

新的核苷类化合物 β -L-D4A 的化学合成及体外抗 HBV 作用

吴金明¹, 林菊生^{2*}, 谢娜², 邱国福³, 胡先明³

(1. 温州医学院附属第一医院 消化内科, 浙江 温州 325000; 2. 华中科技大学同济医学院附属同济医院 肝病研究所, 湖北 武汉 430030; 3. 武汉大学药学院 病毒学国家重点实验室, 湖北 武汉 430072)

摘要: 目的 以 D 型谷氨酸为原料, 通过一系列化学转化, 合成了新的核苷类化合物 β -L-D4A, 并初步探索其体外抗 HBV 作用。方法 合成 β -L-D4A, 用红外光谱、核磁共振氢谱和质谱确证目标化合物的结构, 以 2. 2. 15 细胞 (HepG2 细胞进行 HBV 基因组转染后所得) 培养为基础, Southern 印迹法检测不同浓度化合物体外抑制 HBV DNA 复制作用, 并求出 50% 抑制的药物浓度, 即 EC_{50} 。以四噻唑蓝 (MTT) 比色分析法检测不同浓度药物的细胞毒性, 求出 IC_{50} 。结果 化合物 β -L-D4A 经红外光谱、核磁共振氢谱和质谱确证; 2. 2. 15 细胞培养上清液病毒 DNA 的 Southern 印迹、自显影结果显示病毒的抑制呈明显的浓度依赖性, 计算出 EC_{50} 为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 胞内 DNA 的 Southern 印迹、自显影显示类似的结果; 细胞毒性实验显示 IC_{50} 为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论 体外实验显示 β -L-D4A 具有明显的抑制病毒 DNA 复制作用, 且无明显的细胞毒性, TI 值为 1 000, 高于临床用 Lamivudine (750), 有望开发为临床抗 HBV 用药。

关键词: 核苷类化合物; β -L-D4A; 化学合成; 乙肝病毒

中图分类号: R916.1; R916.2 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)09 - 0825 - 05

Synthesis of a novel L-nucleoside, β -L-D4A and its inhibition on the replication of hepatitis B virus *in vitro*

WU Jin-ming¹, LIN Ju-sheng^{2*}, XIE Na², QIU Guo-fu³, HU Xian-ming³

(1. Department of Digestive Diseases of The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325000, China; 2. Institute of Liver Diseases, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University, Wuhan 430030, China; 3. State Key Laboratory of Virology, College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Aim Nucleoside analogues have become the most promising candidates of anti-HBV drugs. In this study, β -L-D4A was synthesized and explored its inhibitory action against hepatitis B virus (HBV) in 2. 2. 15 cells derived from HepG2 cells transfected with HBV genome. **Methods** β -L-D4A was stereo-controlled synthesized from D-glutamic acid, and the structure was identified by IR, ¹H NMR and MS. 2. 2. 15 Cells were placed at a density of 5×10^4 per well in 12-well tissue culture plates, and treated with various concentrations of β -L-D4A for 6 days. At the end, medium was processed to obtain virions by a polyethylene glycol precipitation method. At the same time, intracellular DNA was also extracted and digested with Hind III. Both of the above DNA were subjected to Southern blot, hybridized with a ³²P-labeled HBV probe and autoradiographed. The intensity of the autoradiographic bands was quantitated by densitometric scans of computer and EC_{50} was calculated. 2. 2. 15 cells were also seeded in 24-well tissue culture plates, and cytotoxicity with different concentrations was examined by MTT method. IC_{50} was calculated. **Results** The synthesized compound structure conformed with β -L-D4A; Autoradiographic bands showed similar for supernatant and intracellular HBV DNA. Episomal HBV DNA was

收稿日期: 2004-11-22.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39970858, 30330680).

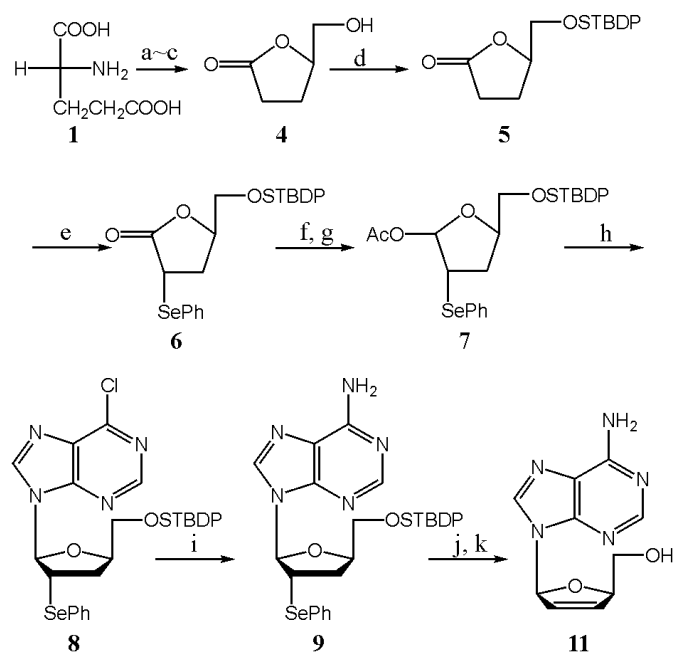
* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 27 - 83662578, E-mail: linjusheng2001@163.net

inhibited in a dose-dependent manner. EC_{50} $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The experiment of cytotoxicity gained IC_{50} $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. **Conclusion** β -L-D4A has been synthesized successfully. β -L-D4A possessed potent inhibitory effect on replication of HBV *in vitro* with low cytotoxicity, TI value was 1 000. It is expected to be developed clinically into a new anti-HBV drug.

Key words: Nucleoside analogue; β -L-D4A; chemical synthesis; hepatitis B virus

近年来,核苷类化合物已成为抗乙肝病毒(HBV)类药物的研究新热点^[1],以拉米呋啶(3TC)为代表的2',3'-二脱氧核苷(DDNs)在抗HBV治疗方面所起的作用引起了极大的关注,它们通过选择性作用于病毒聚合酶,展现出强抗病毒复制作用和低毒性反应^[2,3]。

本文以D型谷氨酸为原料,化学合成了新的核苷类化合物 β -L-D4A,合成路线见图1,其化学结构不同于3TC,其碱基不是C(胞嘧啶),而是A(腺嘌呤)。糖链2,3碳原子间呈双键结构。2.2.15细胞培养中,显示了明显的抑制HBV DNA复制活性,而且无明显细胞毒性,有望开发为新一类抗HBV药物。



(a) NaNO_2 , H_2SO_4 , $-5 \sim 0^\circ\text{C}$; (b) TsOH , $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$, refluxed; (c) NaBH_4 , rt; (d) TBDPSCl , imidazole, DMF , rt; (e) LiHMDS/THF , Ar, -78°C ; TMSCl , rt, PhSeBr , Ar, -78°C ; (f) DIBAL-H , toluene (dry), Ar, -78°C ; (g) Ac_2O , DMAP , CH_2Cl_2 , 0°C ; (h) 6-chloropurine, HMDSA , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, TMSOTf , $\text{ClCH}_2\text{CH}_2\text{Cl}$, -22°C ; (i) $\text{NH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$, in steel bomb, 80°C ; (j) H_2O_2 , $\text{Py}/\text{CH}_2\text{Cl}_2$, 0°C ; (k) TBAF/THF

Figure 1 Synthesis of nucleoside, β -L-D4A

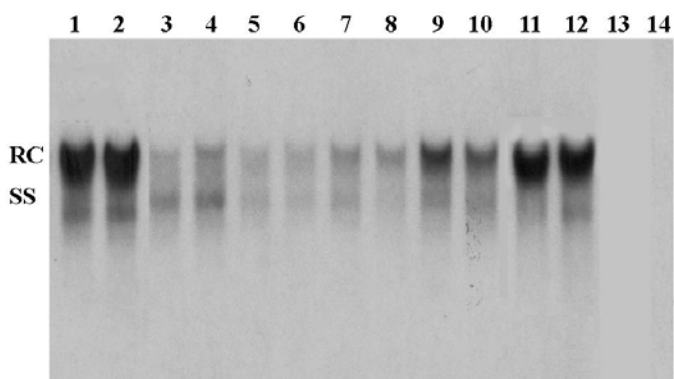
结果

1 β -L-D4A的合成

以D-谷氨酸为起始原料,合成了 β -L-D4A,用元素分析、红外光谱、氢核磁共振和质谱确证了结构。

2 β -L-D4A抑制HBV DNA的复制

细胞外HBV DNA印迹结果显示(图2),呈现明显的量效关系,计算机图象处理分析,以不加药空白对照组的游离HBV DNA灰度计为1,量出各组的灰度值,再求出HBV DNA抑制百分率,并划出浓度与抑制率关系曲线,最后分析出 EC_{50} 为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞内HBV DNA印迹结果相类似(图3)。



1, 2: Negative control; 3, 4: Lamivudine $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5, 6: β -L-D4A $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 7, 8: β -L-D4A $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 9, 10: β -L-D4A $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 11, 12: β -L-D4A 0.08 ; 13, 14: HepG₂ control

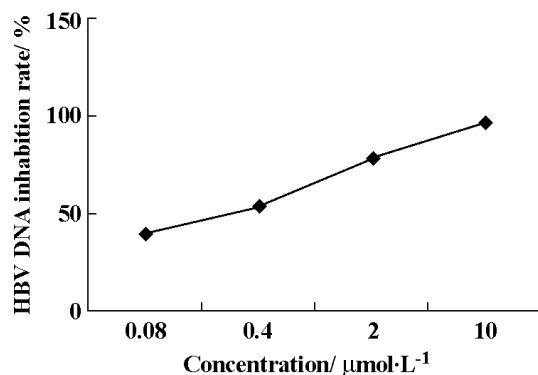


Figure 2 Inhibition of replication of extracellular HBV DNA by β -L-D4A

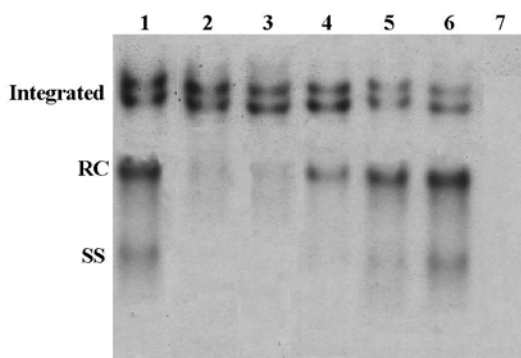


Figure 3 Inhibition of replication of intracellular HBV DNA by β -L-D4A. 1: Negative control; 2: Lam ivudine; 3: β -L-D4A $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 4: β -L-D4A $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 5: β -L-D4A $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 6: β -L-D4A 0.08 ; 7: HepaG2 control

3 细胞毒性检测

结果如表 1, 计算出 IC_{50} 为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

Table 1 Dosage-activity relationships of inhibition of cell growth by β -L-D4A ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Dosage/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	A	Inhibition rate/%
50	0.84 ± 0.22	22.3
100	0.75 ± 0.16	36.0
150	0.73 ± 0.12	37.2
200	0.67 ± 0.21	50.4
250	0.53 ± 0.15	73.5
300	0.43 ± 0.25	89.2
0	2.01 ± 0.23	0

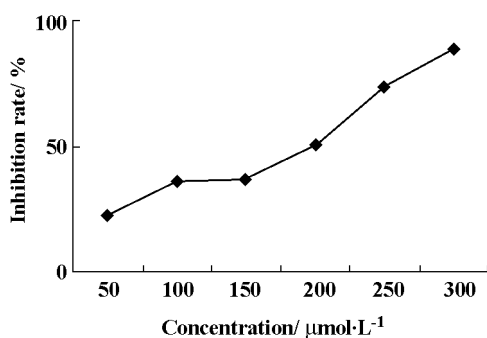


Figure 4 Effect of β -L-D4A on the curve of cell growth

讨论

拉咪呋啉在长期应用过程中出现了病毒变异和耐药, 以及停药反跳等问题, 为新的核苷类化合物的开发提出了迫切的需要^[4]。

作者在国内首次合成了新的核苷类似物 β -L-D4A, 是以 D-谷氨酸为原料经过基团的保护、还原、

取代等反应, 在糖基的 2', 3' 位进行双脱氧、双脱氢而得到, 其化学名为 2', 3' 双脱氧、双脱氢腺苷。

β -L-D4A 的量效关系研究显示, β -L-D4A 处理后, 细胞培养上清液中 HBV DNA 得到明显的抑制, 并呈现明显的剂量依赖性, 细胞内 HBV DNA 显示相似的结果, 利用图象处理软件 ImageTool(IT) 3.0 进行灰度分析得 EC_{50} 为 $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。同 Lam ivudine 相比较, β -L-D4A 具有相似的高效抑制 HBV DNA 复制作用。细胞毒性实验显示, 治疗剂量无明显细胞抑制作用, 超大剂量实验获得 50% 细胞抑制浓度, 即 IC_{50} 为 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。治疗指数 (the rapeutic index, TI) = $\text{IC}_{50} / \text{EC}_{50}$, β -L-D4A 的 TI 为 1 000。以往实验报道 lam ivudine 的 TI 为 750。可见, β -L-D4A 如同 lam ivudine 具有强效抑制 HBV 病毒复制作用, 并具有更高的治疗指数。

β -L-D4A 抑制病毒的机制尚待研究, 可能同样作用于 DNA 的复制始动或延伸过程, 与 lam ivudine 的化学结构相比较, β -L-D4A 的碱基是腺嘌呤 (A), 而不是胞嘧啶 (C); 糖基中具有双键结构, 因此, 其抑制 HBV 复制的机制可能有所不同。作为新一类核苷类化合物的出现, β -L-D4A 可望成为更有效的抗 HBV 类药物, 可望对 lam ivudine 耐药或存在病毒变异株的患者有效, 亦有望联合用药提高疗效或缩短用药疗程, 并减少变异株与耐药株的出现^[5-7]。

实验部分

熔点用 XT-400 熔点测定仪测定, 温度计未校正。¹H NMR 用 Varian Mercury VX-300 (300 MHz) 核磁共振仪测定, 样品用氘代有机溶剂溶解、TMS 为内标; IR 用 170-SX-FT-IR 红外光谱仪测定, KBr 压片; EA 用 Flash EA 1112 元素分析仪测定; MS 用 ZAB-HS (FAB) 质谱仪测定; 旋光值用 Perkin-Elmer 341 Polarimeter 旋光仪测定。D-Glutamic acid (D-谷氨酸)、 NaBH_4 (硼氢化钠)、TBDPSC (氯化叔丁基二苯基硅烷)、imidazole (咪唑)、LiHMDS/THF (六甲基二硅氨基锂的 THF 溶液)、 TMSCl (三甲基氯硅烷)、PhSeBr (溴化苯硒)、DIBAL-H (二异丁基氢化铝)、HMDSA (六甲基二硅胺)、6-Chloropurine (6-氯嘌呤)、 TMSOTf (三甲基硅氧烷基三氟甲磺酸) 和 DMAP 等试剂均为 Acros Organics 试剂, 购于中国百灵威化学技术有限公司。其他试剂和溶剂均为分析纯, 购于上海化学试剂公司。

1 R-(-)- γ -(叔丁基二苯基硅氧甲基)- α -苯硒基- γ -丁内酯 6

在氩气保护下,向盛有 *R*-(-)- γ -羟甲基- γ -丁内酯 4^[8] (15 g, 129 mmol) 的干燥 DMF (150 mL) 溶液中加入 21.13 g (310 mmol) 咪唑, 搅拌溶解并缓慢加入 39.00 g 氯化叔丁基二苯基硅烷 (142 mmol)。反应混合物在室温下搅拌反应 3 h, 减压蒸出 DMF, 残留物溶于 CHCl₃ (250 mL) 中, 依次用盐酸、水洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩, 残留物经硅胶柱色谱分离, 用正己烷洗脱, 得一白色结晶物 *R*-(-)- γ -(叔丁基二苯基硅氧甲基)- γ -丁内酯 (5, 40 g, 78%), mp 75 ~ 77 °C。¹H NMR (CDCl₃, δ): 0.90 (s, 9H, 3 × CH₃), 2.07 ~ 2.25 (m, 2H, 2-H), 2.33 ~ 2.64 (m, 2H, 3-H), 3.47 (dd, *J* = 3.3, 12 Hz, 1H, 5-H_a), 3.62 (dd, *J* = 3.3, 12 Hz, 1H, 5-H_b), 4.55 ~ 4.79 (m, 1H, 4-H), 7.13 ~ 7.65 (m, 10H, 2 × Ph)。

在 -78 °C、氩气流的条件下, 在 10 min 内将 1 mol·L⁻¹ 六甲基二硅氨基锂的 THF 溶液 (64.0 mL, 64.0 mmol) 加入到 5 的干燥 DMF (20 g, 56.5 mmol, 100 mL) 溶液中。反应混合物在 -78 °C 下搅拌 1.5 h 后, 加入 7.67 g 三甲基氯硅烷 (70.6 mmol), 缓慢升温至室温, 并继续搅拌 2 h。然后让反应液再降至 -78 °C, 加入溴化苯硒 (20.00 g, 84.7 mmol) 的无水 THF (100 mL) 溶液, 并保持在此温度下搅拌至黑褐色消失。最后向反应液中加入乙醚 200 mL, 水洗至醚层呈淡黄色, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。残留物经硅胶柱色谱分离, 用石油醚 ~ 7% 乙酸乙酯-石油醚梯度洗脱, 得化合物 6 (14.39 g, 53%)。[α]_D²⁵ - 32.15° (*c* = 1, CHCl₃); ¹H NMR (CDCl₃, δ): 0.90 (s, 9H, 3 × CH₃), 2.24 ~ 2.35 (m, 1H, 3-H_a), 2.64 ~ 2.75 (m, 1H, 3-H_b), 3.68 (dd, *J* = 3.3, 12 Hz, 1H, 5-H_a), 3.85 (dd, *J* = 3.3, 12 Hz, 1H, 5-H_b), 4.12 (dd, *J* = 4.5, 9.3 Hz, 1H, 2-H), 4.33 ~ 4.38 (m, 1H, 4-H), 7.10 ~ 7.93 (m, 15H, 3 × Ph)。

2 6-氯-9-[5-O-(叔丁基二苯基硅基)-2,3-二脱氧-2 α -苯硒基-L核糖]-9H-嘌呤 8

在 -78 °C、氩气流的条件下, 在 15 min 内将 1 mol·L⁻¹ 二异丁基氯化铝甲苯溶液 (43.00 mL, 43.00 mmol) 加入到 13.68 g 6 (26.9 mmol) 的甲苯溶液 150 mL 中, 然后将反应液缓慢升至室温, 并在室温下反应 45 min, 用甲醇 10 mL 终止反应。反应液用乙酸乙酯 150 mL 稀释, 依次用饱和酒石酸钠、水、饱和盐水洗, 无水硫酸钠干燥, 过滤, 浓缩。残留物依次加入 CH₂Cl₂ 100 mL, 13.89 g 吡啶、5 mg DMAP 和 7.17 g 乙酸酐, 在 0 °C 反应 2 h。反应液浓缩, 残留物即为化合物 1-乙酰基-2 α -苯硒基-5-O-

(叔丁基二苯基硅基)-L-2,3-二脱氧核糖 7 (13.03 g)。由于 7 不稳定, 故未进行分离, 直接进行下面实验。

向反应瓶中加入 4.8 g 6-氯嘌呤 (31.1 mmol)、0.12 g 硫酸胺和六甲基二硅胺 100 mL, 在氩气保护下加热回流, 直至反应液变成澄清溶液 (约 2 h)。反应液冷却, 静置过夜, 有结晶析出。在无水无氧的条件下, 将过量的六甲基二硅胺烷转移出反应体系, 在逆氩气流条件下加入干燥的 1,2-二氯乙烷 (120 mL) 和 12 g 7 (21.6 mmol) 的 1,2-二氯乙烷溶液。将反应液冷却至 -22 °C, 加入三甲基硅氧烷基三氟甲磺酸 (TMSOTf, 6.0 mL, 31.1 mmol), 10 min 加完, 并在 -22 °C 条件下搅拌 15 min。将反应液温度升至室温, 15 h 后, TLC 监测, 发现反应完成, 将反应液倾入乙酸乙酯 1 000 mL 中, 加入饱和 NaHCO₃ 50 mL, 搅拌 30 min。有机层用饱和 NaHCO₃ 洗涤, 无水硫酸钠干燥, 过滤浓缩。残留物经硅胶柱分离, 用 15% 乙酸乙酯-石油醚洗涤, 得产物 8 (3.08 g, 12%)。mp 112 ~ 114 °C; [α]_D²⁵ - 23.64° (*c* = 1, CH₃OH); ¹H NMR (CDCl₃, δ): 0.87 (s, 9H, 3 × CH₃), 2.24 ~ 2.33 (m, 1H, 3'-H_a), 2.67 ~ 2.79 (m, 1H, 3'-H_b), 3.50 ~ 3.73 (m, 1H, 5'-H_a), 3.85 ~ 3.94 (m, 1H, 5'-H_b), 4.07 ~ 4.12 (m, 2'-H), 4.33 ~ 4.38 (m, 1H, 4'-H), 5.74 (s, 1H, 1'-H), 7.10 ~ 7.93 (m, 15H, 3 × Ph), 8.15 (s, 1H, 8-H), 8.59 (s, 1H, 2-H)。

3 β -L-(2',3'-二脱氧-2',3'-二脱氢核糖)腺苷 (β -L-D4A) 11

将 2.50 g 化合物 8 (3.87 mmol) 溶解于氩气饱和的甲醇 300 mL 中, 加入到不锈钢压力罐中, 密封, 加热至 80 °C, 反应 16 h, 然后冷却反应液, 蒸去溶剂。残留物经硅胶柱分离, 用乙酸乙酯-石油醚 (1:1) 洗脱, 得产物 9 (0.93 g, 37%)。mp 119 ~ 121 °C。

将 0.78 g 化合物 9 (2.37 mmol) 溶于 CH₂Cl₂ 15 mL, 并加入催化量的吡啶, 在冰水浴、迅速搅拌条件下, 滴加 15% H₂O₂ 4.5 mL, 20 min 加完。反应由 TLC 监测, 展开剂为 CH₂Cl₂-MeOH (9.5:0.5); 当反应原料斑点消失后, 让反应温度升至室温, 反应液在室温下继续搅拌 0.5 h, 用 CH₂Cl₂ 稀释, 水洗, 无水硫酸钠干燥。蒸去溶剂, 残留物经硅胶柱分离, 用 CHCl₃ 和 3% MeOH-CHCl₃ 洗脱, 得化合物 5'-O-(叔丁基二苯基硅基)- β -L-(2',3'-二脱氧-2',3'-二脱氢核糖)腺苷 10 (0.43 g, 61%)。mp 154 ~ 156 °C。

将化合物 10 (0.3 g, 0.638 mmol) 溶于 THF (10 mL) 中, 加入 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBAF/THF 溶液 0.8 mL。反应液在室温下搅拌 3 h, TLC 监测, 反应原料消失。除去溶剂, 残留物经硅胶柱色谱分离, 用 10% MeOH- CHCl_3 洗脱, 得一白色固体, 即化合物 11 β -L-D4A (70 mg, 67%)。mp 179 ~ 181 $^{\circ}\text{C}$; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ - 26.87 $^{\circ}$ ($c=1$, CH_3OH)。元素分析: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{N}_5\text{O}_2$, 实测值 (%): C 51.72, H 4.85, N 29.79; 计算值 (%): C 51.50, H 4.76, N 30.03。IR (KBr 压片, cm^{-1}): 3 480, 3 337, 3 092, 2 974, 2 886, 1 679, 1 085。 ^1H NMR ($\text{DMSO}-d_6$, δ): 3.62 (t, $J=4.5$ Hz, 2H, 5'-H), 4.72 ~ 4.83 (m, 1H, 4'-H), 6.10 (m, 1H, 2'-H), 6.52 (m, 1H, 3'-H), 6.93 (m, 1H, 1'-H), 8.15 (s, 1H, 8-H), 8.16 (s, 1H, 2-H)。MS (FAB, m/z): 233 (M^+)。

4 生物活性部分

4.1 材料和试剂 Lamivudine, ddC 由美国 Yale 大学药学院提供。 ^{32}P -dCTP 购于北京亚辉公司; HBV DNA 探针由本实验室保存; MTT 为瑞士 Fluka 公司产品。2.2.15 细胞系由美国 Yale 大学医学院 Cheng 博士惠赠。HepG2 细胞购于武汉大学细胞保存中心。

4.2 细胞培养及 β -L-D4A 的应用 2.2.15 细胞接种于 12 孔板, 细胞数为 5×10^4 个/孔, 加于培养液 1 mL/孔, 培养液含胎牛血清 10%、青霉素 100 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、链霉素 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。接种后 d 3, 换用含药培养液, 每个药物浓度点设 2 或 3 个平行孔, 同样条件下培养 9 d, 每 3 d 换含药培养基 1 次。以拉咪呋啶为阳性对照组, 浓度为 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 设立阴性对照组, 不加药物培养。HepG2 细胞作为空白对照。于 d 12 回收全部细胞及上清液。上清液 HBV DNA 抑制百分率为:

$$\frac{\text{阴性对照 RC DNA} - \text{药物处理样本 RC DNA}}{\text{阴性对照 RC DNA}} \times 100\%$$

4.3 DNA 的提取 上清液 PEG 沉淀, 再裂解液悬浮、孵育, 最后用酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀得上清液 HBV DNA; 吸取上清液后, 每孔加入裂解液裂解, 消化 4 h, 再用酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀得细胞内总核酸, RNase A 处理 1 h, 最后加入醋酸氨, 乙醇沉淀得细胞内总 DNA。

4.4 Southern 印迹检测 上清、细胞内抗 HBV 作用上清及细胞内 DNA (后者经过内切酶 Hind III 消化

后) 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 尼龙膜印迹, ^{32}P 标记 HBV DNA 探针杂交, $2 \times \text{SSC}/0.2\%$ SDS 室温 1 h 及 $0.1 \times \text{SSC}/0.2\%$ SDS 50 $^{\circ}\text{C}$ 4 h 洗膜, 放射自显影, 显影条带经计算机图像处理系统进行定量分析, 并计算出 EC_{50} 。

4.5 细胞毒性检测 2.2.15 细胞接种于 24 孔培养板, 细胞密度 5×10^3 , 24 h 后换用含不同浓度 β -L-D4A 培养基处理, 每个浓度点设 3 个平行孔, 3 d 后回收细胞, 用 MTT 比色法分析检测细胞吸收度, 与对照孔的吸收度 (存活细胞 100%) 比较, 计算存活细胞百分比, 并计算出 IC_{50} 。

References

- [1] Freiman JS, McCaughan GW. Current limitations to nucleoside analogue therapy for chronic hepatitis B virus infection in the liver transplant and non-transplant settings [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(3): 227 - 229.
- [2] Ru X, Zhou P, Cui LX, et al. Differential effects of antiretroviral nucleoside analogs on mitochondrial function in HepG2 cells [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(3): 496 - 503.
- [3] Moyle GJ. Current knowledge of HIV-1 reverse transcriptase mutations selected during nucleoside analogue therapy: the potential to use resistance data to guide clinical decisions [J]. *J Antimicrob Chemother*, 1997, 40(6): 765 - 777.
- [4] Pillay D, Taylor S, Richman DD. Incidence and impact of resistance against approved antiretroviral drugs [J]. *Rev Med Virol*, 2000, 10(4): 231 - 253.
- [5] Knaus EE, Parang K, Wiebe LI, et al. *In vitro* anti-hepatitis B virus activities of 5"-O-myristoyl analogue derivatives of 3"-fluoro-2", 3"-dideoxythymidine (FLT) and 3"-azido-2", 3"-dideoxythymidine (AZT) [J]. *J Pharm Pharm Sci*, 1998, 1(3): 108 - 114.
- [6] Fu L, Liu SH, Cheng YC. Sensitivity of L-(-) 2, 3-dideoxythiacytidine resistant hepatitis B virus to other antiviral nucleoside analogues [J]. *Biochem Pharmacol* 1999, 57(12): 1351 - 1359.
- [7] Perigaud C, Gosselin G, Girardet JL, et al. The S-acyl-2-thioethyl pronucleotide approach applied to acyclovir: part I. Synthesis and *in vitro* anti-hepatitis B virus activity of bis (S-acyl-2-thioethyl) phosphotriester derivatives of acyclovir [J]. *Antiviral Res*, 1999, 40(3): 167 - 178.
- [8] Herdeis C. Chiroselective synthesis of (S)-(+)- and (R)-(-)-amino-4-hydroxypentanoic acid from L- and D-glutamic acid via (S)-(+)- and (R)-(-)-5-hydroxy-2-oxopiperidine [J]. *Synth Commun*, 1986, (3): 232 - 233.