

- ral benefit of combination therapy with lamivudine and famciclovir against WHV replication in chronic WHV carrier woodchuck[J]. *Antiviral Res* ,2000 ,45(1):19 - 32.
- [5] Suzuki T , Takehara T , Ohkawa K , *et al.* Intravenous injection of naked plasmid DNA encoding hepatitis B virus (HBV) produces HBV and induces humoral immune response in mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun* , 2003 , 300(3):784 - 788.
- [6] Giladi H , Ketzinel-Gilad M , Rivkin L , *et al.* Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice[J]. *Mol Ther* , 2003 , 8(5):769 - 776.
- [7] Galun E , Nahor O , Eid A , *et al.* Human interleukin-6 facilitates hepatitis B virus infection *in vitro* and *in vivo*[J]. *Virology* , 2000 , 270(2):299 - 309.
- [8] Julander JG , Sidwell RW , Morrey JD. Characterizing antiviral activity of adefovir dipivoxil in transgenic mice expressing hepatitis B virus[J]. *Antiviral Res* , 2002 , 55(1):27 - 40.
- [9] Julander JG , Colonno RJ , Sidwell RW , *et al.* Characterization of antiviral activity of entecavir in transgenic mice expressing hepatitis B virus[J]. *Antiviral Res* , 2003 , 59(3):155 - 161.
- [10] Wang Y , Cui F , Lv Y , *et al.* HBsAg and HBx knocked into the p21 locus causes hepatocellular carcinoma in mice[J]. *Hepatology* , 2004 , 39(2):2318 - 2324.
- [11] Schulze-Bergkamen H , Untergasser A , Dax A , *et al.* Primary human hepatocytes - a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol* , 2003 , 38(6):736 - 744.
- [12] Gripon P , Rumin S , Urban S , *et al.* Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2002 , 99(24):15655 - 15660.
- [13] Walters KA , Tipples GA , Allen MI , *et al.* Generation of stable cell lines expressing lamivudine-resistant hepatitis B virus for antiviral-compound screening [J]. *Antimicrob Agents Chemother* , 2003 , 47(6):1936 - 1942.
- [14] Wang JC , Hsu SL , Hwang GY. Inhibition of tumorigenicity of the hepatitis B virus X gene in Chang liver cell line[J]. *Virus Res* , 2004 , 102(2):133 - 139.

新型磷酸核苷类抗病毒药物

温晓雪, 彭 涛编译 王 林审校

(军事医学科学院放射医学研究所, 北京 100850)

摘要:自从发现(S)-羟基磷酰甲氧基丙基腺嘌呤对 DNA 病毒表现出广谱抗病毒作用以来,人们对磷酸核苷的抗病毒作用进行了广泛的研究。磷酸核苷抑制病毒的复制不同于其他核苷类药物的作用方式,它通过细胞内代谢产生活化态。虽然磷酸核苷表现出广谱的抗病毒活性,但由于磷酸基团带有负电荷使其细胞通透性和口服生物利用度较低,因而必须利用前药方法掩饰其负电荷。目前,已有 3 种该类药物上市,还有 2 种药物处于临床试验阶段。

关键词:磷酸核苷;二磷酸盐;抗病毒药

中图分类号:R978.7 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2004)06-0369-04

1 磷酸核苷类药物的结构特点和作用机制

磷酸核苷是应用广泛的广谱抗病毒药物,部分药物还具有抗肿瘤活性。磷酸核苷可以视为带有磷酸的核苷,核苷类抗病毒药物必须在细胞内被病毒和细胞激酶三磷酸化后才具有抗病毒活性。因此,细胞内的一、二和三磷酸盐的浓度可能与其抑制病毒复制的效果有关。例如,随着酯酶将核苷一磷酸盐水解成核苷速率的增加,其抗病毒作用降低。磷

酸核苷的磷原子和碳原子之间有很强的共价键,因而可以抵抗酯酶的水解作用。此外,磷酸核苷绕过了一磷酸化过程,而这是核苷药物被病毒或宿主细胞激酶转变成其活性代谢产物三磷酸盐的关键的过程。(S)-9-(2',3'-二羟丙基)腺嘌呤[(S)-DHPA]是一个脂肪族无环核苷类似物,对多种 DNA 和 RNA 病毒表现出广谱的抗病毒活性。然而(S)-DHPA 一磷酸酯在体内没有显著的生物活性。(S)-9-(3-羟基-2-磷酰甲氧基)腺嘌呤[(S)-HPMPA]是第一个为防止细胞内酯酶的去磷酸化作用而设计合成的磷

酸核苷。(S)-DHPA 一磷酸盐中脆弱的磷酸酯键 $[-CH_2-O-P(O)(OH)_2]$ 被 (S)-HPMPA 中强的磷酸甲氧酯键 $[-O-CH_2-P(O)(OH)_2]$ 所代替。(S)-HPMPA 对 DNA 病毒显示出有效的选择性抑制作用,如单纯疱疹病毒-1(HSV-1)和 HSV-2 ($EC_{50} = 1 \sim 3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、水痘带状疱疹病毒(VZV, $EC_{50} = 2 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、人巨细胞病毒(HCMV, $EC_{50} = 150 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)和 HSV-1 的 TK⁻ 突变型病毒($EC_{50} = 0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。然而(S)-HPMPA 在大于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量下对正常宿主细胞的代谢作用无影响。

核苷类药物包括无环核苷必须在细胞内磷酸化成它们的活性代谢物三磷酸盐才表现出抗病毒活性。三磷酸盐在病毒 DNA 或 RNA 延长阶段与其结合终止了病毒 DNA 或 RNA 的合成,从而抑制了病毒的复制。无环核苷药物如阿昔洛韦、更昔洛韦和喷昔洛韦对带状疱疹病毒、VZV 和 HCMV 等 DNA 病毒有活性。首先由 HSV/VZV 编码的胸苷激酶或 HCMV 编码的蛋白激酶进行磷酸化形成其一磷酸盐,随后由宿主细胞激酶完成二、三磷酸化,生成其活化态三磷酸盐。对于逆转录病毒(HIV)和肝 DNA 病毒(HBV),由于其没有病毒编码的激酶,因而齐多夫定(AZT, 抗 HIV 药物)或拉米夫定(3TC, 抗 HIV 和抗 HBV 药物)的三步磷酸化过程均由宿主细胞激酶(如核苷激酶、核苷 5'-一磷酸激酶或 5'-二磷酸激酶)完成。与核苷相比,磷酸核苷省略了第一步的磷酸化过程,最后两步磷酸化过程由宿主细胞激酶完成。由于跳过了第一步的磷酸化,(S)-HPMPA 对野生型和突变型 TK⁻ HSV 和 TK⁻ HCMV 都显示出相同的抗病毒活性。由于缺少特有的胸苷激酶或蛋白激酶,突变型病毒无法将无环核苷转变成其一磷酸盐,因而它们具有抵抗无环核苷药物(阿昔洛韦、喷昔洛韦、更昔洛韦和前药)的作用。

(S)-西多福韦((S)-HPMPC)的作用方式略不同于阿德福韦(PMEA)。两个化合物都代谢成它们的二磷酸盐,然后与病毒 DNA 结合。(S)-HPMPC 被嘧啶核苷一、二磷酸激酶转变成(S)-HPMPC-pp。(S)-HPMPC-pp 与病毒 DNA 结合,也可转变为(S)-HPMPC-p 胆碱,其功能可看作(S)-HPMPC 在细胞内的储存器。这是(S)-HPMPC 在体内抗病毒作用持续时间较长的原因。

而现在还不清楚 PMEA 是怎样转变成其活性代谢物 PMEA-pp 的,虽然这可能包括两种途径:涉及

一磷酸酯酶(AMP 激酶)的两步过程或涉及 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸盐合成酶(PRPP 合成酶)的一步过程。PMEA-pp 通过逆转录酶与逆转录病毒结合,其与核苷三磷酸盐 AZT-ppp 和司他夫定-ppp(d4T-ppp)相比有较长的半衰期。这是 PMEA 对逆转录病毒有较长作用效果的原因。

2 对磷酸核苷药物(S)-HPMPA 和 PMEA 的化学修饰

(S)-HPMPA 和 PMEA 的广谱抗病毒活性使药物化学家着手合成 2' 位修饰的类似物并测定其抗病毒活性。虽然磷酸甲氧基乙基鸟嘌呤(PMEG)对多种病毒表现出良好的抑制活性,但它也显示出严重的细胞毒性($CC_{50} = 0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。2'-甲基磷酸甲氧基乙基类似物((R)-磷酸甲氧基丙基类似物)对 HIV 和 HBV 表现出良好的抗逆转录病毒活性,且毒性较弱。(R)-磷酸甲氧基丙基鸟嘌呤(PMPG)显示出有效的抗 HIV 活性($EC_{50} = 1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 350 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),对 HCMV 和 HSV 也有一定活性($EC_{50} = 16$ 和 $82 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。(R)-磷酸甲氧基丙基腺嘌呤((R)-PMPA)抑制 HIV 复制效果明显($EC_{50} = 0.04 \sim 5.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),没有显著的细胞毒性($CC_{50} > 300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。PMPA 用亲脂基团掩盖其磷酸二价阴离子转变成口服前药 PMPA DF。

对(S)-HPMPC 和 PMEA 的电子等排物进行了广泛的研究以确定抗病毒活性的结构限制。嘌呤和磷酸甲氧基之间不同碳链长度的变化表明,两个碳原子的抗 HSV-1, HSV-2 和 HIV-1 的活性最佳。用碳或硫原子替换 3' 位的氧,导致抗 HSV 和抗 HIV-1 活性降低。在烷基链上引入双键显著降低了对 HIV 和 HSV 的抗病毒活性。另外,d4T 一磷酸盐的电子等排物与 d4T 相比表现出有效的抗 HIV 活性。更昔洛韦一磷酸盐的电子等排物与 PMEG 相比,显著减少了抗 HSV-1, HSV-2 和 HCMV 的活性。

与 PMEA 和 (S)-HPMPA 相比,PMPG 和 (S)-羟基磷酸甲氧基丙基鸟嘌呤((S)-HPMPG)对 DNA 逆转录病毒显示出有效的抗病毒活性,但它们对宿主细胞有高的细胞毒性。为了减少细胞毒性而保留其抗病毒活性,合成了 PMEG 和 (R)-PMPG 的 8-氮杂类似物并评价了其抗 HIV-1 和 HIV-2 的效果。磷酸甲氧基乙基(PME)和 (R)-磷酸甲氧基丙基((R)-PMP)的 8-氮杂鸟嘌呤类似物表现出低的抗病毒活性。8-氮杂鸟嘌呤类似物表现出改善的细胞毒性,但抗病

毒性同时降低。

3 运用前药策略对磷酸核苷类药物进行改造

克服磷酸核苷细胞通透性低和口服生物利用度低的缺点,包括采用掩饰磷酸功能基的负电荷,在靶点释放原药。前药应该有适宜的稳定性并在胃肠道中有适当的耐久性。PMEA 和(S)-HPMPC 由于其 pK_a 值较低,在生理 pH 值条件下都为二价阴离子,因此磷酸的二价阴离子导致低的细胞通透性和低的口服生物利用度,限制了这些药物在慢性疾病如 HIV 和 HBV 中的应用。

设计与合成可口服的前药以增加肠内的吸收。用大鼠评价了一系列 PMEA 前药的口服生物利用度。虽然二(烷基)PMEA 提高了约 40% 的口服生物利用度,但前药不完全转化成原药使其体内功效较低。在大鼠中二(酰氯)烷基)PMEA 比原型药物 PMEA 的口服生物利用度增加了 17%,口服前药被完全转化成游离的 PMEA。PMPA 由于相同的原因在动物中表现出低的口服生物利用度。口服 PMPA 碳酸酯前药在狗体内的口服生物利用度为 20% ~ 30%,没有发现与 PMPA 不同的代谢物。PMPA 甲基氨基甲酸酯前药的口服生物利用度为 8.8%,有 10% 的前药保持原型。甲基氨基甲酸酯前药在生理条件下很稳定,在合适的时间内不能完全代谢成原药,结果降低了体内的效果。

4 最近开发的磷酸核苷药物

最近,两个新的磷酸核苷药物 MCC-478 和 LB-80380 进入了治疗 HBV 感染的临床试验阶段。MCC-478 设计目的是减少 PMEG 严重的细胞毒性($CC_{50} = 6.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,在 HB611 细胞),将硫代芳基引入 PMEG 鸟嘌呤环的 6 位保留了抗 HBV 活性并改变了毒理。另外,磷酸的二价阴离子被二(2,2,2-三氟乙基)掩饰以增加口服生物利用度。MCC-478 及其相关化合物显示出高的抗 HBV 活性和低细胞毒性。但在浓度达 $34 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 下仍没有显著的抗 HIV 和抗 HSV-1 活性。值得注意的是,MCC-478 的抗 HBV 活性比 PMEA 高 10 倍($IC_{50} = 0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),而且对不同的抗 3TC 突变体也有活性,尽管抗突变体的活性仅为抗野生毒株活性的 1%。一些二烷基的 PMEA 前药在体内不能转变成 PMEA,这些前药与 PMEA 相比降低了抗 HBV 的体内活性。MCC-478 在鼠和猴中除代谢成为游离的原药 F1 外

还产生两种主要的代谢产物 M1 和 M2。与 PMEA 烷基酯前药不同,代谢物 M1、M2 和 F1 表现出与 MCC-478 类似的抗 HBV 活性。因此,代谢物的抗 HBV 活性增加了 MCC-478 在体内的功效。对代谢和 MCC-478 的作用方式的进一步研究表明,其与 PMEA 不同,不需要细胞内的磷酸化来发挥抗 HBV 活性。

LB-80380 是一种新的抗 HBV 药物,目前正在进行 II 期临床试验。LB-80380 是 LB-80317[9-[1-(磷酰甲氧基环丙基)甲基]鸟嘌呤,PMCG]的口服活性前药,代表了一类新型的磷酸核苷药物,具有高效的、特异的和选择性的抗 HBV 活性。化合物 LB-80380 可有效地阻断 HEPG2.2.15 原始细胞的 HBV 复制($EC_{50} = 0.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在 $1.0 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下对几种人类细胞没有明显的细胞毒性,在浓度低于 $30 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时不能抑制 HIV-1 和 HIV-2 的复制。LB-80317 在体外对 HBV 的抑制活性是体内的 4 倍。LB-80317 是一个在 2' 位上有环丙烷取代的 PMEG。2' 位的环丙烷取代对 LB-80317 的整体构型起着关键的作用。LB-80317 非常高的抗 HBV 活性和治疗选择性可能与其构型有关。根据 X 射线结构显示,与 PMEG 相比,LB-80317 的鸟嘌呤与磷原子倾向于顺式排列。鸟嘌呤与磷原子之间的顺式排列与天然的鸟嘌呤核苷一磷酸酯的核糖环相似。LB-80317 的顺式结构可以使人体内的激酶有效地进行磷酸化而生成其活化形态 PMCG 磷酸盐。LB-80331[9-[1-(磷酰甲氧基环丙基)甲基]脱氧鸟嘌呤,PMCDG]的活性强于 LB-80317,这与 LB-80331 具有较高的细胞通透性有关。LB-80331 可能很容易通过细胞膜,在肝细胞内代谢为 LB-80317。同样,LB-80331 由于带有二价阴离子而显示出低的口服生物利用度。将 LB-80331 的磷酸用特戊酰氧甲基(dipivoxil)修饰得到口服前药 LB-80380。在大鼠、狗和猴中口服 LB-80380 后,在血浆中除原药 LB-80331 外未发现其他代谢产物,其生物利用度分别为 25%、64% 和 15%。在土拨鼠肝炎 B 病毒(WHBV)感染动物模型上口服 LB-80380,剂量分别为 5、15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,4 周后进行 LB-80380 体内效果的评价。LB-80380 在体内具有比 PMEA 二吡啶酸酯更好的效果,目前正进行 II 期临床试验。

5 结语

磷酸核苷类药物是一个为防止无环核苷一磷酸盐去磷酸化而进行药物设计的例子。其对 DNA 和

RNA 病毒表现出广谱的抗病毒活性。与核苷药物不同,它们绕过了一磷酸化过程,其活性的代谢物二磷酸盐终止了病毒的复制。一些二磷酸盐只与病毒 DNA 或 RNA 结合而与宿主细胞 DNA 不结合,因此具有治疗选择性。延长在体内的消除可以减少给药

频率而保持有效性。磷酸的二价阴离子引起的低口服生物利用度的缺点可以通过前药方法得到克服。新型的磷酸核苷是一类重要的药物,对磷酸核苷的研究有望发现更安全和治疗上更有效的抗病毒药物,特别是对丙型肝炎病毒感染有效的药物。

治疗用放射活性微球

刘永军¹ 编译 王玉丽² 校

(1. 北京市中西医结合医院药剂科,北京 100039; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所,北京 100850)

摘要:微球是实现药物控制释放和靶向给药的有效载体。在近几十年内,随着放射活性微球研发领域的理论和技术发展,放射性微球在各种癌症和肿瘤的治疗中已经获得成功的应用,成为癌症化疗和外部放疗的有效替代途径。实验证明,放射性同位素标记微球质量非常稳定,辐射剂量递送效率高,在体内能够靶向浓集于肿瘤部位,对正常组织损伤小。对肝癌、脾癌及风湿性关节炎均有良好的疗效,是一种极有前景的癌症治疗方法。

关键词:放射性微球;靶向递送;体内放疗

中图分类号:R944;R979.1 文献标识码:A 文章编号:1001-0971(2004)06-0372-03

为实现传统药物高效低毒的目的,新的胶质给药系统引起极大的关注,这类系统主要包括微球、脂质体、纳米粒等,其主要特点是可以使药物定向地递送到体内合适的器官或靶位而实现靶向递送,微球是其中重要的一种。微球是固态、近似球形的颗粒,粒径为 1~1000 μm。主要由可生物降解的合成聚合物或人工修饰的天然产物构成。在近几十年内,微球已经广泛用于多种疾病的治疗特别是各种癌症的治疗,包括放射性核素或同位素标记微球,即放射性微球。放射性微球在肿瘤和癌症治疗中起到放射栓塞作用,其优点是可以将高浓度的放射活性物质递送到靶区,且不会引起周围组织和器官的任何损伤。

1 放射性核素的选择

放射性核素的选择决定于需要治疗的器官/组织。在各种类型癌症治疗中,放射性核素的体内放疗是化疗和外部放疗等方法的有效替代途径。放射性核素一般要求无毒,易从体内消除,粒径大小满足静注要求,丰富的放射谱,标记过程简单,以及同位素从微球表面无泄漏。最常用的药用放射性物质是^{99m}Tc(^{99m}Tc)标记的化合物,^{99m}Tc具有理想的物

理性质,仅发射 γ 照相监测器范围内的 γ 射线,且半衰期为 6 h,限制了患者使用的放射剂量。其他重要的放射性同位素有钇(⁹⁰Y)、铼(¹⁸⁸Re)和钬(¹⁶⁶Ho)。

1.1 钇

⁹⁰Y 是铈-90 的衰变产物。通过⁸⁹Y(n,γ)也能得到。⁹⁰Y 是高能单纯 β 放射性同位素,半衰期为 64.1 h。β 粒子最大放射能为 2.27 MeV,在组织内最大放射范围是 11 mm。⁹⁰Y 主要有两个缺点(1)钇需要一个较长的中子活化时间(>2 周)来获得其治疗活性(2)因为⁹⁰Y 是一个纯 β 放射源,不能产生可成像的 γ 射线,故在临床研究中不能直接测定⁹⁰Y 的生物分布。

1.2 铼

铼的放射性同位素¹⁸⁸Re 和¹⁸⁶Re 具有相同的物理性质。¹⁸⁸Re 半衰期为 3.78 d,β 粒子最大放射能为 1.07 MeV,而¹⁸⁶Re 半衰期较短,为 17 h,β 粒子最大放射能为 2.12 MeV。这两个放射性同位素均产生可成像的 γ 射线。

1.3 钬

¹⁶⁶Ho 为通过天然丰度为 100% 的¹⁶⁵Ho 捕获一个中子的产物。¹⁶⁶Ho 半衰期为 26.83 h,最大衰变能量为 1.855 MeV,衰变时同时释放能量为 1.855 MeV β 粒子。它的物理性质决定它具有多种医学应用,例如,皮肤和肝恶性肿瘤、风湿性关节炎等的治疗。