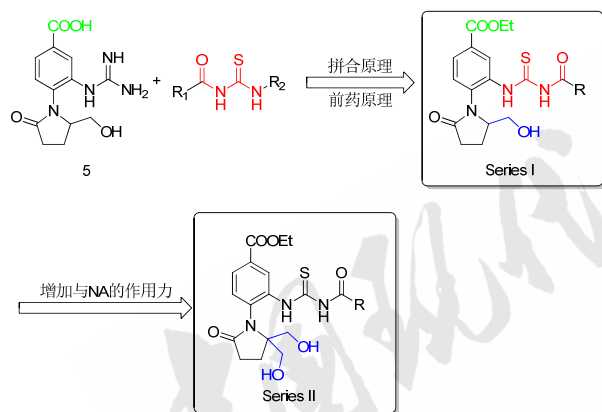


图 2 I 系列和 II 系列设计思路

Fig. 2 The design ideas of series I and series II

1 仪器与试剂

300 M 核磁共振波谱仪(德国 Bruker 公司); Q-TOF MicroTM 质谱仪(美国 Waters 公司)。

A/FM/1/47(H1N1)病毒株(中国药科大学生命科学与技术学院微生物系); MDCK 细胞(ATCC 细胞库); 奥司他韦(美国 MedChem Express 公司); 所用化学试剂未作特殊说明均为市售分析纯。

2 合成路线

目标化合物的合成路线见图 3。以对氨基苯甲酸为起始原料, 通过亲核取代、迈克尔加成、环合、硝化、硼氢化钠还原和氢气还原得到关键中间体^[13]。目标化合物通过制得的酰基异硫氰酸酯和关键中间体反应得到。化合物的结构见表 1~2。

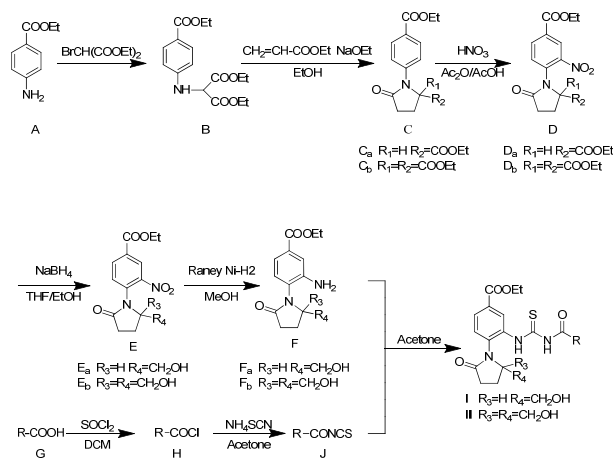


图 3 目标化合物合成路线图

Fig. 3 Synthetic route of the target compounds

表 1 I 系列化合物的结构

Tab. 1 Chemical structures of the series I compounds

化合物	R	化合物	R
I-1		I-9	
I-2		I-10	
I-3		I-11	
I-4		I-12	
I-5		I-13	
I-6		I-14	
I-7		I-15	
I-8			

表 2 II 系列化合物的结构

Tab. 2 Chemical structures of the series II compounds.

化合物	R	化合物	R
II-1		II-8	
II-2		II-9	
II-3		II-10	
II-4		II-11	
II-5		II-12	
II-6		II-13	
II-7			

3 化学合成

3.1 重要中间体的合成

3-氨基-4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]苯甲酸乙酯(Fa)和 3-氨基-4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]苯甲酸乙酯(Fb)的合成参照本课题组前期工作路线^[14]。

3.2 I 和 II 系列化合物的制备

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(I-1)

50 mL 茄形瓶中加入 2-甲基苯甲酸 0.63 g (4.6 mmol), 二氯甲烷 20 mL, 氯化亚砷 0.67 mL (9.3 mmol), 回流反应 4 h 后, 浓缩得 2-甲基苯甲酰氯。

50 mL 茄形瓶中加入 硫氰酸铵 0.53 g (7.0 mmol)和丙酮 8 mL, 搅拌溶解。缓慢滴加 2-甲基苯甲酰氯的丙酮溶液, 滴加完毕后升温至回流反应得到 2-甲基苯甲酰基异硫氰酸酯。

50 mL 茄形瓶中加入 Fa(2.3 mmol), 丙酮 20 mL, 搅拌溶解。缓慢滴加 2-甲基苯甲酰基异硫氰酸酯溶液, 滴加完毕后升温至回流反应。反应结束之后, 减压浓缩得油状物, 柱层析(200 目硅胶填料, 洗脱剂 DCM: MeOH=100: 1)得白色固体 0.62 g, 收率 58.1%。

MS[M+H]⁺: 456.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.59(s, 1H, NH); 11.82(s, 1H, NH); 9.08~9.07(d, 1H, $J=1.5$ Hz, ArH); 7.91~7.87(m, 1H, ArH); 7.55~7.41(m, 3H, ArH); 7.32~7.27(m, 2H, ArH); 4.84(s, 1H, OH); 4.38~4.31(q, 2H, CH₂); 4.12~4.11(d, 1H, $J=3.7$ Hz, 1/2CH₂); 3.37(s, 3H, CH₃); 2.46~2.43(m, 2H, CH₂); 2.42~2.40(m, 2H, CH₂); 2.27~2.08(m, 1H, 1/2CH₂); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃); 1.05(s, 1H, CH)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(I-2)

方法同 I-1, 收率 60.2%。

MS[M+H]⁺: 456.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.10(s, 1H, NH); 9.16(s, 1H, NH); 8.37(s, 1H, ArH); 8.09~8.07(d, 1H, $J=8.5$ Hz, ArH); 7.75~7.70(m, 2H, ArH); 7.46~7.40(m, 2H, ArH); 7.34~7.32(m, 1H, ArH); 4.43~4.38(s, 1H, OH); 4.38~4.33(m,

2H, CH₂); 3.77~3.74(d, 1H, $J=7.0$ Hz, CH); 3.50~3.47(d, 1H, $J=2.5$ Hz, CH); 2.71~2.66(m, 1H, 1/2CH₂); 2.63~2.56(m, 1H, 1/2CH₂); 2.44(s, 3H, CH₃); 2.31~2.24(m, 2H, CH₂); 1.41~1.38(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(4-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(I-3)

方法同 I-1, 收率 59.1%。

MS[M+H]⁺: 456.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.68(s, 1H, NH); 11.56(s, 1H, NH); 9.02(s, 1H, ArH); 7.91~7.87(m, 3H, ArH); 7.55~7.52(d, 1H, $J=9.0$ Hz, ArH); 7.36~7.33(d, 2H, $J=9.0$ Hz, ArH); 4.85~4.81(s, 1H, OH); 4.41~4.38(m, 2H, CH₂); 4.12~4.11(d, 1H, $J=3.0$ Hz, CH); 3.39~3.28(m, 2H, CH₂); 2.46(s, 3H, CH₃); 2.44~2.35(m, 1H, 1/2CH₂); 2.09(s, 1H, CH); 1.41~1.38(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(I-4)

方法同 I-1, 收率 59.1%。

MS [M+H]⁺: 472.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.54(s, 1H, NH); 11.29(s, 1H, NH); 9.05(s, 1H, ArH); 7.94~7.89(dd, 2H, $J=1.8$ Hz and $J=8.2$ Hz, ArH); 7.57~7.54(d, 1H, $J=8.5$ Hz, ArH); 7.32~7.18(m, 3H, ArH); 4.85(s, 1H, OH); 4.36~4.34(m, 2H, CH₂); 4.18~4.12(m, 1H, CH); 4.02(s, 3H, OCH₃); 3.39~3.34(m, 2H, CH₂); 2.51~2.50(m, 2H, CH₂); 2.09(s, 2H, CH₂); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(I-5)

方法同 I-1, 收率 61.2%。

MS[M+H]⁺: 472.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.62(s, 1H, NH); 11.71(s, 1H, NH); 8.99(s, 1H, ArH); 7.92~7.89(1H, dd, $J=1.9$ Hz and $J=6.5$ Hz, ArH); 7.58~7.54(m, 3H, ArH); 7.48~7.43(m, 1H, ArH); 7.25~7.22(m, 1H, ArH); 4.83(s, 1H, OH); 4.39~4.32(q, 2H, CH₂); 4.18(s, 2H, CH₂); 3.86(s, 3H, OCH₃); 3.34~3.37(m, 2H, CH₂); 2.34~2.32(m, 2H, CH₂); 2.12(s, 1H, CH); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(4-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-6**)

方法同 **I-1**, 收率 68.2%。

MS[M+H]⁺: 472.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.72(s, 1H, NH); 11.55(s, 1H, NH); 9.02(s, 1H, ArH); 8.03~7.90(m, 2H, ArH); 7.88~7.87(d, 1H, *J*=3.0 Hz, ArH); 7.54~7.52(d, 1H, *J*=6.0 Hz, ArH); 7.08~7.06(d, 2H, *J*=6.0 Hz, ArH); 4.84~4.80(m, 2H, CH₂); 4.38~4.31(q, 2H, CH₂); 4.09(s, 1H, OH); 3.85(s, 3H, OCH₃); 2.46~2.41(m, 2H, CH₂); 2.28~2.25(m, 1H, CH); 2.09~2.06(m, 2H, CH₂); 1.35~1.33(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-(3-环己基甲酰硫脲基)苯甲酸乙酯(**I-7**)

方法同 **I-1**, 收率 52.1%。

MS[M+H]⁺: 448.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.45(s, 1H, NH); 11.42(s, 1H, NH); 8.94~8.93(d, 1H, *J*=1.9 Hz, ArH); 7.86~7.82(m, 1H, ArH); 7.48~7.46(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 4.85(s, 1H, OH); 4.34~4.27(q, 2H, CH₂); 4.00~3.97(m, 1H, 1/2CH₂); 3.26~3.25(m, 1H, 1/2CH₂); 2.48~2.46(m, 3H, CH, CH₂); 2.41~2.33(m, 2H, CH₂); 1.79~1.69(m, 6H, 3×CH₂); 1.32~1.27(t, 3H, CH₃); 1.26~1.22(m, 5H, CH, 2×CH₂)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-(3-苯乙炔基甲酰硫脲基)苯甲酸乙酯(**I-8**)

方法同 **I-1**, 收率 48.2%。

MS[M+H]⁺: 470.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.60(s, 1H, NH); 11.67(s, 1H, NH); 9.02(s, 1H, ArH); 7.90~7.87(m, 1H, ArH); 7.81~7.75(m, 1H, ArH); 7.66~7.64(d, 1H, *J*=6.0 Hz, ArH); 7.54~7.47(m, 3H, ArH); 7.09~7.04(m, 1H, ArH); 4.89(s, 1H, OH); 4.35~4.33(m, 2H, CH₂); 4.10(s, 2H, 2×=CH); 3.35(s, 1H, CH); 2.42~2.31(m, 2H, CH₂); 2.15~2.00(m, 2H, CH₂); 1.35~1.30(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-(3-α-萘甲酰硫脲基)苯甲酸乙酯(**I-9**)

方法同 **I-1**, 收率 62.8%。

MS[M+H]⁺: 494.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.65(s,

1H, NH); 12.10(s, 1H, NH); 9.10(s, 1H, ArH); 8.15~8.13(m, 2H, ArH); 8.06~8.03(m, 1H, ArH); 7.93~7.90(m, 1H, ArH); 7.81~7.79(m, 1H, ArH); 7.69~7.55(m, 4H, ArH); 4.89(s, 1H, OH); 4.39~4.32(q, 2H, CH₂); 4.19(m, 2H, CH₂); 3.44~3.34(m, 2H, CH₂); 2.27~2.33(m, 2H, CH₂); 2.13~2.11(m, 1H, CH); 1.36~1.32(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-甲氧基苯乙酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-10**)

方法同 **I-1**, 收率 54.3%。

MS[M+H]⁺: 486.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.27(s, 1H, NH); 11.72(s, 1H, NH); 8.86(s, 1H, ArH); 7.85~7.82(m, 1H, ArH); 7.48~7.45(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.26~7.21(m, 1H, ArH); 6.88~6.81(m, 3H, ArH); 4.78(s, 1H, OH); 4.34~4.26(q, 2H, CH₂); 3.96(s, 2H, CH₂); 3.72(s, 3H, CH₃); 1.31~1.26(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-11**)

方法同 **I-1**, 收率 58.1%。

MS[M+H]⁺: 486.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.54(s, 1H, NH); 11.44(s, 1H, NH); 9.07(s, 1H, ArH); 8.03~7.89(m, 2H, ArH); 7.70~7.64(m, 1H, ArH); 7.57~7.54(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.30~7.27(m, 2H, ArH); 4.82~4.79(m, 1H, CH); 4.39~4.28(m, 4H, CH₂); 4.13(s, 1H, OH); 3.42~3.30(m, 2H, CH₂); 2.46~2.43(m, 2H, CH₂); 2.32~2.28(m, 2H, CH₂); 1.55~1.50(t, 3H, CH₃); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(4-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-12**)

方法同 **I-1**, 收率 61.3%。

MS[M+H]⁺: 486.3

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.72(s, 1H, NH); 11.43(s, 1H, NH); 9.03(s, 1H, ArH); 8.02~7.99(d, 2H, *J*=9.0 Hz, ArH); 7.90~7.87(m, 1H, ArH); 7.54~7.52(d, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH); 7.07~7.04(d, 2H, *J*=8.9 Hz, ArH); 4.80~4.76(m, 1H, CH); 4.39~4.32(m, 2H, CH₂); 4.18~4.11(m, 2H, CH₂); 4.14(s, 1H, OH); 3.42~3.30(m, 2H, CH₂); 2.46~2.43(m, 2H, CH₂); 2.32~2.28(m, 2H,

CH₂); 1.38~1.36(t, 3H, CH₃); 1.34~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-氯苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-13**)

方法同 **I-1**, 收率 63.2%。

MS[M+H]⁺: 476.0

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.47(s, 1H, NH); 11.80(s, 1H, NH); 9.03(s, 1H, ArH); 8.04(s, 1H, ArH); 7.93~7.88(m, 2H, ArH); 7.75~7.72(d, 1H, *J*=8.1 Hz, ArH); 7.60~7.53(m, 2H, ArH); 4.80~4.77(m, 1H, CH); 4.39~4.32(m, 2H, CH₂); 4.12(s, 1H, OH); 3.41~3.30(m, 2H, CH₂); 2.53~2.43(m, 2H, CH₂); 2.11~2.06(m, 2H, CH₂); 1.36~1.24(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-甲基戊酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-14**)

方法同 **I-1**, 收率 62.4%。

MS[M+H]⁺: 436.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.47(s, 1H, NH); 11.51(s, 1H, NH); 8.91(s, 1H, ArH); 7.89~7.86(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.52~7.49(m, 1H, ArH); 4.80~4.74(m, 1H, CH); 4.38~4.31(m, 2H, CH₂); 4.03(s, 1H, OH); 3.36~3.33(m, 2H, CH₂); 2.78~2.71(m, 1H, CH); 2.29~2.20(m, 2H, CH₂); 1.35~1.21(m, 7H, 2CH₂, CH₃); 1.08~1.06(t, 3H, CH₃); 0.89~0.86(t, 3H, CH₃)。

4-[2-(羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-(2,3,5-三氟苯基)乙酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**I-15**)

方法同 **I-1**, 收率 63.2%。

MS[M+H]⁺: 509.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.12(s, 1H, NH); 11.81(s, 1H, NH); 8.83(s, 1H, ArH); 7.89~7.86(m, 1H, ArH); 7.60~7.49(m, 3H, ArH); 4.75~4.73(m, 1H, CH); 4.38~4.31(m, 2H, CH₂); 4.02(s, 1H, OH); 3.89(s, 2H, CH₂); 3.31~3.23(m, 2H, CH₂); 2.50~2.49(m, 1H, 1/2CH₂); 2.39~2.14(m, 2H, CH₂); 2.00~1.96(m, 1H, 1/2CH₂); 1.35~1.30(t, 3H, CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**II-1**)

50 mL 茄形瓶中加入 2-甲基苯甲酸 0.63 g

(4.6 mmol), 二氯甲烷 20 mL, 氯化亚砷 0.67 mL (9.3 mmol), 回流反应 4 h 后, 浓缩得 2-甲基苯甲酰氯。

50 mL 茄形瓶中加入 硫氰酸铵 0.53 g (7.0 mmol)和丙酮 8 mL, 搅拌溶解。缓慢滴加 2-甲基苯甲酰氯的丙酮溶液, 滴加完毕后升温至回流反应得到 2-甲基苯甲酰基异硫氰酸酯。

50 mL 茄形瓶中加入 Fb(2.3 mmol), 丙酮 20 mL, 搅拌溶解。缓慢滴加 2-甲基苯甲酰基异硫氰酸酯溶液, 滴加完毕后升温至回流反应。反应结束之后, 减压浓缩得油状物, 柱层析(200 目硅胶填料, 洗脱剂 DCM:MeOH=50:1)得白色固体 0.40 g, 产率 35.4%。

MS[M+H]⁺: 488.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.55(s, 1H, NH); 11.76(s, 1H, NH); 9.08(s, 1H, ArH); 7.86~7.85(m, 1H, ArH); 7.54~7.41(m, 3H, ArH); 7.32~7.29(m, 2H, ArH); 5.31(s, 1H, OH); 4.89(s, 1H, OH); 4.38~4.31(q, 2H, CH₂); 3.54~3.48(m, 2H, CH₂); 3.33(s, 3H, CH₃); 3.22~3.17(m, 2H, CH₂); 2.44~2.40(m, 2H, CH₂); 2.21~2.20(m, 2H, CH₂); 1.35~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**II-2**)

方法同 **II-1**, 收率 40.3%。

MS[M+H]⁺: 488.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.58(s, 1H, NH); 11.56(s, 1H, NH); 9.03(s, 1H, ArH); 7.88~7.75(m, 3H, ArH); 7.55~7.42(m, 3H, ArH); 5.31(s, 1H, OH); 4.86(s, 1H, OH); 4.38~4.31(q, 2H, CH₂); 3.53~3.47(m, 2H, CH₂); 3.34(s, 3H, CH₃); 3.19~3.16(m, 2H, CH₂); 2.45~2.39(m, 2H, CH₂); 2.20~2.15(m, 2H, CH₂); 1.35~1.31(t, 3H, CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(4-甲基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(**II-3**)

方法同 **II-1**, 收率 39.7%。

MS[M+H]⁺: 488.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ : 12.62(s, 1H, NH); 11.51(s, 1H, NH); 9.05(s, 1H, ArH); 7.91~7.85(m, 3H, ArH); 7.55~7.52(m, 1H, ArH);

7.36~7.33(m, 2H, ArH); 5.29(s, 1H, OH); 4.82(s, 1H, OH); 4.38~4.31(q, 2H, CH₂); 3.57~3.48(m, 2H, CH₂); 3.32(s, 3H, CH₃); 3.20~3.15(m, 2H, CH₂); 2.45~2.39(m, 2H, CH₂); 2.20~2.15(m, 2H, CH₂); 1.35~1.31(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-4)

方法同 II-1, 收率 41.6%。

MS[M+H]⁺: 504.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.54(s, 1H, NH); 11.32(s, 1H, NH); 9.05(s, 1H, ArH); 7.95~7.89(m, 2H, ArH); 7.68~7.65(m, 1H, ArH); 7.57~7.54(m, 1H, ArH); 7.31~7.29(m, 1H, ArH); 7.20~7.15(m, 1H, ArH); 4.86~4.83(m, 2H, CH₂); 4.39~4.32(q, 2H, CH₂); 4.13(s, 1H, OH); 4.02(s, 3H, CH₃); 3.39~3.32(m, 2H, CH₂); 2.48~2.43(m, 2H, CH₂); 2.09(s, 1H, OH); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(3-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-5)

方法同 II-1, 收率 42.5%。

MS[M+H]⁺: 504.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.57(s, 1H, NH); 11.65(s, 1H, NH); 9.01(s, 1H, ArH); 7.89~7.85(m, 1H, ArH); 7.55~7.52(m, 3H, ArH); 7.47~7.42(m, 1H, ArH); 7.23~7.20(m, 1H, ArH); 5.29(s, 1H, OH); 4.83(s, 1H, OH); 4.38~4.34(q, 2H, CH₂); 3.85(s, 3H, CH₃); 3.53~3.47(m, 2H, CH₂); 3.19~3.14(m, 2H, CH₂); 2.49~2.43(m, 2H, CH₂); 2.20~2.08(m, 2H, CH₂); 1.38~1.24(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(4-甲氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-6)

方法同 II-1, 收率 41.9%。

MS[M+H]⁺: 504.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.68(s, 1H, NH); 11.45(s, 1H, NH); 9.06(s, 1H, ArH); 8.03~7.89(m, 2H, ArH); 7.88~7.85(m, 1H, ArH); 7.55~7.52(m, 1H, ArH); 7.09~7.05(m, 2H, ArH); 5.29(s, 1H, OH); 4.82(s, 1H, OH); 4.39~4.32(q,

2H, CH₂); 3.84(s, 3H, CH₃); 3.55~3.50(m, 2H, CH₂); 3.20~3.17(m, 2H, CH₂); 2.46~2.09(m, 4H, 2×CH₂); 1.36~1.28(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-(3-苯乙烯甲酰硫脲基)苯甲酸乙酯(II-7)

方法同 II-1, 收率 35.8%。

MS[M+H]⁺: 498.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.55(s, 1H, NH); 11.62(s, 1H, NH); 9.04(s, 1H, ArH); 7.75~7.66(m, 1H, =CH); 7.55~7.53(m, 2H, ArH); 7.49~7.48(m, 4H, ArH); 7.14~7.10(m, 1H, =CH); 5.31(s, 1H, OH); 4.83(s, 1H, OH); 4.36~4.34(m, 2H, CH₂); 3.60~3.50(m, 5H, =CH, 2×CH₂); 3.19(s, 2H, CH₂); 2.46(s, 1H, =CH); 2.24~2.19(m, 2H, CH₂); 1.36~1.31(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-(3-α-萘甲酰硫脲基)苯甲酸乙酯(II-8)

方法同 II-1, 收率 42.5%。

MS[M+H]⁺: 524.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.60(s, 1H, NH); 12.03(s, 1H, NH); 9.10(s, 1H, ArH); 8.16~8.12(m, 2H, ArH); 8.06~8.03(m, 1H, ArH); 7.90~7.87(m, 1H, ArH); 7.80~7.78(m, 1H, ArH); 7.67~7.54(m, 4H, ArH); 5.33(s, 1H, OH); 4.98(s, 1H, OH); 4.37~4.33(m, 2H, CH₂); 3.55~3.52(m, 2H, CH₂); 3.28~3.20(m, 2H, CH₂); 2.50~2.49(m, 1H, 1/2CH₂); 2.49~2.45(m, 2H, CH₂); 1.36~1.32(t, 3H, CH₃); 1.07~1.02(m, 1H, 1/2CH₂).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-9)

方法同 II-1, 收率 41.2%。

MS[M+H]⁺: 516.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.52(s, 1H, NH); 11.41(s, 1H, NH); 9.11(s, 1H, ArH); 8.11~8.04(d, 1H, *J*=7.7 Hz, ArH); 7.90~7.87(d, 1H, *J*=8.2 Hz, ArH); 7.69~7.64(m, 1H, ArH); 7.57~7.54(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.30~7.27(d, 1H, *J*=8.4 Hz, ArH); 7.21~7.16(m, 1H, ArH); 4.70(s, 2H, OH); 4.39~4.28(m, 4H, 2CH₂); 3.60~3.49(m, 2H, CH₂); 3.27~3.15(m, 2H, CH₂); 2.50~2.46(m, 2H, CH₂); 2.23~2.21(m, 2H, CH₂); 1.56~1.51(t, 3H, CH₃); 1.36~1.32(t, 3H, CH₃).

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-10)

方法同 II-1, 收率 40.2%。

MS[M+H]⁺: 516.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.68(s, 1H, NH); 11.37(s, 1H, NH); 9.08(s, 1H, ArH); 8.02~7.99(d, 2H, *J*=7.7 Hz, ArH); 7.90~7.87(d, 1H, *J*=9.0 Hz, ArH); 7.55~7.52(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.07~7.04(d, 2H, *J*=8.9 Hz, ArH); 5.27(s, 1H, OH); 4.78(s, 1H, OH); 4.39~4.32(m, 2H, CH₂); 4.18~4.11(m, 2H, CH₂); 3.60~3.46(m, 2H, CH₂); 3.25~3.14(m, 2H, CH₂); 2.50~2.44(m, 2H, CH₂); 2.21~2.16(m, 2H, CH₂); 1.38~1.31(t, 6H, 2CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-11)

方法同 II-1, 收率 39.6%。

MS[M+H]⁺: 506.1

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.47(s, 1H, NH); 11.80(s, 1H, NH); 9.03(s, 1H, ArH); 8.04(s, 1H, ArH); 7.93~7.88(m, 2H, ArH); 7.75~7.72(d, 1H, *J*=8.1 Hz, ArH); 7.60~7.53(m, 2H, ArH); 5.27(s, 1H, OH); 4.78(s, 1H, OH); 4.39~4.32(m, 2H, CH₂); 3.60~3.46(m, 2H, CH₂); 3.25~3.14(m, 2H, CH₂); 2.50~2.44(m, 2H, CH₂); 2.21~2.16(m, 2H, CH₂); 1.36~1.24(t, 3H, CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-12)

方法同 II-1, 收率 38.1%。

MS[M+H]⁺: 540.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.47(s, 1H, NH); 11.51(s, 1H, NH); 8.93~8.96(m, 1H, ArH); 7.86~7.83(d, 1H, *J*=8.3 Hz, ArH); 7.52~7.49(m, 1H, ArH); 5.24(s, 1H, OH); 4.73(s, 1H, OH); 4.38~4.31(m, 2H, CH₂); 3.58~3.44(m, 2H, CH₂); 3.20~3.08(m, 2H, CH₂); 2.75~2.70(m, 1H, CH); 2.50~2.35(m, 2H, CH₂); 2.17~2.08(m, 2H, CH₂); 1.59~1.24(m, 7H, 2CH₂, CH₃); 1.08~1.06(t, 3H, CH₃); 0.91~0.86(t, 3H, CH₃)。

4-[2,2-(二羟甲基)-5-氧代吡咯烷酮基]-3-[3-(2-乙氧基苯甲酰基)硫脲基]苯甲酸乙酯(II-13)

方法同 II-1, 收率 43.1%。

MS[M+H]⁺: 540.2

¹H-NMR(300 MHz, DMSO-*d*₆), δ: 12.11(s, 1H, NH); 11.74(s, 1H, NH); 8.89(s, 1H, ArH); 7.86~7.83(m, 1H, ArH); 7.58~7.48(m, 3H, ArH); 5.25(s, 1H, OH); 4.75(s, 1H, OH); 4.38~4.31(m, 2H, CH₂); 3.86(s, 2H, CH₂); 3.57~3.43(m, 2H, CH₂); 3.18~3.04(m, 2H, CH₂); 2.50~2.01(m, 4H, 2CH₂); 1.35~1.30(t, 3H, CH₃)。

4 生物活性测试

4.1 对流感病毒 A/FM/1/47(H1N1)-NA 抑制活性的测定

病毒的 NA 可以特异性地分解荧光底物 MUNANA, 产生的荧光值可以用来定量 NA 的活性。实验使用 96 孔黑板, 化合物用 DMSO 溶解并稀释至 1 000 μmol·L⁻¹。每孔先加 44 μL MES 缓冲液, 加入 30 μL 以 MES 稀释的 A/FM/1/47 (H1N1) 病毒尿囊液(按照体积 1:10), 再加入 1 μL 的待测化合物(终浓度为 10 μmol·L⁻¹), 分别混匀, 置于 37 °C 孵育 5 min, 避光操作每孔加入 25 μL 的 NA 特异性荧光底物 MUNANA, 置于 37 °C 孵育 30 min, 最后每孔加入 100 μL 的终止液, 用荧光酶标仪于激发波长 360 nm, 发射波长 450 nm 处测定荧光, 计算各化合物对于 H1N1 流感病毒 NA 活性的抑制率。实验同时设置不加药的空白对照组。测试结果见表 3。

NA 抑制率(%)=(空白对照组的荧光值-加药组的荧光值)/空白组的荧光值×100%

4.2 对流感病毒 A/FM/1/47(H1N1)的体外抑制活性的测定

流感病毒感染 MDCK 细胞后, 导致 MDCK 细胞产生细胞病变并死亡, 致使活细胞数目明显减少, 细胞活力降低。MTT 法测得的 *A* 值与细胞活力成正比, 各给药组细胞孔中的 *A* 值越高, 说明细胞活力越高, 则表明药物对病毒的抑制作用越强。

MDCK 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基按 5×10⁴ mL⁻¹ 浓度接种 96 孔培养板, 每孔 100 μL, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜形成细胞单层。弃上清后, 用 PBS 将细胞洗涤 2 次, 以洗去残留的胎牛血清, 加入用不含胎牛血清的 DMEM 培养基稀释至 100 TCID₅₀ 流感病毒 A/FM/1/47 (H1N1) 感染细胞, 每孔 100 μL, 37 °C

孵育 2 h 后, 弃去病毒液。用细胞维持液将各化合物稀释后分别加入单层 MDCK 细胞中, 使孔中药终浓度为 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验同时设正常细胞对照组、病毒对照组。MDCK 细胞于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中培养 48 h, 每日观察细胞病变现象。48 h 后, 用 MTT 法检测细胞活力, 酶标仪 490 nm 测定 A 值, 计算病毒抑制率^[13]。测试结果见表 3。

$$\text{病毒抑制率}(\%) = (A_{\text{加药组}} - A_{\text{病毒对照组}}) / (A_{\text{正常细胞对照组}} - A_{\text{病毒对照组}}) \times 100\%$$

根据目标化合物的活性数据(表 3), 可以得出: I 系列和 II 系列化合物的体外酶抑制活性均较差, 但是化合物 **I-2**、**I-5** 和 **I-12** 对流感病毒 A/FM/1/47 (H1N1) 的单一浓度抑制活性接近奥司他韦 (47.37%), 化合物 **I-11** 对 A/FM/1/47(H1N1) 的抑制活性高达 70.50%, 优于奥司他韦。

5 结果和讨论

5.1 分子对接研究

本研究对目标化合物进行分子对接研究。NA 选择 H1N1-NA(pdb code: 2HU0); 分子对接软件选用 Schrodinger; 作图软件选用 Pymol, 见图 3。

表 3 化合物的生物学活性($n \geq 3$)

Tab. 3 Biological activities of compounds ($n \geq 3$)

化合物	抑制率/%	
	A/FM/1/47(H1N1)-NA	A/FM/1/47(H1N1)
I-1	7.52	ND
I-2	6.90	44.37
I-3	9.26	ND
I-4	7.59	ND
I-5	10.43	34.60
I-6	10.10	ND
I-7	5.74	ND
I-8	4.25	ND
I-9	5.22	ND
I-10	2.02	12.80
I-11	12.12	70.50
I-12	9.76	39.82
I-13	11.62	7.37
I-14	22.64	11.61
I-15	29.59	ND
II-1	8.30	ND
II-2	11.72	11.65
II-3	7.22	ND
II-4	4.03	ND
II-5	7.26	10.68
II-6	8.19	ND
II-7	7.47	ND
II-8	8.31	ND
II-9	17.15	ND
II-10	16.35	2.36
II-11	15.51	7.37
II-12	22.68	14.34
II-13	18.62	12.07
奥司他韦	56.36	47.37

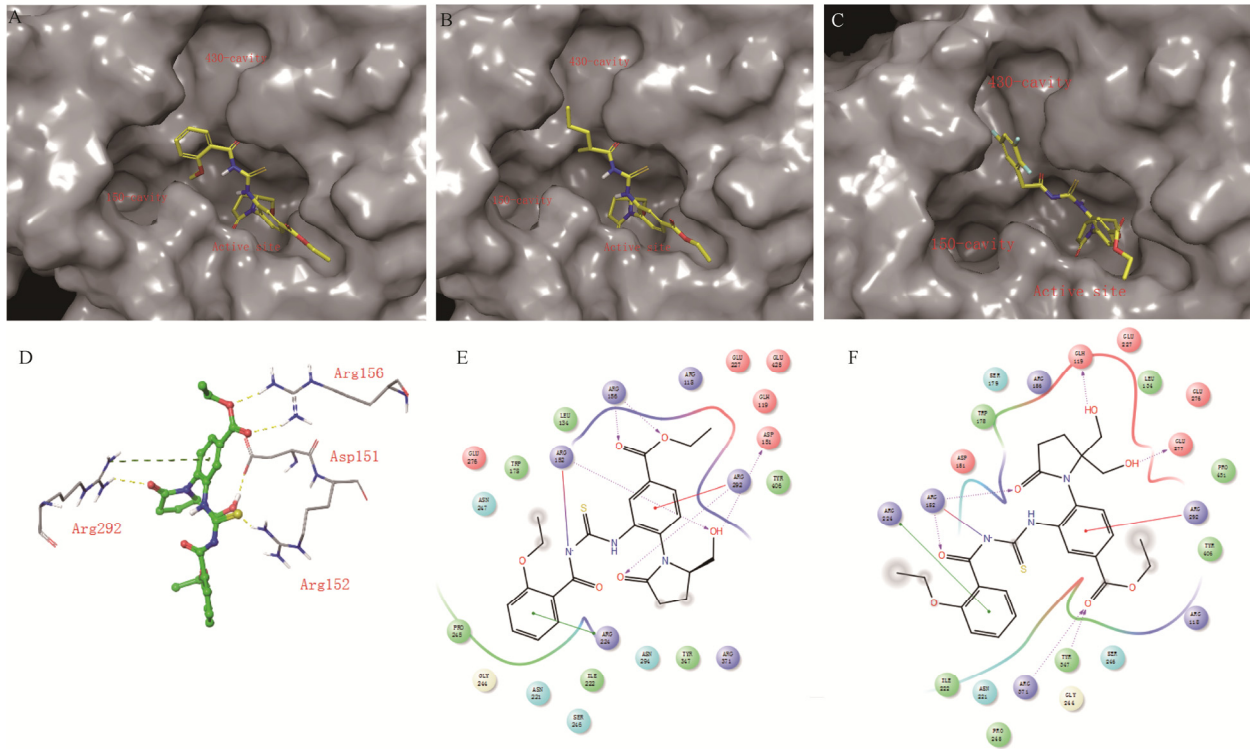


图 3 化合物与神经氨酸酶对接效果图

A-I-11 与 NA(2HU0)对接效果图; B-I-14 与 NA(2HU0)对接效果图; C-I-15 与 NA(2HU0)对接效果图; D-I-11 与 NA(2HU0)之间氢键作用力; E-I-11 与 NA(2HU0)之间作用效果图(2D); F-II-11 与 NA(2HU0)之间作用效果图(2D)。

Fig. 3 Interactions of compounds to the binding site of NA

A-I-11 bind to NA(2HU0); B-I-14 bind to NA(2HU0); C-I-15 bind to NA(2HU0); D-hydrogen bond force between I-11 and NA(2HU0); E-2D figure of I-11 bind to NA(2HU0); F-2D figure of II-11 bind to NA(2HU0).

根据对接结果可以得出：①目标化合物能与 NA 活性中心结合，见图 3a~3b，但是苯环上的羧酸结构乙酯化，失去了与 NA S1 区的盐键作用，所以体外进行酶抑制活性较差。但是酯基化之后，仍然与 NA 的 Arg 156 存在氢键作用力，见图 3d。②目标化合物中吡咯环上羟基的数目不同，与 NA 结合作用力也不同。I 系列化合物的羟基可以与 NA S3 区的 Arg 152 形成氢键作用；II 系列吡咯环上的 2 个羟基分别与 Glu 277 和 Gln 119 形成氢键作用。II 系列化合物与 NA 的结合作用力强于 I 系列化合物，与设计目的一致，见图 3e~3f。③目标化合物中酰基硫脲基团中靠近酰基端的 NH 可以与 Arg 152 形成盐键作用，可以增加与 NA 之间的结合作用，见图 3e。④酰基硫脲的取代基对抑制剂与 NA 的结合方式也有较明显的影响。当取代基为芳香基团时，可以与 Arg 224 形成 π -阳离子作用；而当取代基为脂肪基团时，则失去这部分作用力，脂肪基团与 NA 形成疏水作用力。⑤I-11 中苯环邻位取代基有进入 150-空腔的趋势，见图 3a；I-14 的 2-甲基戊基取代基有进入 NA 430-空腔的趋势，见图 3b；当取代基为三氟苯乙基时，抑制剂能进入 NA 的 430-空腔，见图 3c。

5.2 初步构效关系研究

本研究针对 28 个新型抑制剂的结构与活性的关系，进行初步构效关系研究。结果显示：①抑制剂的羧基被修饰成前药，导致抑制剂的体外酶活性较弱，证明羧基是 NA 体外活性必需。②I 系列与 II 系列相比，在取代基相同的情况下，体外酶抑制活性相近，说明羟甲基的数目对苯甲酸酯类抑制剂体外抑制活性影响不大。③取代基的不同，对酶的活性影响较大。当抑制剂侧链能进入 NA 抑制剂的 430-空腔时(I-15、II-13)，对酶的抑制活性较佳。④当抑制剂不仅能与 NA 活性中心结合，同时也能有 150-空腔和 430-空腔结合时，会提高 NA 抑制活性。

5.3 展望

本研究在总结苯甲酸酯类新型抑制剂的初步构效关系后开始准备进一步研究。①抑制剂的酶活性与病毒活性差异较大，本课题组将对苯甲酸酯类抑制剂的细胞毒性进行测试；并且探索该类抑制剂是否存在潜在的抗病毒靶点。②通过改变取代基继续该类抑制剂的合成研究。通过增长取代苯环的取代基长度和脂肪链取代基的长度，以

期望抑制剂能与活性中心结合的同时，与活性中心的 150-空腔和 430-空腔结合，从而获得活性较佳的新型苯甲酸酯类 NA 抑制剂。

6 结论

本研究设计并合成了 28 个结构新颖的苯甲酸酯类化合物，并进行了酶和细胞水平的生物活性测试，化合物 I-11 具有较好的病毒抑制活性。在此基础上对构效关系进行总结，为后续苯甲酸酯类 NA 抑制剂的研究提供基础。

REFERENCES

- [1] TAUBENBERGER J K, MORENS D M. The pathology of influenza virus infections [J]. *Annu Rev Pathol*, 2008, 3(1): 499-522.
- [2] MATEOSOVICH M, KLENK H D. Natural and synthetic sialic acid-containing inhibitors of influenza virus receptor binding [J]. *Rev Med Virol*, 2003, 13(2): 85-97.
- [3] VON I, WU W Y, KOK G B, et al. Rational design of potent sialidase-based inhibitors of influenza virus replication [J]. *Nature*, 1993, 363(6428): 418-423.
- [4] DUNN C J, GOA K L. Zanamivir: a review of its use in influenza [J]. *Drugs*, 1999, 58(4): 761-784.
- [5] KIM C U, LEW W, WILLIAMS M A, et al. Influenza neuraminidase inhibitors possessing a novel hydrophobic interaction in the enzyme active site: design, synthesis, and structural analysis of carbocyclic sialic acid analogues with potent anti-influenza activity [J]. *J Am Chem Soc*, 1997, 119(4): 681-690.
- [6] MCCLELLAN K, PERRY C M. Oseltamivir: a review of its use in influenza [J]. *Drugs*, 2001, 61(2): 263-283.
- [7] CHAND P, KOTIAN P L, DEGHANI A, et al. Systematic structure-based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent anti-influenza activity [J]. *J Med Chem*, 2001, 44(25): 4379-4392.
- [8] KUBO S, TOMOZAWA T, KAKUA M, et al. Laninamivir prodrug CS-8958, a long-acting neuraminidase inhibitor, shows superior anti-influenza virus activity after a single administration [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(3): 1256-1264.
- [9] DAS K. Antivirals targeting influenza A virus [J]. *J Med Chem*, 2012, 55(14): 6263-6277.
- [10] NGUYEN H T, NGUYEN T, MISHIN V P, et al. Antiviral susceptibility of highly pathogenic avian influenza A(H5N1) viruses isolated from poultry, Vietnam, 2009-2011 [J]. *Emerg Infect Dis*, 2013, 19(12): 1963-1971.
- [11] SAMSON M, PIZZOMO A, ABED Y, et al. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors [J]. *Antiviral Res*, 2013, 98(2): 174-185.
- [12] SUDBECK E A, JEDRZEJAS M J, SINGH S, et al. Guanidinobenzoic acid inhibitors of influenza virus neuraminidase [J]. *J Mol Biol*, 1997, 267(3): 584-594.
- [13] 王德传, 郁洁, 周雨, 等. 苯甲酸硫脲类抗流感病毒化合物及其制备方法和用途: 中国, 104447481A[P]. 2015-03-25.
- [14] DING Y, DOU J, TENG Z, et al. Antiviral activity of baicalin against influenza A (H1N1/H3N2) virus in cell culture and in mice and its inhibition of neuraminidase [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(12): 3269-3278.

收稿日期: 2018-09-10

(本文责编: 曹粤锋)