

抗乙型肝炎病毒药替比夫定

赵文丽编译

(太原市妇幼保健院皮肤科, 山西 太原 030012)

摘要:慢性乙型肝炎是世界范围内第9位最常见的死亡原因,其传染性比艾滋病要大50~100倍。治疗从乙型肝炎转为慢性时开始,治疗的主要目的是抑制乙型肝炎病毒的复制,防止不可逆的肝损伤的发生。慢性乙型肝炎的标准抗病毒治疗长期用药常产生耐药。因此,研究重点是开发新的直接抗乙型肝炎病毒药。从一系列简单的非天然核苷类化合物中找到的替比夫定,呈现强效选择性和特异性抗乙型肝炎病毒复制活性,已选作进一步开发研究。

关键词:乙型肝炎;替比夫定;拉米夫定;病毒复制

中图分类号:R978.7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0971(2004)04-0231-03

1 概述

慢性乙型肝炎由肝炎病毒家族的双螺旋环状封闭DNA病毒引起,是世界上第9位最常见的死亡原因。世界范围内每年死于乙型肝炎的估计有100~200万人。乙型肝炎病毒(HBV)主要在肝细胞内通过RNA介导的逆转录进行复制。治疗的主要目的是抑制HBV复制,防止产生不可逆肝损伤。标准慢性乙型肝炎治疗用干扰素 α -2b、拉米夫定和阿特福韦。然而,长期用药(>12个月)的主要问题是发生耐药,例如,拉米夫定。耐拉米夫定的HBV,其特点是位于HBV聚合酶催化域的YMDD氨基酸发生突变。复合用药可能避免产生耐药,例如,拉米夫定与干扰素或其他抗病毒药合用。因此,重点在于研制新的直接抗HBV的药,即通过抑制聚合酶、逆转录酶或其他病毒酶而阻断HBV的复制。已发现一系列简单非天然核苷化合物有选择性抑制HBV复制的作用。与其他核苷类似物不同的是,这些分子并非通过化学修饰起作用。这些分子很像天然的脱氧核苷化合物,差别仅在于它们的碱基和糖分子空间关系属于L型,而天然的脱氧核苷属于D型。这些 β -L-核苷,包括 β -L-2'-脱氧胞苷(L-dC)、 β -L-2'-脱氧腺苷(L-dA)和替比夫定(telbivudine, L-dT, NV-02B, β -L-2'-脱氧胸腺嘧啶),它们的特异性抗肝炎病毒活性与 β -L-2'-脱氧核苷糖上的3'-OH有关。其中替比夫定呈现强而选择性和特异性抗HBV复制活性,而对人DNA聚合酶无影响。替比夫定已成为进一步开发治疗慢性乙型肝炎的候选药物。

2 药理作用

替比夫定强而选择性地抑制人肝癌细胞中的HBV,而对艾滋病病毒感染的人外周血单核细胞无影响($EC_{50} = 0.19 \pm 0.09$ vs $> 200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。该药浓度直到 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对人2.2.15细胞、人外周血单核细胞、人包皮成纤维细胞、人骨髓祖细胞中的DNA聚合酶 α 、 β 或 γ 均无抑制作用,也未见细胞毒性[半数细胞毒性浓度(CC_{50}) $> 1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$]。在HepG2细胞实验中未发现对线粒体功能或形态的影响,提示替比夫定是通过HBV前基因组RNA抑制逆转录而起作用。

体外实验显示替比夫定有明显的选择性,对旱獭HBV和鸭HBV有强抑制作用($EC_{50} = 0.05 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 或更低),而不影响艾滋病病毒、呼吸道合胞病毒、单纯疱疹病毒、带状疱疹病毒、人巨细胞病毒、EB病毒、麻疹病毒、腺病毒、鼻病毒、流感病毒及类流感病毒等的复制。用稳定表达野生型HBV的HepG2 49-27细胞进行的体外实验中,替比夫定与阿特福韦、拉米夫定和恩替卡韦(entecavir)伍用一周,未观察到伍用后对病毒复制的抑制产生明显的协同或拮抗作用。体外实验用野生型HBV或rtL 180M, rtL 180M + rtM 204V, rtM 204I HBV突变株检验了替比夫定对耐拉米夫定HBV的作用。结果显示,耐拉米夫定的HBV与替比夫定有交叉耐药。抑制野生型HBV复制的替比夫定 $IC_{50} = 0.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对rtL 180M突变病毒至少有10倍耐药。对rtM 204I和rtL 180M + rtM 204V突变病毒还观察到高水平耐药(>300倍)。在表达野生型HBV或耐药HBV突变株L528M, M552I或L528M + M552V的HepG2细胞体外

实验中,还检查了替比夫定、阿特福韦和恩替卡韦的交叉耐药性。替比夫定抑制野生型 HBV 复制的 IC_{50} 为 $0.17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而对 M552I 和 L528M + M552V 聚合酶突变株分别为 235 和 132 倍,显示有交叉耐药,表达 L528 突变株的细胞也观察到对替比夫定有交叉耐药(10 倍),程度类似对拉米夫定的耐药水平。表达 M552I 和 L528M + M552V 的突变株对拉米夫定高度耐药($> 1\ 000$ 倍)。恩替卡韦对野生型 HBV 抑制的 IC_{50} 为 $0.0022 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,但对拉米夫定耐药突变株 M552I 和 L528M + M552V 的抑制活性分别为 $1/860$ 和 $1/180$ 。阿特福韦对所有突变株仍然有效, IC_{50} 值为野生型 HBV 的 3.7 倍。在早獭慢性 HBV 感染模型上检查了替比夫定(0.01, 0.1, 1 和 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 口服, sid, 28 d)的体内活性,并与拉米夫定 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 作了比较。替比夫定治疗第 1 天就观察到对 HBV DNA 复制的明显抑制。替比夫定 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 治疗 14 d,动物血浆病毒水平已降至可检出水平以下;第 14 ~ 28 天从基线上降低至少 $8 \log_{10}$ 拷贝/毫升。此外,治疗 2 ~ 4 周后观察到有病毒水平反弹。拉米夫定效果较差,可能是给药剂量较低,血清病毒水平只降低 1 半。慢性 HBV 感染早獭模型的 12 周给药得到相似结果。研究中替比夫定与 $L\text{-dC}(1 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 口服)伍用,治疗动物血浆中病毒水平降低 $8 \log_{10}$ 拷贝/毫升或更多,表面抗原也明显降低。未观察到治疗引起的毒性。观察了单次或多次口服替比夫定(直到 $2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$)4 周的大鼠和猕猴的毒性。两种动物上均未见明显毒性,即对体重、进食量、血液学、器官重量和组织病理学均无影响。 $2\ 000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量对雌雄小鼠均无影响,未观察到副作用。在沙门菌和大肠杆菌突变实验中,浓度直至 $5\ 000 \mu\text{g}/\text{板}$ 未见致突变效应。此外,在 CHO 细胞染色体突变实验中也未观察到诱变作用。

3 药代动力学和代谢

用 HPLC 法测定人血浆中替比夫定的浓度。检出限为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,血浆回收率为 74.5% ~ 94.1% (平均 90.6%)。替比夫定 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 静脉给药后,猕猴和早獭血浆药物水平呈双指数曲线下降;8 h 后降至检出限度以下。消除半衰期($t_{1/2}$)约为 1.5 h (猴)和 3.5 h (早獭)。猴总清除率高于早獭(0.60 vs $0.30 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}$)。两种动物组织分布均好且相似。两种动物口服吸收均较慢, c_{max} 在给药后 1 ~ 4

h。药物的绝对生物利用度猕猴和早獭分别为 68.6% 和 38.3%。

在 HepG2 细胞和原代培养人肝细胞中检测了替比夫定在细胞内的代谢。在这两种细胞中替比夫定大部分磷酸化,成为单磷酸盐、双磷酸盐及主要代谢物 5'-3 磷酸衍生物($L\text{-dTTP}$)。 $L\text{-dTTP}$ 在 HepG2 与人肝细胞中的浓度分别为 (27.7 ± 12.1) 和 $(16.5 \pm 9.8) \text{ pmol}/1\ 000$ 万细胞。 $L\text{-dTTP}$ 在细胞内的半衰期至少为 15 h。给药后 24 h, $L\text{-dTTP}$ 仍保持在 HBV DNA 聚合酶的 IC_{50} 水平。人和早獭肝提取物实验表明,替比夫定由胸腺嘧啶激酶磷酸化。

4 临床试验

慢性乙型肝炎病人临床 I / II 期试验观察了替比夫定(25, 50, 100, 200 和 400 mg 口服, sid, 28 d 及随访 12 周)的安全性和疗效。在 4 周内,所有剂量组血清病毒水平降低 99% 以上。25, 50, 100 和 200 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 同期组的 HBV DNA 总平均分别为 (2.4 ± 0.3) , (2.7 ± 0.2) , (3.1 ± 0.1) 和 $(2.9 \pm 0.2) \log_{10}$ 拷贝/毫升;400 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 同期组 4 周初步结果降为 $3.6 \log_{10}$ 拷贝/毫升,均无明显毒性报告。II 期 HBV 消除率(2 ~ 4 周)与剂量成正比,较大剂量组停药后 HBV DNA 增加较慢。病毒的动态检测表明,高剂量 $600 \sim 800 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$ 或较长期给药可使 HBV DNA 水平降低 $6 \sim 7 \log_{10}$ 拷贝/毫升。多中心、随机、双盲 104 名慢性乙型肝炎临床 II_b 试验,比较了口服替比夫定(400 或 $600 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$)与拉米夫定($100 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$)单用或合用 52 周的安全性和疗效。30 例在 12 周时作了评价。在 1 周和 12 周时,HBV DNA 从基线水平分别降低 \log_{10} 拷贝/毫升:拉米夫定为 (2.27 ± 0.1) 和 (3.87 ± 0.4) ;400 mg 替比夫定为 (2.44 ± 0.3) 和 (4.34 ± 0.3) ;600 mg 替比夫定为 (2.15 ± 0.3) 和 (4.64 ± 0.6) ;400 mg 替比夫定 + 拉米夫定为 (2.38 ± 0.2) 和 (4.97 ± 0.6) ;600 mg 替比夫定 + 拉米夫定为 (2.80 ± 0.3) 和 (4.64 ± 0.6) 。拉米夫定组 4 ~ 12 周 HBV DNA 降低水平低于替比夫定组 [(0.21 ± 0.1) vs $(1.25 \pm 0.17) \log_{10}$ 拷贝/毫升]。此外,替比夫定单药或伍用拉米夫定组与拉米夫定单药组比较,HBV DNA 水平低于 $5 \log_{10}$ (分别为 76% vs 40%),低于 $4 \log_{10}$ (分别为 52% vs 20%),低于 $3 \log_{10}$ (分别为 24% vs 0%)。所有病人 24 周的初步结果显示,单用替比夫定组 75% 病人丙氨酸转氨酶水平恢复正常。药物耐受良好,无用药有关的副作

用报告,结论是替比夫定较拉米夫定效果好。现正进行 e 抗原阳性或阴性的1 200名乙型肝炎的多中

心Ⅲ期临床试验,比较替比夫定与标准治疗的安全性和疗效。

喹诺酮类药物的光毒性研究进展

毛浩玉综述 游雪甫审校

(中国医学科学院/中国协和医科大学医药生物技术研究所,北京 100050)

摘要: 本文对近年来喹诺酮类药物的光毒性研究进行了较为全面的总结,分别介绍了光毒性的构效关系、分子机制、体内外研究方法、临床试验数据及其分析。为今后对该领域研究的开展、临床上合理应用喹诺酮类药物、预防和减少光毒性不良反应的发生提供参考。

关键词: 喹诺酮类药物;光毒性;构效关系;分子机制;体内外研究方法;临床试验

中图分类号: R994.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2004)04-0233-04

喹诺酮类(quinolones)属化学合成的抗菌药物,具有4-喹诺酮的基本结构,对细菌DNA回旋酶(DNA gyrase)具有选择性抑制作用。1962年,在氯喹的合成中偶然发现副产物之一萘啶酸(nalidixic acid)具有抗菌活性,从此诞生了喹诺酮类药物,为临床上多种疾病的治疗开辟了一条前景光明的道路,在不到半个世纪的时间里先后开发了四代产品。近年来,氟喹诺酮类更以其对G⁻和G⁺菌的双重杀菌活性而得到大力推广,在临床上应用日益广泛和增多,从而使各种不良反应的发生和影响也相伴而来^[1]。喹诺酮类药物的光毒性虽然发生率相对较低,但可能导致严重后果,为此,近年来在国外对此研究日渐重视。目前,其构效关系已经阐明,分子机制方面亦有突破,体内外研究的实验模型和方法不断成熟。同时,Ⅲ/Ⅳ期临床试验的报道也为该类药物的安全性评价和合理用药提供了确切指导。然而,相对国外光毒性研究而言,国内只有少数的临床病例报道,在此领域鲜有系统的基础和临床研究。因此,本文将着重介绍光毒性的基础和临床试验,以期展现目前喹诺酮类药物光毒性不良反应的研究水平及其日后的发展方向,并为国内相关研究提供参考。

1 构效关系

喹诺酮类药物的化学结构决定了它的光毒性。母环上8位取代基与光毒性有直接关系,若引入卤

素可使光毒性增加^[2]。取代基对光毒性的增加程度依次为:C-F≥C-Cl>N>C-H>C-CF₃>C-OCH₃,说明C₆位引入甲氧基可增加此类化合物对紫外光的稳定性^[3]。因此,近年来研发的新药如莫西沙星(moxifloxacin)、加替沙星(gatifloxacin)、吉米沙星(gemifloxacin)等均以甲氧基取代,在光毒性的控制上获得相当的进展。但由于母核萘啶酸本身对长波紫外线(UVA)具有光敏作用,所以在使用喹诺酮类药物时,仍应尽量避免各类光照,尤其是太阳光照。

2 分子机制

紫外光按波段分为UVA(315~400 nm)、中波紫外线(UVB,280~315 nm)和短波紫外线(UVC,100~280 nm)。目前,已知光毒性产生的光解反应90%以上由UVA引起,极小部分由UVB引起,与可见光无关。由UVA介导的喹诺酮类药物光毒性的分子机制有两种类型:自由基理论和单氧化理论^[4,5]。

2.1 自由基理论

喹诺酮类药物氧化后产生自由基,使鸟嘌呤的自由阳离子水合生成8-氧代嘌呤和噻唑酮等,噻唑酮的单分子氧化作用不及嘌呤,以C₆上的自由阳离子为主要代谢途径发生羟基化,导致细胞内DNA受到一系列损害,使细胞产生毒性。

2.2 单氧化理论

喹诺酮类药物进入细胞后被分子氧活化,生成单氧(¹O₂),鸟嘌呤是四种碱基中唯一与单氧反应者,最后生成4-羟基-8-氧-4,8-二羟鸟嘌呤和8-氧-7,8-二羟鸟嘌呤,从而破坏了DNA的合成。