

抗 HIV 和 HBV 病毒药物 L-Fd4C 及相关核苷类似物

胡清萍^① 赵康^② 陈曙辉^{②③*}

(^①山东大学化学与化工学院, 山东 250100; ^②天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072; ^③Vion Pharmaceuticals, Inc., Four Science Park, New Haven, CT 06511, USA. *联系人, E-mail: chen_shu-hui@lilly.com)

摘要 在抗病毒研究过程中, 核苷类型的 RT 抑制剂扮演着重要的角色. 从经典的 AZT 到 L-型核苷及至最近的磷酸前药, 人们一直都在核苷的结构上大做文章, 并逐渐认识到了 L-型核苷的重要性. 为了得到疗效更强、毒性更低的抗 HIV, HBV 药物, 新的发展方向是对已有疗效比较好的化合物进行单磷酸化, 使之能够在细胞内快速地变成三磷酸. 随之需要解决的新问题, 就是如何把磷酸盐变成中性的前药, 以便进入细胞, 然后在细胞内再变为有活性的磷酸盐. 讨论了几个 L-核苷类似物的研究工作, 对它们的合成、磷酸前药的研制方法、抗癌症的生物活性进行了描述.

关键词 核苷酸 前药 抗病毒

据统计, 自从艾滋病(AIDS)病毒开始传播蔓延一直到 1999 年末为止, 全球约有五千万人感染了 HIV 病毒. 现在, 艾滋病病毒在发展中国家正以惊人的速度继续蔓延着. 其中, 蔓延速度最快的当属东欧和亚洲地区, 另外约有 70% 的 HIV/AIDS 病毒的感染者寄居在非洲部分地区. 近来, 由于 HIV 病毒逆转录酶(RT)与蛋白酶抑制剂的发现, 使得艾滋病(AIDS)病毒感染者的死亡率有了明显的下降, 同时也增强了他们的生命周期. 尽管如此, 目前现有的治疗方法依旧面临着许多问题. 例如, 病毒的抗药性、药剂服用的不便性和药物的副作用. 这些问题使得研发新型抗 HIV 病毒药物, 依然是一件迫在眉睫的任务.

慢性肝炎的治疗和预防前景比较乐观. 其中, (HBV)病毒的疫苗起了很大的作用. 但是 HBV 病毒依旧是一个危急全世界健康状况的主要问题. 而且, 现有的干扰素疗法仅仅对少数病毒感染者有效. 最近通过认证的一种新型抗病毒药物核苷类似物, 拉米呋啶(3TC)在控制病毒的传播方面表现出了短期内的高效性. 但同时也发现, 长期使用拉米呋啶(3TC), 会增强病毒的抗药性. 幸运的是, 许多新型的核苷或核苷类似物都表现出了良好的抗 HBV 病毒的活性, 并且都得到了不同程度的发展.

本文简单地介绍几种核苷或核苷类似物在治疗 HIV 与 HBV 病毒方面的情况, 以及抗病毒药物的具体发展状况, 并主要针对一些核苷或核苷类似物的简单合成路线, 进行了分析和讨论.

自从 3'-脱氧-3'-叠氮胸苷(齐多呋啶, Zidovudine, AZT)被批准为首个治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)的

药物以来^[1], 人们在抑制 HIV 及其相关病毒复制的核苷类似物的设计合成方面做了大量的努力, 由此产生了一系列具有很强抗病毒活性的新型核苷类似物(图 1), 其中包括 2', 3'-双去氧胞苷(扎西他宾, Zalcitabine, D-ddC)^[2]、2', 3'-双去氧肌苷(去羟肌苷, Didanosine, D-ddI)^[3]和 2', 3'-双去氧-2', 3'-双去氢胸苷(司他呋啶, Stavudine, D-D4T)^[4]. 这些抗 HIV 核苷药物的共同靶点是病毒的逆转录酶(RT), 它是一种 HIV 复制所需的关键酶. 最近, RT 抑制剂碳环核苷(Abacavir)^[5]和一种 L-核苷类似物拉米呋啶(Lamivudine)^[6-8]被批准可以在治疗中联合使用, 共同抑制 HIV 感染. 2002 年, 一种无环核苷酸前药(Tenofovir Disoproxil Fumarate)获 FDA 批准上市, 应用于治疗 HIV 感染.

在乙型肝炎病毒(HBV)复制过程中, 关键的一步是需要一个病毒编码的逆转录酶(RT). 某些核苷类似物对于 HBV 的 RT 有抑制效力, 具有抗 HBV 的活性(或同时有抗 HBV 和 HIV 的活性). 许多核苷和核苷酸类似物在体外试验和土拨鼠的活体试验测定出具有抗 HBV 的活性. 通过许多努力, 许多化合物已被选用于临床(图 2). 最近, Lamivudine^[6]已通过了 FDA 批准应用于治疗 HBV 感染. 目前, FDA 对 Adefovir dipivoxil^[9-11]进行了审查, 同时, L-dT 也被选择为 HBV 的抑制剂, 该化合物在 HepG2 细胞中的 EC₅₀ 值为 190 nmol/L, 正处于 I/II 期临床试验中^[12]. L-dC 前药 3', 5'-双-缬氨酸利用率^[13,14]. 虽然, L-FMAU 在土拨鼠试验中已经被证明具有良好的效力, 但是该药物与 Lamivudine 相似, 在体外试验中, 针对

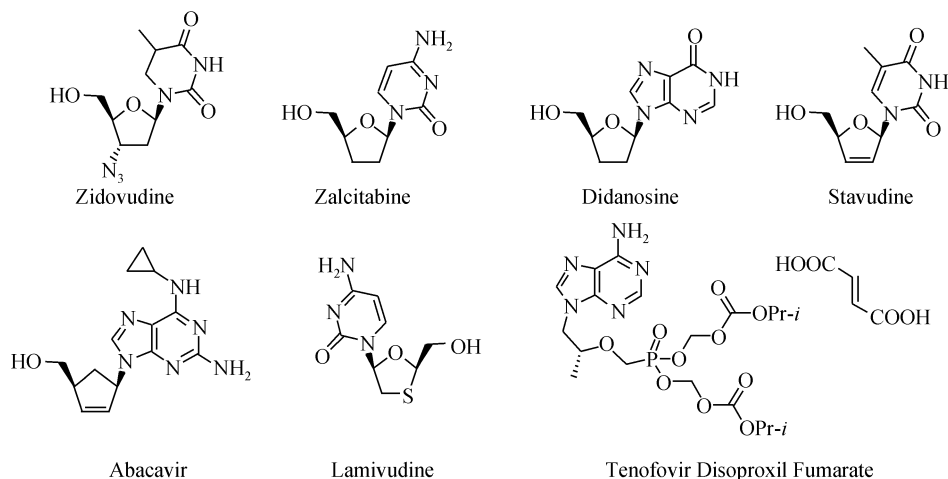


图1 已发现的 HIV 逆转录酶抑制剂

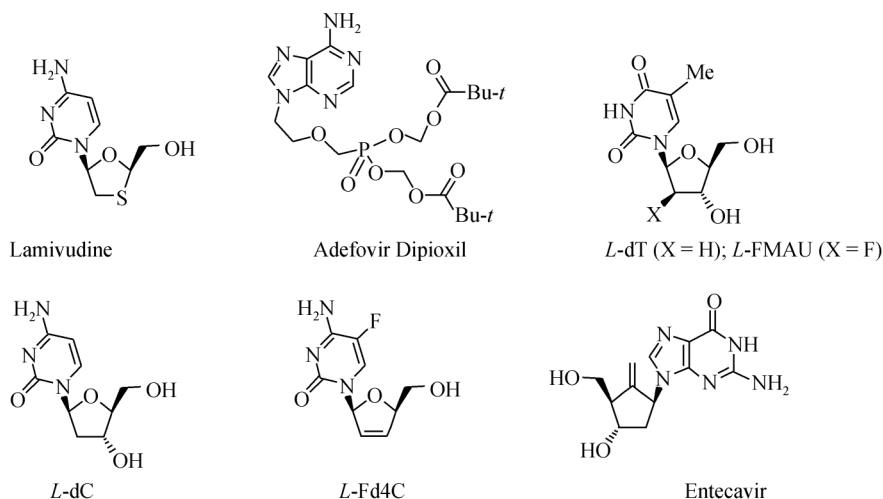


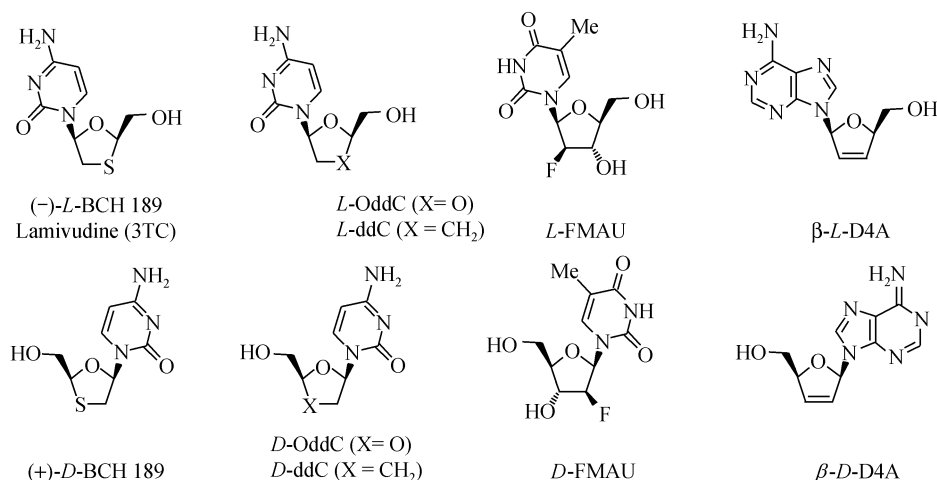
图2 已获批准认证的和有前景的抗 HBV 药物

L526M, M550I 和二重 M550V+L526M 的突变病毒, 并不具有活性^[15,16]. *L*-Fd4C 在土拨鼠试验中, 每天使用 4 mg/kg 就可以表现出连续的效力. 另外, I 期临床数据表明, 一日一次的剂量具有良好的生物口服利用率^[17]. Entecavir 在临床检验中表现出了高效抗病毒活性, 现正处于 III 期临床试验中^[18,19].

1 *L*-核苷酸的前景(与 *D*-核苷酸相比较)

试验证明, 大部分有前景的 HBV 药物均是 *L*-核苷. 最近, *L*-核苷已成为众多研究工作重点^[20~22], 人们期望 *L*-核苷能够被病毒编码酶或细菌酶而不是正

常的哺乳动物酶所辨认. 显而易见, 在 *L*-核苷方面所取得的成功已证明了这一假设的可行性. 例如, 一些 *L*-核苷被发现与细菌相关的酶相互作用^[23]. 最近, Spadari 等人报道, *L*-胸苷不被人类的胸苷激酶所辨认, 而是通过其所具有的特异性酶功能作用于 I 型单纯疱疹病毒(HSV-1)的病毒酶, 从而减少 Hela 细胞株中 HSV-1 的复制^[24]. 或许, *L*-核苷最令人吃惊的特点是它被细胞酶磷酸化, 形成三磷酸酯, 从而提供了各种抗病毒的生物活性. Maury 等人近来的报告证明, 除了胸苷激酶 I (TK1) 以外, 脱氧胞苷激酶(dCK)、胸苷激酶 II (TK2)、脱氧鸟苷激酶(dGK)不一定具有很强

图 3 具有代表性的 *D*-核苷和 *L*-核苷

的底物单一选择性和对映选择性^[25].

为了比较 *D*-核苷和 *L*-核苷的抗病毒活性和细胞毒性, 可以选择 5 对核苷, 分别是 3TC^[6~8], OddC^[26,27], ddC^[28], FMAU^[29,30]和 D4A^[31](图 3), 比较它们的生物活性(表 1). 其中 3TC 和 *L*-OddC 在抗 HIV 方面均表现出了卓越的活性(CEM), 其 EC₅₀ 值在 1.8~20 nmol/L 范围之内; *L*-ddC 在 CEM 细胞类中表现出了一般的抗 HIV 活性, 其 EC₅₀ 值为 5.0 μ mol/L; *L*-OddC 和 *D*-OddC 抗 HBV(在 2.2.15 细胞类)的 EC₅₀ 值分别为 0.5 和 100 nmol/L. 3TC, *L*-OddC, *L*-ddC 和 *L*-FMAU 的活性比它们各自的 *D*-核苷要好. 在细胞毒性方面, 3TC, *L*-ddC 和 *L*-FMAU 比其相对应的 *D*-核苷更安全. 从总体上看, *L*-核苷与它们相对应的 *D*-核苷相比, 不

但有良好的抗病毒活性, 还有较低的毒性(*L*-OddC 和 D4T 比其 *D*-核苷的毒性更强些). 尤其是 3TC, 抗病毒活性高, 毒性相对低, 已被 FDA 批准应用于对 HIV 和 HBV 的治疗.

2 *L*-Fd4C 的抗病毒活性、毒性结构及其相关的核苷酸

2.1 有前景的抗病毒药: *L*-FddC 和 *L*-Fd4C

发现了 3TC(Lamivudine)以后, 人们又合成和评价了大量的 2', 3'-双脱氧(dd)-和 2', 3'-双脱氢-2', 3'-双脱氧(d4)-*L*-核苷类似物, 期望能找到更好的抗病毒药物. 其中, 2', 3'-双脱氧-2', 3'-双脱氢- β -*L*-氟胞嘧啶核苷(β -*L*-Fd4C)^[32,33]和 2', 3'-双脱氧- β -*L*-氟胞嘧啶核苷(β -*L*-FddC)^[34~36]效果较好(图 4). 两个化合物的体外抗 HIV 的作用均比 3TC 显著(表 2)^[32]. 鉴于这些 *L*-核苷显著的抗病毒活性, 在进一步的体外和体内的试验中, 以及制药过程和初步的毒性测试中, 都需要大量的两种 *L*-核苷, 因此, 有必要进一步探索研究它们的合成方法, 从而提高合成产率和工艺的可行性.

2.2 *L*-FddC 与 *L*-Fd4C 的合成

Chen 等根据 Chu^[37,38]和 Liotta^[39]文献中的新发现设计了初期的合成路线, 开始进行邻硅烷内酯 **1** 的 C-2 位置上苯硒基(图 5)的合成. 根据 Chu^[37]的报告, 使用苯硒基溴化物得到的 C-2 苯硒基内酯是 **2 α** 和 **2 β**

表 1 5 对 *D*-核苷和 *L*-核苷的抗 HIV、抗 HBV 活性和其细胞毒性^[21]

化合物	HIV-1(EC ₅₀ , μ mol/L)CEM 或 PBM 细胞	HBV(EC ₅₀ , μ mol/L) 2.2.15 细胞	细胞毒性(IC ₅₀ , μ mol/L) CEM, PBM 或 2.2.15
<i>L</i> -BCH189 (3TC)	0.0018(CEM)	0.01	>100 (CEM)
<i>D</i> -BCH 189	0.21 (PBM)	0.5	2.7 (CEM)
<i>L</i> -OddC	0.002 (CEM)	0.0005	0.26 (CEM)
<i>D</i> -OddC	0.016 (PBM)	0.01	12.3 (CEM)
<i>L</i> -ddC	5.0 (CEM)	0.01	70 (CEM)
<i>D</i> -ddC	1.5 (CEM)	2.8	28 (CEM)
<i>L</i> -FMAU	无活性	0.1	>200 (2.2.15)
<i>D</i> -FMAU	—	2.0	50 (2.2.15)
<i>L</i> -D4A	0.38 (CEM)	1.2	37 (CEM)
<i>D</i> -D4A	0.76 (PBM)	—	>100 (PBM)

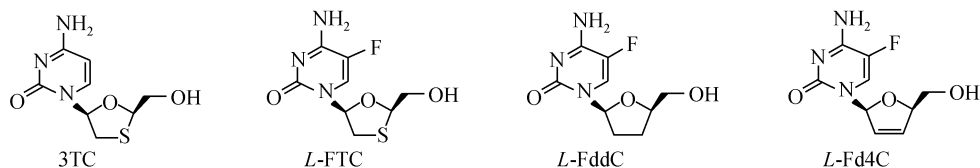


图4 具有代表性的L-核苷

表2 L-Fd4C与其他L-核苷的比较^[29,32,41,43]

化合物	HBV2.2.15 (nmol/L)	HIVMT-2 (μmol/L)	细胞毒性 MT-2 (μmol/L)	CEM (μmol/L)
L-Fd4C	2, 8	0.1~0.2	7,9	7
3TC	30, 45	2.0~3.0	> 100	50
FTC	10	0.5 (MT-4)	—	>100
L-FddC	36, 74	0.3~0.5	> 100	67
L-FMAU	100	无活性	—	> 200

的混合物,产物比率为2.5:1,主产物 2α 是所期望的异构体.为了提高非对映异构体的选择性,可以使用空间位阻大的N-邻苯二甲酰亚胺苯硒作为硒苯基化的试剂.令人非常满意的是,在 -78°C ,C-2苯硒基的引入尝试给出了极好的选择性($2\alpha:2\beta>40:1$),得到了所期望的非对映异构体 2α ,产率为70%~75%.在 -78°C ,使用甲苯中的DIBAL-H还原2'-苯硒基内酯 2α ,得内醚,产率为87%~98%.内醚的乙酰化可生成对应的C-1乙酰化内醚 3 ,产率几乎为100%.在TMSOTf环境中,将 3 与bis-TMS-5-氟胞嘧啶 4 进行结合,得到了理想的顺式核苷 5 ,产率超过了95%.使用氢化三丁基锡作为还原剂,还原脱除 5 的苯硒基部分,得到了2',3'-双脱氧核苷(产率大于95%).最后经过脱硅烷基,可分离出理想的L-FddC,产率为78%.另外,在吡啶中使用过氧化氢处理 5 ,可以得到D4核苷(产率超过95%),再使用三氢氟化三乙胺进行脱硅烷基,最终可以获得L-Fd4C^[40].

2.3 L-Fd4C与L-FddC的评价

对重新合成的L-Fd4C^[32,40]和L-FddC^[34]进行了抗病毒活性测定,参考Lamivudine^[6]和它的5'-氟衍生物L-FTC^[41]以及L-FMAU^[29],仔细分析表2中的数据,可以发现如下趋势:(1)抗HBV活性按以下顺序减弱:L-Fd4C>FTC>3TC=L-FddC>L-FMAU;(2)抗HIV活性按以下顺序减弱:L-Fd4C>L-FddC=FTC>3TC>>L-FMAU.根据表2中数据显示,在抗

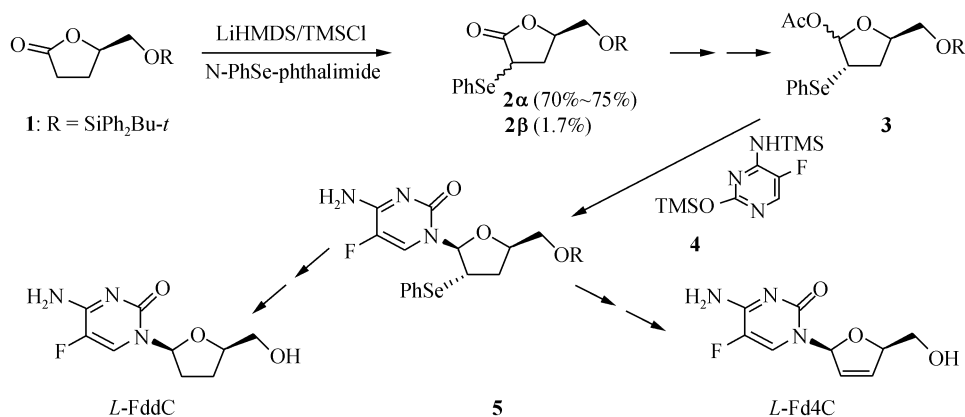
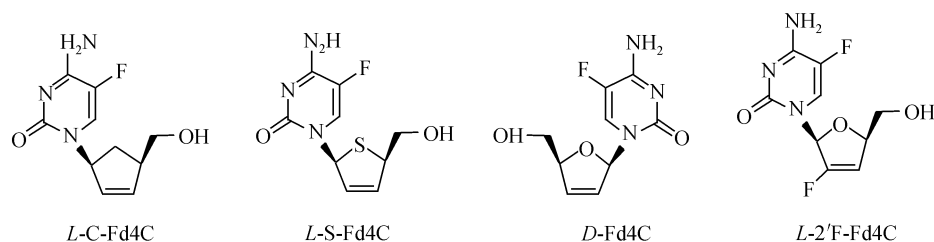
HBV活性的 EC_{50} 值方面,L-Fd4C的有效性比Lamivudine高出约5倍,后者比L-FMAU高出约3倍;在抗HIV活性的 EC_{50} 值方面,L-Fd4C有效性至少要高出Lamivudine(拉米呋啶)10倍,而L-FMAU则没有活性;(3)当测试它们对MT-2和CEM细胞类的细胞毒性时,检测到3TC,FTC,L-FddC和L-FMAU的 IC_{50} 值至少为50 $\mu\text{mol/L}$.相反,L-Fd4C毒性的 IC_{50} 值却小于10 $\mu\text{mol/L}$.但是,在2.2.15类细胞中,L-Fd4C的 IC_{50} 值大于70 $\mu\text{mol/L}$.整体考虑表2中数据的时候,结果发现L-Fd4C具有显著有效的抗HBV细胞活性(在2.2.15细胞中 EC_{50} 为2nmol/L)和可接受的安全性(在2.2.15细胞中 IC_{50} 大于70 $\mu\text{mol/L}$).

2.4 L-Fd4C相关核苷的对比

受到L-Fd4C显著抗病毒活性的鼓舞^[32],许多实验室开始合成L-Fd4C类似的氟化核苷,旨在发现新的具有强大抗病毒/抗癌活性的核苷类似物.现在已发现的氟化核苷有:(a)新批准的抗癌物Gemcitabine(吉西他滨)^[42];(b)进入抗HIV的临床试验,治疗抗药性的药F-ddA^[43];(c)抗HBV和EBV(E-B病毒)的L-核苷L-FMAU^[29].另外,Schinazi和Young等人也分别报道了碳环核苷L-C-Fd4C^[44]和硫代核苷L-S-Fd4C的研究情况^[45](图6).由于碳环核苷中没有糖苷键存在,所以,它们应该具有极高的化学(酸)稳定性.许多碳环和含硫代的核苷已被批准应用于临床,抵抗各种病毒的感染,其中包括:Carbovir^[46],Abacavir^[5]和Lamivudine^[6~8].为了便于进行对比,Chen等制备了D-Fd4C^[47],同时还合成了2'-氟化L-Fd4C^[48],其目的就是为了改善L-Fd4C的抗病毒活性和化学(酸)稳定性.

2.5 D-Fd4C, 2'-F-L-Fd4C, C-Fd4C和L-S-Fd4C的合成

D-Fd4C:用D-谷氨酸^[40]合成了L-Fd4C.为了缩短合成核苷的流程,新的设计以D-木糖为原料高效

图 5 *L*-FddC 与 *L*-Fd4C 的合成图 6 *L*-Fd4C 相关的 *L*-核苷

立体选择性的 6 步流程合成 *D*-Fd4C^[47]。由此可以想象, 通过简单地将原料转化为 *L*-木糖, 就可以合成 *L*-Fd4C。如图 7 所示, 根据高产率的 Gosslin 步骤^[49], 可以合成 *D*-呋喃木糖 **6**, 并将其作为原料。二醇 **6** 再经过双苯酰化(C-3'和 C-5')、异亚丙基保护基团(1'和 2')的清除后, 可以获得理想的二醇, 产率大于 90%。经过还原反应, 二醇可以转化为烯糖 **7**, 随后的 N-糖基化反应, 获得了具有高效化学定位的、有立体选择性的构型 2 α -碘的 β -核苷 **8**, 产率为 60%^[50,51]。在 70℃, 用锌和催化量的乙酸对 **8** 的乙醇和 EtOAc 溶液进行处理, 可以获得理想的 d4-核苷(51%), 再经过标准的 5'-脱硅烷化就可以将其转化为最终产品 β -*D*-Fd4C。

2'-F-*L*-Fd4C: 如图 8 所示, 先后使用 LiHMDS 和 F-N(SO₂Ph)₂ 对 2'-苯硒基内酯 **2a** 进行处理, 可获得 2'-氟化内酯 **9**。对 **9** 中的 2'-苯基硒成分进行氧化脱除, 可以获得 2'-氟不饱和内酯, 再用 DIBAL-H 对其进行还原, 可以获得理想的羟基内酯。用苯甲酰氯对其进行酰化, 可以产生 **10**。

在室温下, 用 TMSOTf 将硅烷基 **4** 与 **10** 进行结合(图 5), 可以获得异构混合物 **11**, 比率约为 1.5 : 1, 其主要产物是反式异构体。最后, 用三氟化氢三乙胺对 **11** 进行脱硅烷基反应, 得到了一对 2'-氟混合物。再经过层析法分离, 就可以分离出理想的顺式核苷 β -*L*-2'-F-Fd4C 和它的异构体 α -*L*-2'-F-Fd4C^[48,52,53]。

2'-氟化核苷异构体构型的确定是以特征质子 NMR 谱为依据的, 使用的是 Okabe 等人^[54]在合成 *D*-核苷, 以及 Lin 等人^[55]在合成 *L*-核苷时曾使用过的方法。 α -异构体的 H-4'质子比 β -异构体的场表现得要低。相反, α -异构体的 H-5'质子比 β -异构体的场表现得要高。值得一提的是, 顺式核苷的极性小于其相应的反式核苷。

C-Fd4C: 1999 年 Shi 和 Schinazi 等人^[44]曾报道过外消旋 C-Fd4C 的合成与生物研究。新的 C-Fd4C 合成步骤(图 9), 使用 LiAlH₄ 还原环戊烯羟化物 **12** 得到了环戊烯甲醇; 参照已发表的步骤^[56]对环戊烯甲醇进行环氧化, 得到了顺式环氧化物 **13**。化合物 **13** 和 NaSePh 反应后获得了一个中间体, 再通过乙酰化和氧化消除将该中间体转化为化合物 **14**。在氢化钠和

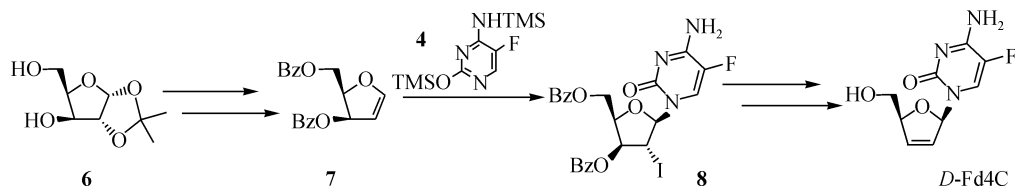


图7 D-Fd4C的合成

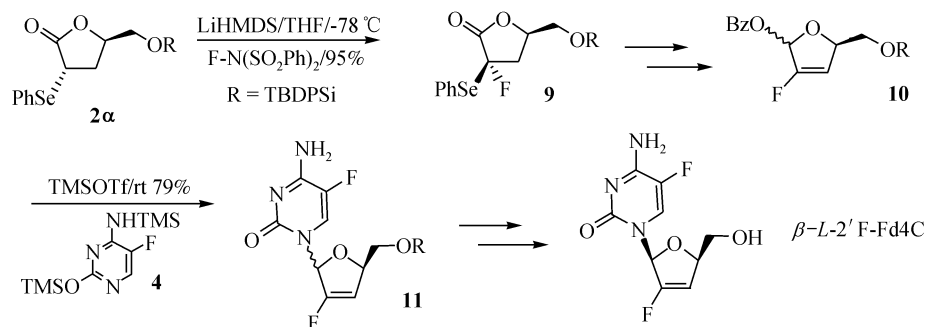


图8 L-2'-F-Fd4C的合成

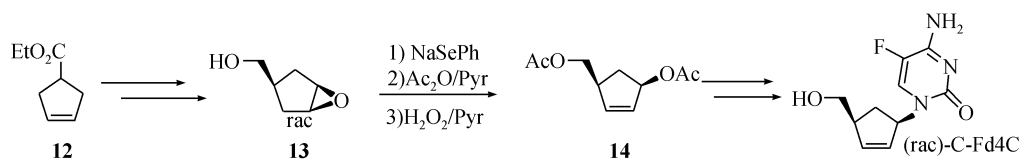


图9 外消旋 C-Fd4C 的合成

钨催化剂作用下, **14** 与 N4-乙酰基-5-氟胞嘧啶进行结合, 得出了碳环核苷, 以 NaOMe 为介质经过酯的水解将其转化为最终的外消旋化合物 C-Fd4C.

L-S-Fd4C^[45]: 新的合成如图 10 所示, 关键的 O-硅烷硫代内酯可以从(R)-甘油内醚分三步获得, 并可以把它逐步转化成中间体 **15**, **16**. 将 **16** 与必需的硅烷基 **4** 结合, 得到理想的加合物, 然后按照与图 5 相似的顺序, 将中间体转化成硫化核苷 L-S-Fd4C.

2.6 D-Fd4C, 2'-F-Fd4C, C-Fd4C 和 L-S-Fd4C 的评价

用该组核苷类似物在 2.2.15 细胞类中测定抗 HBV 时(表 3), 发现 L-Fd4C 效果最好, D-Fd4C 和 L-2'-F-Fd4C 相对于 L-Fd4C 的活性较弱, 含硫类似物则表现出很低的抗 HBV 活性. 当使用 MT-2 细胞测试抗 HIV 时, 发现 D-Fd4C 的效力与其对应异构体 L-Fd4C 具有相同的 EC₅₀ 值, 均为 0.2 μmol/L. 另一方面, L-2'-F-Fd4C 和 C-Fd4C 的活性较于 L-Fd4C 要弱得多

(>18 倍), L-S-Fd4C 在 Hela CD4 细胞类中则表现出良好的抗 HIV 活性. 另外一个生物活性的重要指标是细胞毒性, D-Fd4C, L-2'-F-Fd4C 和 C-Fd4C 的毒性约是 L-Fd4C 的十分之一, 而 L-S-Fd4C 却在 Vero 细胞中表现出非常小的细胞毒性.

表 3 L-Fd4C 及其相关类似物的抗病毒活性和细胞毒性^[42,45,47,48]

化合物	HBV(2.2.15) EC ₅₀ /μmol · L ⁻¹	HIV EC ₅₀ / μmol · L ⁻¹	细胞毒性 IC ₅₀ /μmol · L ⁻¹
L-Fd4C	0.008	0.2(MT-2) 0.034(PBM)	9(MT-2) 7(CEM) 9.4(PBM)
D-Fd4C	>0.3	0.2(MT-2) 0.046(PBM)	~100(MT-2) ~100(CEM) >100(PBM)
L-2'-F-Fd4C	>0.03	3.6(MT-2)	>100(MT-2) >50(CEM)
C-Fd4C	N/T	8.2(PBM)	>100(PBM)
L-S-Fd4C	3.5	0.4(Hela CD4)	>500(Vero)

3 *L*-Fd4C5'-单磷酸前药和 5'-三磷酸

3.1 *L*-Fd4C 5'-单磷酸和它的中性前药

核苷类似物的三步磷酸化是它们产生药效的先决条件. 为了进一步改善核苷类似物的功效, 需要提高它的 5'-单磷酸酯在细胞内的含量, 从而进行连续的磷酸化, 产生具有生物活性的三磷酸结构^[57]. 在许多情况下, 连续三步磷酸化的第一步是单磷酸化, 也是速率限制的一步, 双磷酸化和三磷酸化是通过专用激酶对底物(可以是少量的)进行催化产生的. 某

些核苷类似物缺乏抗病毒活性是由于缺乏一个有效的激酶来进行第一步磷酸化^[58]. 考虑到被 HBV 感染的病人在肝脏中的激酶活性特别低, 可以绕过第一步高选择和受控制的磷酸化, 直接使用 *L*-FD4C 的核苷酸前药来治疗 HBV 感染, 也可能比使用其母核苷更为有效. 基于此, 可以设想 *L*-Fd4C 的乙酰硫乙基(SATE)的单磷酸双脂(*L*-Fd4CMP 前药, 图 11)可以作为核苷酸前药^[59].

前药生物转化途径: 可以假设, *L*-Fd4C 前药能够比其相应的游离 5'-磷酸更迅速地进入细胞(图 12), 一

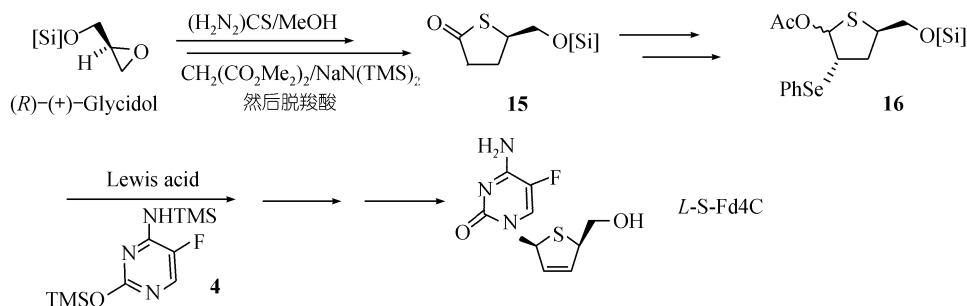


图 10 *L*-S-Fd4C 的合成

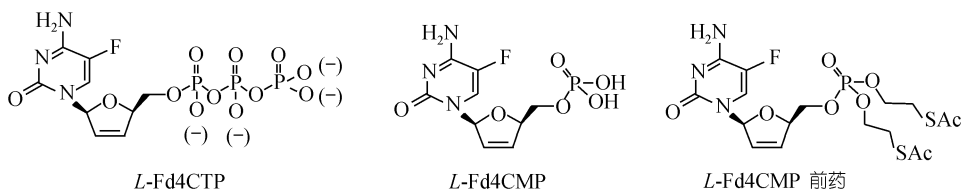


图 11

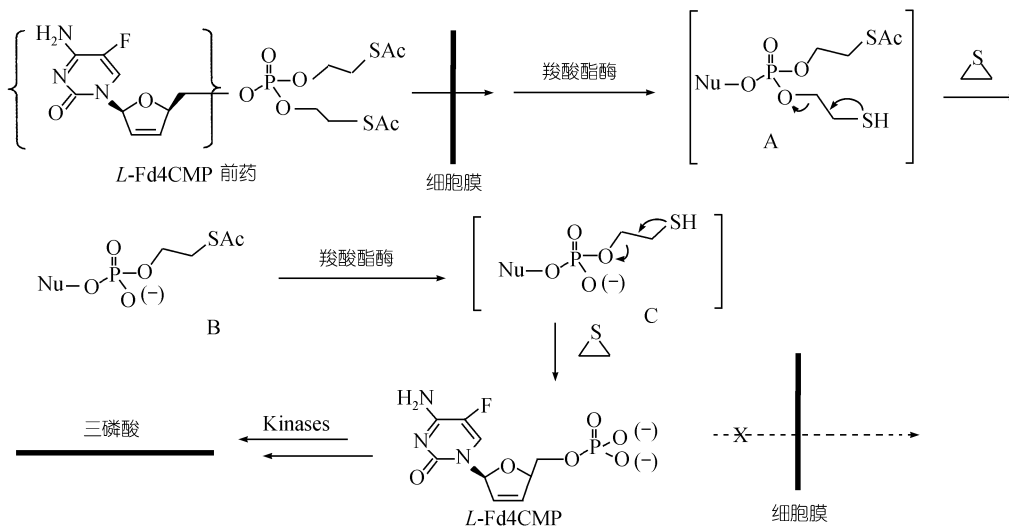
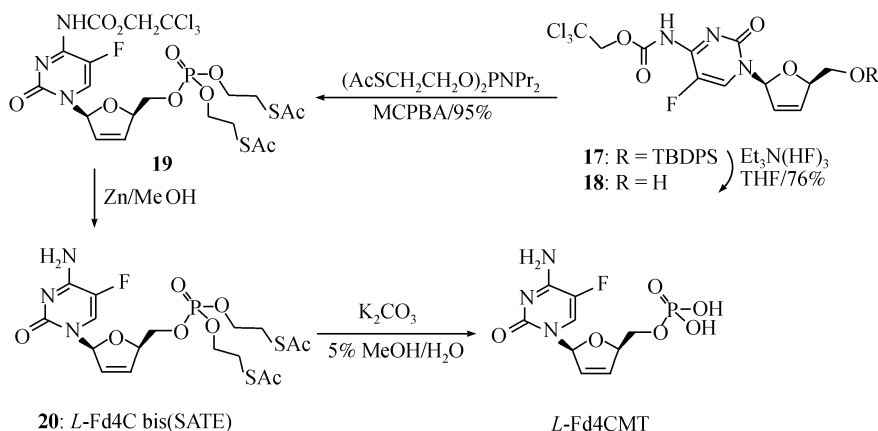


图 12

图 13 *L*-Fd4C 一磷酸前药的合成

旦进入细胞后,通过相似于 AZT^[60]、D4T^[61]和 ddA^[62]前药的分解途径,*L*-Fd4C 前药将逐步分解为 *L*-Fd4CMP. 第一步的分解是羧酸酯酶催化水解 *L*-Fd4C 前药,产生含 2-乙巯基的中间体 A,然后通过裂解得含有单一 SATE 的中间体 B. 根据相似的机理,负电荷的核苷酸 B 将进一步降解成与它对应的二价阴离子 *L*-Fd4CMP. 不同于其母核苷,在细胞内形成的 *L*-Fd4CMP 不可能跑到细胞外面来,因为它带有负电荷. 保留下来的 *L*-Fd4CMP 将进一步进行磷酸化,产生与其对应的具有生物活性的三磷酸.

3.2 *L*-Fd4CMP 前药的合成

新开发的方法(图 13)以 **17** 为原料^[40]. 在 **17** 中保护 N-4 氮并除去 5'-TBDPS 甲硅烷基团,可以获得 N₄-Troc 保护的中间体 **18**,产率为 57%. 随后使用适当的氨基磷酸酯^[63]对 **18** 进行 5'-磷酸化,通过对中间体 MCPBA 氧化后,可得磷酸 **19**(100%). 最后,用甲醇中的锌对 **19** 悬浮液进行温和地加热,脱去 N-Troc 保护团,可得 *L*-Fd4CMP 前药 **20**,产率为 71%^[59].

3.3 *L*-Fd4CMP 前药的评价

当测试抗 HBV 时(表 4),*L*-Fd4C 的 EC₅₀ 值是 17 nmol/L,当浓度增加到 40 nmol/L 时,*L*-Fd4C 的抑制作用只比 50%多一点. 另外,前药 **20** 的 EC₅₀ 值达到了 2 nmol/L 时,显示出了优异的效力. 更重要的是,当前药浓度为 10 nmol/L 时,可以抑制 85% 以上的细胞外 HBV 的 DNA(数据没有列在表 4 中). 在人体 T-细胞和淋巴细胞性白血病细胞株(CEM)中,*L*-Fd4C 和它的双(SATE)前药 **20** 的细胞毒性分别为 13 和 52 μmol/L,这表明该前药的细胞毒性比其母药的细胞

毒性要小 4 倍. 在表 4 中还可以看到,在最高浓度(70 μmol/L)测试中,母药和其前药在人体的肝癌细胞株(2.2.15)、鼠的结肠瘤细胞株(C26)、鼠的黑色素瘤细胞株(B16)和鼠的肺癌细胞株中并没有引起毒性.

值得一提的是,前药经过羧酸酯酶的活化处理生成的副产物为环硫化物,在最高剂量(通常为 50 ~ 200 μmol/L)的测试中,在 CFU-GM, PC-12, CEM-SS, MT-4 和 PBM 细胞中没有显示出毒性. 根据表 4 所列出的数据,可以确信 *L*-Fd4CMP 的前药 **20** 比其母药具有更高的抗 HBV 活性,而且降低了细胞毒性.

表 4 *L*-Fd4C 和其 5'-双(SATE)磷酸原药的抗-HBV 和细胞毒性^[59]

化合物	HBV EC ₅₀ / nmol · L ⁻¹	CEM	细胞毒性 2.2.15	C26 IC ₅₀ / μmol · L ⁻¹	B16	M109
<i>L</i> -Fd4C	17	13	>70	>70	>70	>70
原药	2	52	>70	>70	>70	>70

3.4 *L*-Fd4C 多磷酸

已经证实核苷类似物(如: FIAU)对宿主线粒体 DNA 合成的抑制会导致严重的延迟性中毒(死亡). 后来,在 Chen 等人发表的文献中阐述了该延迟性中毒是由于抗病毒剂抑制了人体细胞的 DNA 聚合酶 γ^[64,65]而造成的. 因而制备 *L*-Fd4CTP, 可以试验它的抗病毒 RT 和人体 DNA 聚合酶 γ 的效果,以此来进一步评价 *L*-Fd4C 的安全性^[66].

由于在 *L*-Fd4C 中存在 2', 3'-双键,造成化合物对酸的不稳定性,通过许多常规制备 5'-磷酸化方法都无法获得理想的 *L*-Fd4CTP. Chen 等经过多次尝试,通过一锅煮过程(图 14),可以成功地合成 *L*-Fd4CTP.

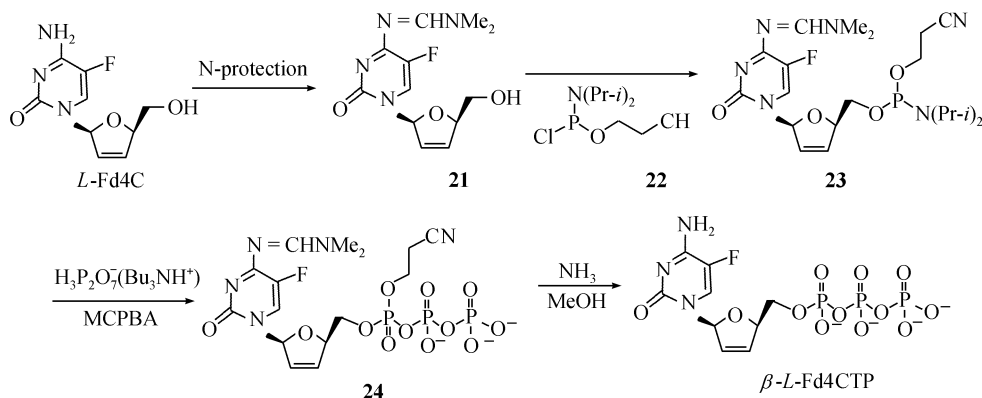


图 14 L-Fd4C 三磷酸的合成

在该过程中,从 *L*-Fd4C 中制备了 N4-脬所保护的反应物 **21**, 它和 2-氰乙氧基二异丙氨基亚磷酰氯 **22** 反应后,再经过处理最终可以获得 β -L-Fd4CTP. 该产物的 HPLC 保留时间与通过酶催化合成的 $[^3\text{H}]\text{-L-Fd4C}$ 保留时间完全吻合^[67].

3.5 L-Fd4CTP 的评价

当使用 HIV-RT 和人类 DNA 聚合酶 γ 进行评价时, *L*-Fd4CTP 和 *L*-FddC 都表现出对 HIV-RT 较好(3 倍)的抑制活性(相对于聚合酶 γ). 表 5 中的数据还表明, *L*-Fd4CTP 比 *L*-FddCTP 更具有抑制作用. 另据有关报道称, *L*-Fd4CTP 的 K_i 值是 3TCTP 的 K_i 值的五分之一^[68]. 这表明, 在抗 HIV 方面, *L*-Fd4CTP 比 3TCTP 更具有活性.

表 5 L-Fd4CTP 与病毒和人类 DNA 聚合酶 γ 的相互作用^[66]

	ddCTP	<i>L</i> -FddCTP	<i>L</i> -Fd4CTP
(HIV) $K_m/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.35 ± 0.10	0.45 ± 0.15	0.076 ± 0.010
(人类聚合酶 γ) $K_m/\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.13 ± 0.05	1.6 ± 0.6	0.23 ± 0.07

4 结论与前景展望

迄今为止, *L*-Fd4C 是所报道中最具效力的抗 HBV 药剂(相对于 3TC, *L*-FddC, *L*-FMAU 等), *L*-Fd4C 的长期给药可以持续不断地抑制肝脏中病毒(大于 95%)和病毒 DNA 的合成^[69]. 与 *L*-Fd4C 相比, *D*-Fd4C 表现出了相似的抗 HIV 活性,但同时,其抗 HBV 活性也降低了; *F*-*L*-Fd4C 表现出了很好的酸稳定性,但其抗病毒和细胞毒性的效果不理想. 虽然 *L*-Fd4C 是通过细胞质脱氧胞苷激酶在胞化成它的一磷酸、二磷酸和三磷酸代谢物^[69],但新制备的 bis(SATE)-*L*-

Fd4CMP(**20**)已被证明更具效力,其细胞毒性也较 *L*-Fd4C 更低. 化学合成的 *L*-Fd4CTP 对于人类聚合酶 γ 是非常好的底物,而且对于 HIV-RT 是更好的底物(3 倍). 根据本文中的数据,可以得出这样的结论:对于治疗 HBV, *L*-Fd4C 具有非常好的活性(无论在体内还是在体外试验中),而且其毒性也是可以接受的.

在治疗 HBV 病毒时,长期服用拉米呋啶(3TC)会使病毒产生抗药性,因此,研发创新核苷或核苷类似物,以便克服拉米呋啶(3TC)产生的抗药性的工作成了当前重中之重的任务. 为了增强抗 HBV 病毒药物的长期有效性,可以采用,即同时使用两种或两种以上抗病毒药物. 联合药物的合理选用,不仅可以减小病毒的抗药性,而且还可以使病毒的毒性呈持续减小的趋势. 总之,目前现有的联合化学疗法,即拉米呋啶(3TC)与 Famciclovir^[70]的联合或拉米呋啶(3TC)与干扰素^[71]的联合,均表现出了积极的效果.

就艾滋病(AIDS)病毒治疗的未来发展方向而言,通过进一步改善已有疗法,克服药物的抗药性,联合市场上已有的各种药物,在短期内,都可以产生良好的疗效. 但是,要想获得长期的疗效,就需要在已知靶标或创新靶标的基点上,进一步研发新型的化学试剂. 同时,研发安全有效的疫苗进一步抑制 HIV 病毒的传播. 令人满意的是,其中一些抗病毒药物已经进入了各种临床试验阶段.

致谢 本工作为国家杰出青年科学基金(批准号:30125043)和教育部长江学者基金资助项目.

参 考 文 献

- Mitsuya H, Weinhold K J, Kent J. et al. 3'-Azido-3'-deoxythymidine (BW A509U): an antiviral agent that inhibits the infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotropic virus type

- III/lymphadenopathy-associated virus in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82: 7096~7100
- 2 Mitsuya H, Broder S. Inhibition of the in vitro infectivity and cytopathic effect of human T-lymphotrophic virus type III/lymphadenopathy-associated virus(HTLV-III/LAV) by 2', 3'-di-deoxynucleosides. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83(6): 1911~1915
- 3 Yarchoan R, Mitsuya H, Thomas R V, et al. In vivo activity against HIV and favorable toxicity profile of 2,3'-Dideoxyinosine. *Science*, 1989, 245: 412~415
- 4 Mansuri M M, Starett J E, Ghazzouli I, et al. 1-(2, 3-Dideoxy-beta-D-glycero-pent-2-enofuranosyl)thymine. A highly potent and selective anti-HIV agent. *J Med Chem*, 1989, 32(2): 461~466
- 5 Katlama C, Clotet B, Plettenberg A, et al. Abacavir sulfate was first launched in 1999 by Glaxo Wellcome as Ziagen in the US for the treatment of HIV infection, in combination with other antiretroviral agent. *AIDS*, 2000, 14: 781~789
- 6 Chang C -N, Doong S -L, Zhou J H, et al. Deoxycytidine deaminase-resistant stereoisomer is the active form of (+/-)-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine in the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Biol Chem*, 1992, 267(20): 13938~13942
- 7 Doong S -L, Tasi C -H, Schinazi R F, et al. Inhibition of the replication of hepatitis B virus in vitro by 29, 39-dideoxy-39- thiacytidine and related analogues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 8495~8499
- 8 Dienstag J L, Perrillo R P, Schiff E R, et al. A preliminary trial of lamivudine for chronic hepatitis B infection. *New Engl J Med*, 1995, 333: 1657~1661
- 9 Naesens L, Balzarini J, Bischofberger N, et al. Antiretroviral activity and pharmacokinetics in mice of oral bis (pivaloylmethyl)-9-(2-phosphonylmethoxy-ethyl)adenine, the bis (pivaloyloxymethyl) ester prodrug of 9-(2-phosphonyl methoxyethyl)adenine. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 22~28
- 10 Yokota T, Konno K, Shigeta S, et al. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogs on hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. *Antiviral Chem Chemother*, 1994, 5: 57~63
- 11 Benhamou Y, Bochet M, Thibault V, et al. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet*, 2001, 358: 718~723
- 12 Bryant M L, Bridges E G, Placidi L, et al. Antiviral L-nucleosides specific for hepatitis B virus infection. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45: 229~235
- 13 Das S R, Schneller S W, Balzarini J, et al. 5'-Nor carbocyclic 5'-deoxy-5'-(isobutylthio)adenosine and a 2',3'-dideoxy-2', 3'-didehydro derivative. *Antiviral Chem Chemother*, 2001, 12: 119~124
- 14 Bryant M L, Gosselin G, Imbach J-L. PCT Patent Appl WO 0196353-A, 2001
- 15 Peek S F, Cote P J, Jacob J R, et al. Antiviral activity of clevidine [L-FMAU, 1-(2-fluoro-5-methyl- β -L-arabinofurano syl) uracil] against WHV replication and gene expression in chronically infected woodchucks (*M. monax*). *Hepatology*, 2001, 33: 254~266
- 16 Chin R, Shaw T, Torresi J, et al. In vitro susceptibilities of wild-type or drug-resistant hepatitis B virus to (-)-beta-D-2, 6-diaminopurine dioxolane and 2'-fluoro-5-methyl-beta-L-arabinofuranosyluracil. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(9): 2495 ~ 2501
- 17 Guerhier F L, Pichoud C, Jamard S, et al. Antiviral activity of {beta}-L-2', 3'-dideoxy-2', 3'-didehydro-5-fluorocytidine in woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4): 1065~1077
- 18 Colonna R J, Innaimo S F, Seifer M, et al. Identification of BMS-200, 475 as a novel potent inhibitor of hepatitis B virus replication. *Antiviral Res*, 1997, 34: A51
- 19 De Man R, Wolters L M M, Nevens F, et al. Safety and efficacy of oral entecavir given for 28 days in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 2001, 34: 578~582
- 20 Nair V, Jahnke T S. Antiviral activities of isomeric dideoxynucleosides of D- and L-Related stereochemistry. *Antimicrobial Agents & Chemotherapy*, 1995, 39: 1017~1029
- 21 Wang P, Hong J H, Cooperwood J S, et al. Recent advances in L-nucleosides: chemistry and biology. *Antiviral Res*, 1998, 40(1-2): 19~44
- 22 Gumina G, Song G-Y, Chu C K. L-Nucleosides as chemotherapeutic agents. *FEMS Microb Lett*, 2001, 202: 9~15
- 23 Simuth J, Sidlikova I, Zelinka J. Enzymatic phosphorylation of nucleoside diphosphates with nucleoside diphosphokinase from *Streptomyces aureofaciens*. *Biologia (Bratislava, Slovakia)*, 1976, 31: 683~688
- 24 Spadari S, Maga G, Focher F, et al. L-Thymidine is phosphorylated by herpes simplex virus type 1 thymidine kinase and inhibits viral growth. *J Med Chem*, 1992, 35: 4214~4220
- 25 Maury G. The enantioselectivity of enzymes involved in current antiviral therapy using nucleoside analogues: a new strategy. *Antiviral Chem Chemother*, 2000, 11: 165~190
- 26 Chu C K, Ahn S K, Kim H O, et al. Asymmetric synthesis of enantiomerically pure (-)-(1'R,4'R)-dioxolane-thymine and its anti-HIV activity. *Tetrahedron Lett*, 1991, 32: 3791~3794
- 27 Kim H O, Schinazi R F, Shanmuganathan K, et al. L- β -(2S,4S)- and L- α -(2S,4R)-dioxolanyl nucleosides as potential anti-HIV agents: Asymmetric synthesis and structure-activity relationships. *J Med Chem*, 1993, 36: 519~528
- 28 Lin T -S, Luo M -Z, Liu M -C. A stereospecific synthesis of 2', 3'-dideoxy- β -L-cytidine (β -L-ddC), a potent inhibitor against human hepatitis B virus (HBV) and human immunodeficiency virus (HIV). *Tetrahedron Lett*, 1994, 35: 3477~3480
- 29 Ma T -W, Pai S B, Zhu Y -L, et al. Structure-activity relationships of 2'-fluoro-beta-L-pyrimidine nucleosides as anti-hepatitis B virus (HBV) agents. *J Med Chem*, 1996, 39: 2835~2843
- 30 Chu C K, Hong J H, Choi Y, et al. L-FMAU. *Drugs Fut*, 1998, 23: 821~826
- 31 Bolon P J, Wang P, Chu C K, et al. Anti-human immunodeficiency and anti-Hepatitis B virus activities of beta-L-2',3'-dideoxy purine nucleosides. *Bioorg&Med Chem Lett*, 1996, 6(14): 1657~1662
- 32 Lin T S, Luo M Z, Liu M C, et al. Design and synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L-cytidine (beta-L-d4C) and 2', 3'-dideoxy 2',3'-didehydro-beta-L-5-fluorocytidine (beta-L-Fd4C), two exceptionally potent inhibitors of human hepatitis B virus (HBV) and potent inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *J Med Chem*, 1996, 39(9): 1757~1759
- 33 Dutschman G E, Bridges E G, Cheng Y C, et al. Metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-beta-L(-)-5-fluorocytidine and its activity in combination with clinically approved anti-human immunodeficiency virus beta-D(+) nucleoside analogs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(7): 1799~1804
- 34 Lin T S, Luo M Z, Liu M C, et al. Synthesis and biological evaluation of 2',3'-dideoxy-L-pyrimidine nucleosides as potential antiviral agents against human immunodeficiency virus (HIV) and hepatitis B virus (HBV). *J Med Chem*, 1994, 37(6): 798~803
- 35 Schinazi R F, Gosselin G, Faraj A, et al. Pure nucleoside enantiomers of beta-2',3'-dideoxycytidine analogs are selective inhibitors of hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(9): 2172~2174
- 36 Van Draanen N A, Tisdale M, Parry N R, et al. Influence of

- stereochemistry on antiviral activities and resistance profiles of dideoxycytidine nucleosides. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 38(4): 868~871
- 37 Chu C K, Babu R, Beach J W, et al. A highly stereoselective glycosylation of 2-(phenylselenenyl)-2,3-dideoxyribose derivative with thymine: synthesis of 3'-deoxy-2',3'-didehydrothymidine and 3'-deoxythymidine. *J Org Chem*, 1990, 55: 1418~1420
- 38 Bolon P J, Wang P, Chu C K, et al. Anti-Human Immunodeficiency and anti-hepatitis B virus activities of beta-L-2', 3'-dideoxy purine nucleosides. *Bioorg&Med Chem Lett*, 1996, 6(14): 1657~1662
- 39 Wilson L J, Liotta D. A general method for controlling glycosylation stereochemistry in the synthesis of 2'-deoxyribose nucleosides. *Tetrahedron Lett*, 1990, 31: 1815~1818
- 40 Chen S H, Li X, Li J, et al. Stereoselective syntheses of β -L-FD4C and β -L-FddC. *J Org Chem*, 1997, 62: 3449~3452
- 41 Schinazi R F, McMillian A, Cannon D. Selective inhibition of human immunodeficiency viruses by racemates and enantiomers of cis-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36(11): 2423~2431
- 42 Plunkett W, Gandhi V, Chubb S, et al. 2',2'-Difluorodeoxycytidine metabolism and mechanism of action in human leukemia cells. *Nucleosides Nucleotides*, 1989, 8: 775~785
- 43 Driscoll J S, Mayers D L, Bader J P, et al. 2'-Fluoro-2', 3'-dideoxyarabinosyladenine (F-ddA), Activity against drug resistant HIV strains and clades A-E. *Antiviral Chem Chemother*, 1997, 8: 107~111
- 44 Shi J, McAtee J J, Schlueter Wirtz S, et al. Synthesis and biological evaluation of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxy-5-fluorocytidine (D4FC) analogues: discovery of carbocyclic nucleoside triphosphates with potent inhibitory activity against HIV-1 reverse transcriptase. *J Med Chem*, 1999, 42(5): 859~867
- 45 Young R, Shaw-Ponter S, Thomson J B, et al. Synthesis and antiviral evaluation of enantiomeric 2', 3'-dideoxy- and 2', 3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy-4'-thionucleosides. *Bioorg Med Chem Lett*, 1995, 5: 2599~2604
- 46 Daluge S M, Good S S, Falletto M B, et al. 1592U89: a novel carbocyclic nucleoside analog with potent, selective anti-human immunodeficiency virus activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 41: 1082~1093
- 47 Chen S H, Lin S, King I, et al. Synthesis and comparative evaluation of two antiviral agents: β -L-Fd4C and β -D-Fd4C. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 3245~3250
- 48 Chen S H, Wang Q, Mao J, et al. Synthesis and biological evaluation of a series of 2'-fluorinated-2', 3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy-(L)-nucleosides. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8(13): 1589~1594
- 49 Gosselin G, Bergogne M -C, Imbachi J -L. In nucleic acid chemistry, improved and new synthetic procedure, methods and techniques, part 4, Wiley: New York, 1991, 41 ~ 45
- 50 Robles R, Rodriguez C, Izquierdo I, et al. Synthesis of furanose glycals from furanose 1,2-diols and their cyclic thiocarbonate esters. *Carbohydrate Res*, 1997, 300: 375
- 51 Robles R, Rodriguez C, Izquierdo I, et al. An efficient and highly stereoselective synthesis of nucleoside derivatives from furanoid 1,2-diols. *Tetrahedron: Asymmetry*, 1997, 8: 2959~2965
- 52 Lee K, Choi Y S, Gullen E, et al. Synthesis and anti-HIV and anti-HBV activities of 2'-fluoro-2',3'-unsaturated L- nucleosides. *J Med Chem*, 1999, 42: 1320~1328
- 53 Lee K, Choi Y, Gumina G, et al. Structure-activity relationships of 2'-fluoro-2',3'-unsaturated D-nucleosides as anti-HIV agents. *J Med Chem*, 2002, 45: 1313~1320
- 54 Okabe M, Sun R C, Tam S Y K, et al. Synthesis of the dideoxynucleosides ddC and CNT from glutamic acid, ribonolactone, and pyrimidine bases. *J Org Chem*, 1988, 53: 4780~4786
- 55 Lin T -S, Luo M -Z, Liu M -C. Synthesis of several pyrimidine L-nucleoside analogues as potential antiviral agents. *Tetrahedron*, 1995, 51: 1055~1068
- 56 Hodgson D M, Witherington J, Moloney B A. Concise racemic and highly enantioselective approaches to key intermediates for the syntheses of carbocyclic nucleosides and pseudo-ribofuranoses: Formal syntheses of carbovir. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1994, 3373~3378
- 57 Gosselin G, Girardet J L, Perigaud C, et al. New insights regarding the potential of the pronucleotide approach in antiviral chemotherapy. *Acta Biochimica Polonica*, 1996, 43(1): 196~208
- 58 Li X, Carmichael E, Feng M, et al. Bis-S-acyl-2-thioethyl (SATE)-bearing monophosphate prodrug of b-L-Fd4C as potent antiviral agent. *Bioorg Med Chem Lett*, 1998, 8: 57
- 59 Beltran T, Egron D, Lefebvre I, et al. Anti-HIV pronucleotides: SATE versus phenyl as a protecting group of AZT phosphoramidate derivative. *Nucleosides Nucleotides*, 1999, 18, 973~975
- 60 Girardet J -L, Perigaud C, Aubertin A -M, et al. Increase of the anti-HIV activity of d4T in human T cell culture by the use of the SATE pronucleotide approach. *Bioorg Med Chem Lett*, 1995, 5: 2981~2984
- 61 Perigaud C, Aubertin A -M, Benzaria S, et al. Equal inhibition of the replication of human immunodeficiency virus in human T-cell culture by ddA bis(SATE)phosphotriester and 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine. *Biochem Pharmacol*, 1994, 48: 11~14
- 62 Valette G, Pompon A, Girardet J -L, et al. Decomposition pathways and in vitro HIV inhibitory effects of isodda pronucleotides: towards a rational approach of intracellular delivery of nucleoside 5' monophosphates. *J Med Chem*, 1996, 39: 1981~1990
- 63 Chen C H, Cheng Y C. Delayed cytotoxicity and selective loss of mitochondrial DNA in cells treated with the anti-human immunodeficiency virus compound 2', 3'- dideoxycytidine. *J Biol Chem*, 1989, 264: 11934~11937
- 64 Kukhanova M K, Liu S H, Mozzherin D, et al. L- and D-enantiomers of 2', 3'-dideoxycytidine 5'-triphosphate analogs as substrates for human DNA polymerases. *J Biol Chem*, 1995, 270: 23055~23059
- 65 Kukhanova M, Li X, Chen S H, et al. Interaction of β -L-2', 3'-dideoxy-2',3'-dideoxy-5-fluoro-CTP with human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and hDNA polymerases: Implications for human immunodeficiency virus drug design. *Mol Pharmacol*, 1998, 53: 801~807
- 66 Dutschman G E, Bridges E G, Liu S H, et al. Metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxy-beta-L-(-)-5-fluorocytidine and its activity in combination with clinically approved anti-human immunodeficiency virus beta-D(+) nucleoside analogs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42(7): 1799~1804
- 67 Chang C N, Skalski V, Zhou J H, et al. Biochemical pharmacology of (+)- and (-)-2', 3'-dideoxy-3'-thiacytidine as anti-hepatitis B virus agents. *J Biol Chem*, 1992, 267: 22414~22420
- 68 Guerhier F L, Pichoud C, Guerret S, et al. Characterization of the antiviral effect of 2',3'-dideoxy-2', 3'-dideoxy-beta-L-5-fluorocytidine in the duck hepatitis B virus infection model. *Antimicrob Agents Chemother*, 2000, 44(1): 111~122
- 69 Lau G, Tsiang M, Hou J, et al. Combination therapy with lamivudine and famciclovir for chronic hepatitis B infected Chinese patients: a viral dynamics study. *Hepatology*, 2000, 32: 394~399
- 70 Schalm S W, Heathcote J, Cianciara J, et al. Lamivudine and alpha interferon combination treatment of patients with chronic hepatitis B infection: a randomised trial. *Gut*, 2000, 46: 562~568

(2003-05-16 收稿, 2003-07-16 收修稿稿)