

从核苷类似物基础结构分析其运用和发展方向

颜学兵 周培培 王磊

目前,抗 HBV 的治疗主要在讨论三个方面的问题:Who:哪些患者应该治疗,目前决定患者是否需要抗 HBV 治疗的主要指标是什么? 哪些患者适合单一治疗,哪些患者适合联合治疗;What:用哪一类或哪一种药物、预测疗效的指标、预测发生变异的方法;When:何时用药、何时停药、何时加药何时换药、何时进行药物联用。

核苷(酸)类似物已成为继干扰素之后的又一类用于抗乙型肝炎病毒(HBV)的药物,由于其在临床运用越来越广泛,用药后出现的问题也日益显现,本文就核苷(酸)类似物抗 HBV 治疗谈下面几点看法。

一、目前核苷(酸)类似物分类方法

正常的核苷酸由核苷、戊糖、三磷酸组成,而核苷由碱基、戊糖组成,所以临床上运用的核苷(酸)类似物设计主要从三方面:单对碱基或戊糖以及碱基和戊糖同时进行改造,设计出的核苷(酸)类似物。如果在体外加上磷酸,即核苷酸类似物。原则上糖基的改造越大,即糖基与正常核糖基相差越大,核苷(酸)类似物的抗病毒活性也越大,毒副作用越小。碱基改造时,取代基一般应不多于4个碳原子,而且取代基含有卤素时活性较大,抗病毒谱广。碱基和糖基同时改造时,一般在碱基和糖基上的取代基应同碱基单独取代时一样,即取代基不能太大。羟基、烷基直接连接于碱基时的无环核苷化化合物的抗病毒活性比相似构造的羟烷氧甲基核苷大。目前抗 HBV 的核苷(酸)类似物一般都是对于其戊糖进行改造,戊糖的改造有以下几种方法:在 D-或 L-型呋喃糖基上进行糖基改造,还可以将呋喃糖基变成吡喃糖、四元氧杂糖、碳环型以及无环型。

本文根据其基本结构特征就已经和可能将要上市的核苷(酸)类似物进行分类,有5种分类方法,见表1。

第1种:依据其模拟碱基的不同分为4类:拉米夫定(LAM)是胞嘧啶(C)、替比夫定(LdT)是胸腺嘧啶(T)、阿德福韦酯(ADV)是腺嘌呤(A)、恩替卡韦(ETV)是鸟嘌呤(G)碱基改造的核苷(酸)类似物。

第2种:依据其碱基是嘧啶和嘌呤分为2大类:嘧啶类:LAM、LdT;嘌呤类:ADV 和 ETV。

第3种:核苷(酸)类似物和核苷酸类似物:核苷(酸)类似物为 LAM、LdT 和 ETV,因为其结构都是由碱基和戊糖;而核苷酸类似物 ADV 和 2008 年 4 月 25 日

在欧盟上市的替诺福韦酯(TDF),它们在体外是核苷+戊糖+单磷酸+酯化,核苷酸在体外酯化的目的是增加其稳定性和容易吸收,即有利于最终核苷酸侵入细胞内的浓度。所有核苷(酸)类似物侵入细胞内,首先必须经过宿主细胞的胸苷激酶(TK)磷酸化或病毒本身或者由病毒激活的TK三次磷酸化,其中首次磷酸化非常重要且相对困难,形成三磷酸核苷酸,且必须达到胞内最终是核内,才能发挥其模拟正常核苷酸竞争性抑制HBV DNA聚合酶,即掺入HBV DNA模板,才能起到链终止的作用。为何ADV在体外合成核苷酸的类似物并且酯化,还有其他原因:如无环核苷(酸)类似物在体外稳定性差、侵入体内后首次磷酸化较其他核苷(酸)类似物困难和吸收利用率低等,由于其在体外的酯化,侵入体内后其代谢的过程中产生甲醛和新戊酸,而它们可能是ADV对于肾脏损伤的主要原因。另外,ADV最终在体内发挥其抑制HBV复制,绝大多数还是要形成三磷酸,虽然ADV二磷酸可能有抑制HBV复制的作用。

表1 核苷(酸)类似物的分类方法

代表药物	基本结构				耐药通道
	1	2	3	4	5
LAM	C	嘧啶类	核苷类	左旋核苷类	L181M/L180M、M204V/I
LdT	T	嘧啶类	核苷类	左旋核苷类	L181M/L180M、M204I
ETV	G	嘌呤类	核苷类	环戊烷类	L181M/L180M + M204V/I + A181V + N236T + T184/S202/M250
ADV	A	嘌呤类	核苷酸类	无环核苷类	A181V、N236T

第4种:左旋核苷(酸)类似物、无环核苷(酸)类酸和环五烷类,左旋核苷(酸)类主要包括:LAM和LdT,左旋不同于右旋,因为人体利用核苷主要是右旋核苷,药物研制成左旋主要是降低其毒副反应;无环核苷(酸)类酸:ADV;环五烷类:ETV。

第5种:最近根据运用后变异点的不同或者运用耐药变异位点通道不同分为3类:L181M/L180M、M204V/I,代表药物有LAM和LdT,但LdT以M204I变异为主;A181V、N236T变异位点代表药物有ADV;第3类是在上述两种变异位点的基础上加上ETV特异耐药位点T184或S202或M250即所谓的高基因屏障的药物ETV。

当然还有以低基因屏障和高基因屏障的分类方法:高基因屏障有ETV,除了ETV外的其他3种:LAM、ADV和LdT属于低基因屏障,其实是第5种分类方法的进一步阐述。

对于核苷(酸)类似物进行分类的目的是为了方便治疗时药物的选择,即尽量不要选用同类药物的联合和替换进行治疗。在对已经上市药物分类后,综合目前所有的分类方法,可以看出在分类上雷同越多,在联合或耐药后替换治疗选用的次序越后。根据抗生素运用的经验,(当然抗病毒药物广义上也是抗生素),联合和替代治疗时应该尽量避免选用同类药物。

二、有待于认同新的分类方法

核苷(酸)类似物早就运用于抗 HIV 及其他病毒治疗,但在抗 HBV 的运用时间不长,起初也是受核苷(酸)类似物治疗 HIV 重叠 HBV 感染启发,因而基于抗 HIV 核苷(酸)类药物运用经验或者说从抗 HIV 药物筛选了部分抗 HBV 的药物,笔者还有一种新的分类方法,有待于进一步认同,见表 2。

表 2 已经或者可能上市抗 HBV 的核苷类似物药物分类

	嘧啶类			嘌呤类	
	C	T	U	A	G
第 1 代	LAM	LdT	X	ADV	ETV
第 2 代	恩曲他滨 (F-LAM)	克拉夫定 (F-LdT)	X	替诺福韦酯 (CH3-ADV)	?
第 3 代(研制方向)	降低其耐药变异?		X	降低毒副反应	降低毒副反应、降低基因屏障

注:“X”,目前还没有此类药物的研制;“?”,有无必要进一步研制下一代产品

第 1 代核苷(酸)类似物 LAM、LdT、ETV 和 ADV 分别是 C、T、G 和 A 的第 1 代产品,即根据 4 种不同碱基已经研发了抗 HBV 的第 1 代产品。

可能的第 2 代产品:根据不同碱基在第 1 代基础正在研制的且 FDA 已经批准进入Ⅲ期或在部分地区上市的药物,有恩曲他滨(FTC:F 基化的 LAM);克拉夫定(2007 年南韩上市,但 2009 年 4 月 FDA 由于其线粒体的毒性而已经终止其Ⅲ期临床试验):F 基化的 LdT;替诺福韦酯 TDF:(欧盟 2008 年 4 月 25 日于 EASL 会议上宣布在欧盟地区正式上市,在 USA 于 2007 年 11 月 25 日向 FDA 申请进入抗 HBV fast track 审批):甲基化的 ADV。这三种分别是 C、T、A 碱基的第 2 代产品,但 G 无第 2 代类似物进入Ⅲ期临床试验。

那么对于正在研制的抗 HBV 的药物进行总结,见表 3~4。2006 年初上市 3 种、嘌呤类 2 种、嘧啶类 1 种;在 FDA 批准在研制的有 13 种,嘌呤类 9 种、嘧啶类 4 种;2007 年初上市的 4 种,嘌呤类 2 种、嘧啶类 2 种;研制的减少为 10 种,嘧啶为 3 种、嘌呤 7 种;2007 年底研制的减少为 8 种,嘧啶 3 种、嘌呤类为 5 种;到 2008 年 4 月 25 日欧盟上市 TDF 后研制的嘧啶为 4 种、嘌呤为 3 种,共 7 种研制,到 2009 年 6 月研制的减少为 5 种,去掉 CLV 和 ANA380,见表 3。

三、有无必要进一步研发新的核苷(酸)类似物以及研制的方向

如果要进一步研制核苷(酸)类抗 HBV 药物,理想的药物应为抗 HBV 强度和速度快,耐药发生低,但难以达到理想的状态。笔者对于已经上市或者正在研制的核苷(酸)类似物进行总结分析后发现,务实的发展方向为:对于嘧啶类的主要是设法降低其耐药变异发生率的新药,对于嘌呤类主要是降低其毒副反应;对于 ETV 更新产品应该是降低其耐药基因屏障,而不是多数认为发展高基因屏障的药物。

为何研制 G 类似物的低基因屏障药物,如果从运用 ETV 诱导或者筛选出所谓的高基因屏障的病毒株,运用目前的其他任何一种药物进行治疗效果都很差或

者说没有药物可以控制高基因屏障的耐药变异,故可能会引起耐 ETV 的 HBV 株的公共卫生问题,所以核苷(酸)类似物的耐药变异位点越少,而且发生耐药的机会又少,是理想的。

四、对于核苷(酸)类似物毒副反应的讨论

核苷(酸)类似物在抗 HIV 治疗中已经积累了丰富的经验,其毒副反应人们已得到了充分的认识,在抗 HBV 治疗的用量相对于抗 HIV 剂量较小,且目前上市的核苷(酸)类似物主要的修饰局限于戊糖的改造。所以,与抗 HIV 治疗的核苷(酸)类似物相比,其毒副反应相对较低。对于上市和研制的药物总结见表 1~4。嘌呤类抗 HBV 的效果可能优于嘧啶类,而嘧啶类抗 HBV 耐药变异率较高,嘌呤类不良反应较大,嘧啶类不良反应较低。因此,在运用年龄上,嘌呤类对于年龄上的要求相对高于嘧啶类,嘌呤类剂量较低除了与其体内容易达到有效治疗浓度外,与其较大剂量时毒副反应增加也有一定的关系,例如由于 ETV 在体内首次磷酸化比较容易,所以其用量为上市的 4 种核苷(酸)类似物中最低,但其抗 HBV 的强度和速度较快。最近,美国最新的研究表明 ADV 运用在 2~18 岁的儿童,没有发现有明显的毒副反应,且取得了理想的疗效,但 4 种 FDA 批准上市的抗 HBV 药物中,唯有 LdT 被批准为 B 级药物。LdT 未说明可以在孕妇运用,也没有在孕妇中运用的循证医学证据,故在孕妇中运用核苷(酸)类似物抗 HBV 治疗必须慎重。就目前运用有争议的 HBIG 及乙肝疫苗阻断母婴传播,已经可以达到 90% 甚至 95%,运用核苷(酸)类似物特别是 LdT 或 LAM 预防 HBV 母婴垂直传播时应该慎重,目前也缺乏循证医学证据。如果在孕期母亲发生重型肝炎或肝炎重度活动时,选用所谓的 B 级核苷(酸)类似物可能对于母婴是有益的。

表 3 FDA 或欧盟批准治疗或在验证的抗 HBV 药物种类

时间	上市			验证		
	嘧啶类	嘌呤类	合计	嘧啶类	嘌呤类	合计
2006 年	1	2	3	4	9	13
2007 年初	2	2	4	3	7	10
2007 年末	2	2	4	3	5	8
2008 年 4 月	2	3	5	4	3	7
2009 年 6 月	2	3	5	3	2	5

表 4 2007 年末 FDA 批准正在临床验证的抗 HBV 核苷(酸)类药物

分期	模拟碱基				合计
	C	T	A	G	
II	ValtorecitabineRCV; Racivir	X	Pradefovir; Remofovir	AmdoxovirDAPD?	5
III	emtricitabine	clevudine	Tenofovire; TDF	X	3

注:表格中“X”:目前还没有此类药物的研制

五、关于核苷(酸)类似物联合治疗问题的讨论

1. 发生耐药后联合:理论上如果体内没有对某种药物的耐药株存在,只运用一种药物治疗最为经济 and 合理,也不是所有存在的耐药株都需要治疗,存在一定量对某一种药物耐药的致病株,才需要真正治疗。所以,目前对运用一种核苷(酸)类似物药物治疗发生耐药后多数主张加或者换药的观点,存在一定的不足。例如运用 LAM 病毒发生变异后治疗,如果是由于 LAM 敏感株减少,而将耐药株筛选出来或诱导出耐药变异株,只要体内没有 LAM 敏感株,再用 LAM 理论上没有必要。那么,目前多数治疗指南主张联合治疗,主要是担心停用 LAM 后单用 ADV,由于体内的 LAM 敏感株只是减低到目前检测的低限或者没有完全消失的 ccc DNA,所以停用 LAM 一段时间后,由于体内 LAM 的耐药株被 ADV 抑制,而 ADV 对于 LAM 敏感株抑制能力较差或者没有效果,导致部分患者单用 ADV 后病毒载量再次升高。

2. 对于初治患者的联合运用的问题:核苷(酸)类似物抗 HBV 的作用机制为竞争性消耗 HBV DNA 聚合酶或者竞争性抑制 HBV DNA 聚合酶的活性。任何一种核苷(酸)类似物都具有链终止的作用,根据 DNA 末端终止法测序原理和抗 HIV 治疗的经验推理,四种核苷(酸)类似物的联合治疗,类似于抗 HIV 的 HAART 中特定抑制剂或联合治疗,可能也是抗 HBV 治疗方向之一,即理论上运用含有四种核苷(酸)类似物的一片药物,可以在 HBV 复制的任何一个位点将 HBV 复制终止,而单用一种药物如 LAM,必须等到病毒复制含有 C 核苷酸时才能将其终止。所以,含有四种核苷(酸)类似物的联合治疗能在较短时间内将病毒复制抑制到最低程度,而病毒降低愈快发生药物诱导变异的可能性越低;另外一方面,理论上运用含有四种核苷(酸)类似物的特定抑制剂治疗,也不允许 LAM-R 累积到一定量,即体内一旦出现对 LAM-R 耐药变异株时,由于特定抑制剂中含有 ADV,而发挥抗 LAM-R,但从成本和效益分析上讲,联合治疗决不是单纯的 LAM 100 mg + LdT 600 mg + ADV 10 mg + ETV 0.5 mg,需要摸索出有效配比剂量,在 EASL 会议后的 CME 最后部分也提出了对于联合治疗中不同药物配比剂量问题的探讨。对于多数病毒 DNA 中 G + C 的含量约等于 A + T,但由于每一种核苷(酸)类似物结合抑制 HBV DNA 聚合酶的能力不同,对于较少产生耐药株的敏感的药物,可以适当减少其在特定抑制剂中含量。

以后核苷(酸)类似物抗 HBV 发展的方向也借鉴 β -内酰胺抗菌素运用时为了预防耐药的方法,即 β -内酰胺类抗菌素 + 酶抑制剂,运用一种药物加上对于耐药变异有效的药物作为辅助药物。如果能研制一种含有核苷(酸)类似物加多种变异株有效的抑制药物,对于容易发生耐药的患者初治时即可以运用,或者适当配以较大剂量的耐药变异株抑制剂。以后的研制也可以一种药物为主,辅以对发生常见耐药变异有效的抑制剂。

目前的联合方法主要是:嘧啶类核苷(酸)类似物 + 嘌呤类核苷酸类,即 ADV + LAM, LdT + ADV, FDA 批准的临床验证的 Truvada: FTC + TDF。对于

初治和治疗失败后的联合,选好药物后的治疗,最佳剂量的搭配实际上应该有所差别,例如初治患者,应用 LAM + ADV 时,ADV 可以适当少些,而运用 LAM 后出现 LAM-R 治疗的联合,理论上应该是 LAM 适当减少而 ADV 适当增加的联合。选好联合药物后,对于不同药物的剂量配比,初治患者还是发生耐药变异后配比应该存在一定差异。联合应用时药物较其单一运用效能低,如强弱联合,由于联合时其他药物的干扰,不可能发挥单一运用时应有的作用,所以剂量搭配的问题需要进一步摸索。

六、部分患者发生某种核苷(酸)类似物耐药后考虑停药

抗菌治疗经验告诉我们,一旦发生菌群失调,停用抗菌素对于部分患者不失为一种理性的选择。单药序贯治疗目前没有一种可靠的预测疗效的指标。嘧啶类 LAM、LdT 及 ETV 的抗病毒强度或者速度已经达到临床要求,运用后由于敏感株减少,敏感株和耐药株制约失衡(敏感株减少),耐药株早期复制能力(fitness)较低,过一段时间后发生补偿性变异(继发性变异),其复制能力增加,即早期病毒没有明显的升高,如果早期停药使敏感株复制增加,即敏感株与耐药株发生拮抗作用,可以在早期抑制耐药株的复制。如同 HBV 1896 变异后可能由于病毒复制能力减低,而继发或者同时发生 BCP 1762 和 1764 位点的变异,使变异的病毒株生活能力增强而得以存活。

总之,目前核苷(酸)类似物抗 HBV 的治疗还存在许多问题,应该多研读一些有关核苷(酸)类似物的基础知识,结合我国的实际情况:我国是乙型肝炎的高流行区,但在研制药物方面没有一定经济实力公司作为后盾,许多 HBV 感染的患者,希望相关专家能组织对于已经上市的药物进行治疗方案探讨,运用循证医学证据来制定符合我国国情的“科学的实践指南”——对于核苷(酸)类似物运用切不可盲从、盲听和盲干。

(收稿日期:2008-06-24)

(本文编辑:孙荣华)

颜学兵,周培培,王磊.从核苷类似物基础结构分析其运用和发展方向[J/CD].中华实验和临床感染病杂志:电子版,2010,4(1):102-107.