

ProTide 技术研究进展及其在抗病毒药物研究领域中的应用

周慧宇, 朱梅, 王玉成*

(中国医学科学院、北京协和医学院医药生物技术研究所, 北京 100050)

摘要: ProTide 技术是由 Christopher McGuigan 团队开发的一种前药设计策略, 其特征是将核苷类似物以磷(膦)酰化的方式引入芳氧基和氨基酸酯, 形成芳氧基磷(膦)酰胺酯前药。ProTide 技术能够使核苷类似物高效透过细胞膜并避开单磷酸化限速步骤, 有效解决了核苷类药物难以被细胞摄取、磷酸化效率低等问题。目前, ProTide 技术已广泛应用于抗病毒药物研发领域, 孕育出了包括 sofosbuvir 在内的多款抗病毒重磅药物以及临床候选药物, 对小分子抗病毒药物的研发进程产生了重要影响。本文对 ProTide 技术的发展历程及其特点进行了简要介绍, 并概述了近年来 ProTide 技术在抗病毒药物研究领域的应用情况, 期望为后续抗病毒药物的设计与开发提供参考。

关键词: ProTide; 药物设计; 前药; 磷(膦)酰胺酯; 抗病毒

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1540-17

Research progress of ProTide technology and its application in the development of antiviral drugs

ZHOU Hui-yu, ZHU Mei, WANG Yu-cheng*

(*Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

Abstract: ProTide technology is a kind of prodrug design strategy invented by the team of Christopher McGuigan. ProTides are aryloxyphosphoramidates (or aryloxyphosphonamidates) which contain a phosphorus atom combined with an amino acid ester and an aryloxy group. These prodrugs can efficiently cross the cell membrane and escape from the first rate-limiting step of phosphorylation, which afford effective solutions to the drawbacks of current nucleoside analogues. At present, ProTide technology has been extensively applied in the field of antiviral research. It has been successful in providing a number of approved drugs and clinical candidates, such as sofosbuvir and so much more, highlighting the promising future in drug discovery. This review summarizes the brief history and characteristics of ProTide technology, as well as its application in the exploration of antiviral drugs.

Key words: ProTide; drug design; prodrug; phosphoramidate (or phosphonamidate); antiviral

在社会发展过程中, 病毒对人类的生命健康造成了严重危害。目前已知的致病病毒多达 200 余种, 引发了多种传染性疾病, 如病毒性肝炎、流行性感冒、麻疹、水痘、艾滋病等^[1]。此外, 2009 年 H1N1 流感疫情、2014 年脊髓灰质炎疫情、2016 年寨卡病毒疫情、2018

年埃博拉疫情、2019 年新型冠状病毒疫情以及 2022 年猴痘疫情等多起国际公共卫生紧急事件也都是由病毒引发。在人类与病毒的斗争中, 抗病毒药物发挥着举足轻重的作用, 因此抗病毒药物的研发与全人类的健康福祉息息相关。

在目前已上市的抗病毒药物中, 核苷类药物 (nucleoside analogues, NAs) 占半数以上。该类药物进入细胞后, 在激酶的作用下经磷酸化依次转化为单磷酸核苷 (nucleoside monophosphate, NMP)、二磷酸核苷

收稿日期: 2022-11-14; 修回日期: 2022-12-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82204207).

*通讯作者 Tel: 86-10-63165263, E-mail: wangyucheng@imb.pumc.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1210

(nucleoside diphosphate, NDP) 和三磷酸核苷 (nucleoside triphosphate, NTP) (图 1), 进而与病毒聚合酶或逆转录酶结合, 掺入病毒 DNA 或 RNA 链中, 从而阻断病毒的复制^[2-4]。但由于与天然核苷存在结构上的差异, 激酶对核苷类药物的亲和力十分有限, 单磷酸化过程成为药物代谢过程中的限速步骤, 在很大程度上限制了活性二磷酸及三磷酸核苷的形成, 从而影响了核苷类药物的抗病毒活性^[5,6]。此外, 核苷类似物多为亲水性分子, 主要依靠转运蛋白促进扩散方式跨膜转运, 这导致核苷类药物的膜透过性较差, 难以被细胞摄取^[7]。

为提高核苷类化合物的磷酸化效率、改善生物利用度、增强治疗效果, 磷(膦)酸酯前药策略在核苷类药物的研发过程中被广泛使用^[8-11]。由英国卡迪夫大学 Christopher McGuigan 团队首创的 ProTide 技术 (PROdrug + nucleoTIDE) 是目前最成功的前药设计策略之一^[11,12], 其特征是将核苷类似物以磷(膦)酰化的方式引入芳氧基和氨基酸酯, 形成芳氧基磷(膦)酰胺酯, 即 ProTide (图 2A)。该前药设计策略能够有效改善母体药物的理化性质, 使其更容易透过细胞膜, 同时也能够提高代谢活化效率, 增强药物的生物利用度和抗病毒活性^[4,12-14]。近年来 ProTide 技术在抗病毒药物研究领域大放异彩, 目前已有多种 ProTide 药物应用于临床, 包括丙型肝炎病毒 (hepatitis C virus, HCV) 感染治疗领

域具有跨时代意义的“重磅炸弹”药物 sofosbuvir (1)、人类免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 感染和乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染治疗药物 tenofovir alafenamide (2, TAF) 及美国食品和药品管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的首个新型冠状病毒 (SARS-CoV-2) 感染治疗药物 remdesivir (3) 等 (图 2B)^[3,15-18]。随着 ProTide 技术的日益成熟, 其优化对象目前已逐步扩展至非核苷类化合物^[19]。ProTide 技术的成功开发与应用深刻影响了小分子抗病毒药物的研发进程, 具有极为广阔的发展空间。本文拟对 ProTide 技术的发展历程及特点进行简要介绍, 并对其在抗病毒药物研发领域的应用进行综述, 以期为后续抗病毒药物的设计与开发提供借鉴和参考。

1 ProTide 技术发展历程

在核苷类药物的研发探索中, 研究者发现磷(膦)酸酯基团的引入能有效改善核苷类似物磷酸化效率低的问题。但是在生理条件下 (pH = 7.0~7.4), 磷(膦)酸酯片段易失去质子而表现出较强的极性, 药物依旧难以透过细胞膜^[4, 20]。因此, 如何将药物更有效地传输到细胞内成为研究者们关注的重点。自 20 世纪 90 年代起, Christopher McGuigan 团队开始对核苷磷(膦)酸酯前药进行探索^[21,22], 逐步建立起了利用芳氧基和氨基酸酯掩蔽磷(膦)酸基团的 ProTide 技术, 其发展历程

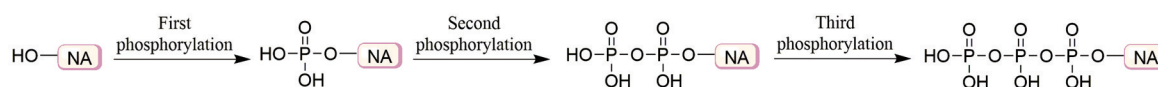


Figure 1 The intracellular activation of nucleoside analogue

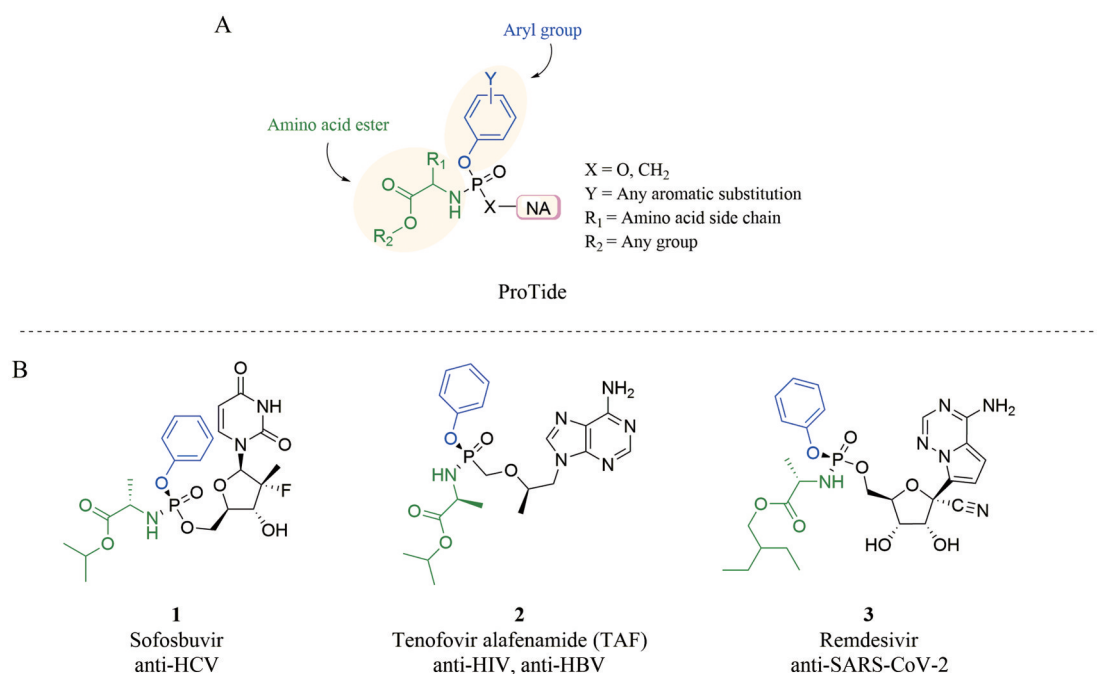


Figure 2 (A) General structure of ProTide; (B) Chemical structures of the three FDA-approved ProTides

大致可分为6个阶段(表1)^[4,23]。

Christopher McGuigan 团队首先尝试用简单烷氧基及卤代烷氧基对磷酸基团进行掩蔽以提高化合物的亲脂性,但这些基团在体内难以被水解脱落,因而化合物的活性并没有得到明显改善^[21,22,24-27]。在此基础上,该团队对烷氧基及卤代烷氧基磷酸酯前药进行了探索,并取得了突破性的进展:氨基酸酯侧链的引入能显著提高母体化合物的抗病毒活性,其中以L-丙氨酸(L-Ala)酯效果最佳^[28-30]。于是,该团队尝试引入两个氨基酸酯侧链形成磷酸二酰胺前药,但结果却不甚理想^[31]。此外,用乙醇酸酯或乳酸酯代替氨基酸酯所形成的磷酸酯前药同样效果不佳^[32]。在后续研究中,该团队将目光投向了芳香基团并制备得到了一系列二芳氧基磷酸酯前药,此类前药的抗病毒活性与母体化合物相比得到了显著的提高,这是ProTide技术发展过程中的另一巨大突破^[33-35]。在上述工作的基础上,该团队用芳氧基和氨基酸酯对磷酸基团进行掩蔽,获得了具有良好透膜性且抗病毒活性显著的芳氧基磷酸酯前药,ProTide技术由此诞生^[33,36,37]。

2 ProTide药物的代谢模式及活性影响因素

与核苷类似物不同,ProTide分子(I)通过被动扩散方式透过细胞膜^[23,38]。进入细胞后,首先经酯酶[如组织蛋白酶A(CTSA)、羧酸酯酶1(CES1)]催化,发生氨基酸酯酯基的水解,生成中间体(II)。接着,中间体(II)发生分子内亲核取代反应,芳基离去,形成瞬时五元环状中间体(III),继而经水解开环生成磷(膦)酰胺代谢产物(IV)。IV经磷酰胺酶[如三联组氨酸结合蛋白1(HINT1)]催化,发生磷-氮(P-N)键断裂,释放出单磷(膦)酸核苷(V)。单磷(膦)酸核苷(V)经两次磷酸化最终形成活性的三磷(膦)酸核苷(VI)(图3)^[4,11,12,39-44]。

研究表明,ProTide的活性除与母体化合物有关还受到掩蔽基团性质的影响,具有较强亲脂性且易于水解的掩蔽基团对化合物的活性更为有利^[45]。其中,芳香基团是决定ProTide亲脂性的重要因素之一,以萘氧基和苯氧基取代最为常见^[46]。对于氨基酸酯基团而言,酯基是影响ProTide亲脂性的又一重要因素,此外,酯基也会影响氨基酸酯的水解速度,通常以短链的伯、仲烷基及苄基为宜^[45]。除酯基外,氨基酸的性质也会

Table 1 The developmental stages of the ProTide technology

Stage	Type	General structure
Stage 1	Alkyl and haloalkyl phosphate ester	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_1)(\text{OR}_2)$ <p>$\text{R}_1 = \text{Et}, n\text{-Pr}, n\text{-Bu}, n\text{-Pentyl}, -\text{CH}_2\text{CCl}_3, -\text{CH}_2\text{CF}_3, \text{et al.}$ $\text{R}_2 = \text{Et}, n\text{-Pr}, n\text{-Bu}, n\text{-Pentyl}, -\text{CH}_2\text{CCl}_3, -\text{CH}_2\text{CF}_3, \text{et al.}$</p>
Stage 2	Alkyloxy and haloalkyloxyphosphoramidate	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR})-\text{NHPr}$ $\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}$ <p>$n = 1, 2, 3, 4, 5$</p> $\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_2)-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}_1$ <p>$\text{R}_1 = \text{H}, \text{Me}, i\text{-Pr}, -\text{CH}_2-i\text{-Pr}, -\text{CH}(\text{Me})\text{Et}, \text{Bzl}$ $\text{R}_2 = \text{Me}, \text{Et}, n\text{-Pr}, n\text{-Bu}, n\text{-Hex}$</p> $\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_2)-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}_1$ <p>$\text{R}_1 = \text{H}, \text{Me}, i\text{-Pr}$ $\text{R}_2 = -\text{CF}_3, -\text{CCl}_3$</p>
Stage 3	Phosphorodiamidate	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}$ <p>$\text{R} = \text{H}, \text{Me}, i\text{-Pr}, -\text{CH}_2\text{Ph}, -\text{CH}_2\text{COOMe}$</p>
Stage 4	Lactyl-derived system	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR}_2)-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}_1$ <p>$\text{R}_1 = \text{H}, \text{Me}$ $\text{R}_2 = \text{Me}, n\text{-Pr}, n\text{-Hex}, n\text{-C}_{12}\text{H}_{25}$ $\text{R}_3 = \text{Me}, \text{Et}$</p>
Stage 5	Diaryl phosphate	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OAr})-\text{OAr}$ <p>$\text{R} = \text{Ph}, o\text{-NO}_2\text{Ph}, m\text{-NO}_2\text{Ph}, p\text{-XPh} (\text{X} = \text{NO}_2, \text{CN}, \text{OMe}, \text{et al.})$</p>
Stage 6	Aryloxy phosphoramidate	$\text{NA}-\text{O}-\text{P}(\text{O})(\text{OR})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{OH})-\text{R}$ <p>$\text{R} = \text{H}, \text{Me}, -\text{CH}_2-i\text{-Pr}, -\text{CH}_2\text{Ph}$ $\text{Ar} = \text{Ph}, p\text{-XPh} (\text{X} = \text{Me}, \text{Et}, \text{F}, \text{NO}_2, \text{et al.})$</p>

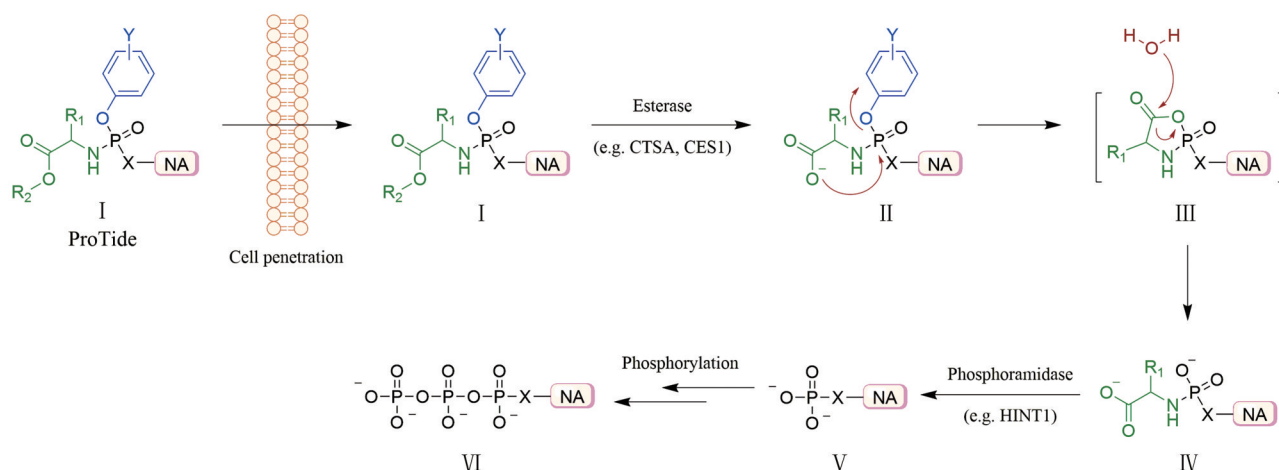


Figure 3 The postulated metabolic mechanism of ProTide

对氨基酸酯的水解速度产生影响,通常以 *L*- α -氨基酸为最佳选择^[47,48],其中 *L*-Ala 在已上市及处于临床研究阶段的 ProTide 药物中最为常见^[13,49]。此外,ProTide 分子中五价磷原子的绝对构型 (S_p/R_p) 也会影响药物的代谢活化效率^[48,50-52]。因此在实际设计与研发过程中,为获得理想的 ProTide 药物,通常会对芳香基团种类、氨基酸类型及酯基结构、磷原子手性等多种因素进行综合考察^[23]。

3 ProTide 技术在抗病毒药物研究领域的应用

ProTide 技术作为一种新颖的前药设计策略受到了研究学者的高度关注并在抗病毒药物研发中得到了广泛应用。近年来,针对 HCV、HIV、HBV 等多种病毒开发的 ProTide 化合物层出不穷,极大地推动了抗病毒药物的研发进程。ProTide 技术在抗病毒药物研究中的主要应用如下。

3.1 ProTide 技术在抗丙型肝炎病毒药物研究中的应用

Sofosbuvir (1, 图 2B) 最早由 Pharmasset 公司开发,后被 Gilead Sciences 公司收购,于 2013 年 12 月获得 FDA 批准用于治疗 HCV 感染,是全球首个获批上市的 ProTide 药物^[15]。Sofosbuvir 口服后经肝脏代谢为 2'-脱氧-2'- α -氟- β -甲基尿苷-5'-单磷酸,后经磷酸化形成活性三磷酸代谢物,从而对 HCV NS5B 聚合酶产生竞争性抑制作用^[40]。Sofosbuvir 是具有 S_p 构型的单一异构体,对野生型 HCV 的抑制活性 (90% 效应浓度 $EC_{90} = 0.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 约是其 R_p 异构体 ($EC_{90} = 7.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 18 倍,对 S282T 及 S96T 耐药株的抑制活性 ($EC_{90}(\text{S282T}) = 7.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{90}(\text{S96T}) = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别是其 R_p 异构体 ($EC_{90}(\text{S282T}) > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{90}(\text{S96T}) = 1.3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 13 和 12 倍。此外,在原代人肝细胞中, S_p 异构体产生三磷酸代谢物的水平比 R_p 异构体高 14%^[50]。临床试验证明,sofosbuvir 具有疗效显著、安全性高、耐药屏障高

等特点,可用于 1~6 型 HCV 感染的治疗,其中对 2 型和 3 型 HCV 感染患者的治愈率可高达 90%^[53-56]。此外,sofosbuvir 也同样适用于 HCV 合并 HIV 感染患者以及准备接受肝移植的肝癌患者^[57]。Sofosbuvir 的出现在丙肝治疗史上具有里程碑式的意义。

Alfosbuvir (4, SH229, 图 4) 是由南京圣和药业股份有限公司自主研发的国内首个 HCV NS5B 聚合酶抑制剂。临床前研究结果表明,alfosbuvir 的体外抗病毒活性 (半数效应浓度 $EC_{50} = 10.4 \sim 38.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 sofosbuvir 的 2~3 倍。两项临床 I 期试验表明,alfosbuvir 安全性高且耐受性好,具有良好的药代动力学性质,能够与其他抗 HCV 药物联合使用。一项对 124 例 HCV 感染患者进行的临床 II 期试验表明,96% 的受试者在接受 12 周 alfosbuvir (400、600 或 800 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 与 daclatasvir (60 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 联合治疗后获得 SVR12 (治疗终点后 12 个月随访时 HCV-RNA 阴性),没有观察到与治疗有关的严重不良事件,没有受试者因不良事件停药^[58]。一项临床 III 期试验结果显示,326 例 HCV 感染患者在接受 12 周 alfosbuvir (600 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 与 daclatasvir (60 $\text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 联合治疗后,98.5% 的受试者获得了 SVR12,除 1 例失访外,这些受试者在治疗结束第 24 周均继续获得了持续病毒学应答 (SVR24)。用药过程中出现的常见不良反应为高胆固醇血症,未发生受试者死亡事件^[59]。总体而言,alfosbuvir 具有疗效显著且安全性高的特点,目前正处于申报上市阶段。

ASC-21 (5, MIV-802, 图 4) 是由 Medivir AB 公司研发的一种 HCV NS5B 聚合酶抑制剂。临床前研究表明,ASC-21 对 HCV NS5B 聚合酶具有较强的抑制作用 (半数抑制浓度 $IC_{50} = 0.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),对各基因型 HCV 的抑制活性 ($EC_{50} = 17 \sim 58 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 普遍优于 sofosbuvir ($EC_{50} = 48 \sim 210 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$),且具有良好的安

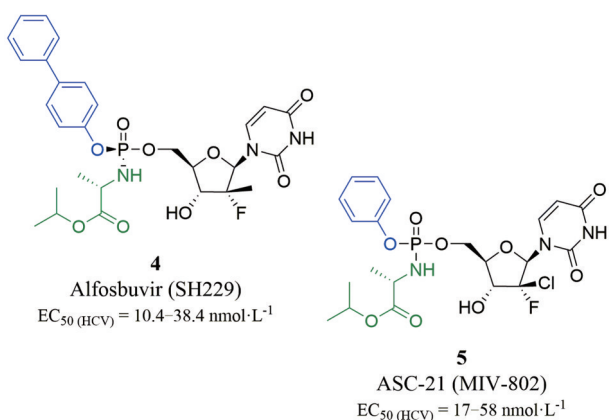


Figure 4 Structures and activities of the anti-HCV ProTides that have reached clinical trials

全性 (细胞半数毒性浓度 $CC_{50} > 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[60]。目前, ASC-21 正处于临床 I 期试验阶段。

此外, Maiti 等^[61]对 2'- β -甲基尿苷 (6)、2'- β -甲基尿苷 (7) 及 2'-脱氧-2'- α -氟- β -甲基尿苷 (8) 进行前药化修饰, 设计并合成了一系列包含 L-Ala、L-天冬氨酸 (L-Asp)、亚氨基二乙酸 (IDA) 酯片段的 ProTide (图 5A), 并对

其进行抗 HCV 活性评价。研究发现, L-Asp ProTide 的优化效果显著, 其中化合物 7a 的抗 HCV 活性 ($EC_{50} = 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较其母体 2'- β -甲基尿苷 (7, $EC_{50} = 6.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 提高了约 210 倍。构效关系研究表明, L-Asp ProTide 的抗病毒活性强弱与 L-Asp 酯片段的结构有关, 酯基的体积越大、亲脂性越强则化合物的抗病毒效果越佳, 如正戊酯及异戊酯类化合物的活性 ($EC_{50} = 0.03\sim 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显优于甲酯类化合物 ($EC_{50} = 1.13\sim 3.71 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。IDA ProTide 未能对母体核苷的抗病毒活性起到改善作用, 这可能是 IDA ProTide 无法在肝细胞中顺利释放出单磷酸核苷所致。初步的代谢研究表明, L-Asp ProTide 可能先在酯酶的催化下发生天冬氨酸酯中 β -羧基酯的水解, 而后逐步释放出单磷酸核苷, 最终转化为三磷酸核苷 (图 5B)。与 L-Ala ProTide 相比, L-Asp ProTide 的最大优势在于 L-Asp 具有双羧基, 可以同时引入两种不同的酯片段来调节化合物的理化性质、改善生物利用度、实现靶向给药, 是抗病毒 ProTide 药物开发的新思路。

Procházková 等^[62]设计并合成了 5'-氮及 5'-硫修饰

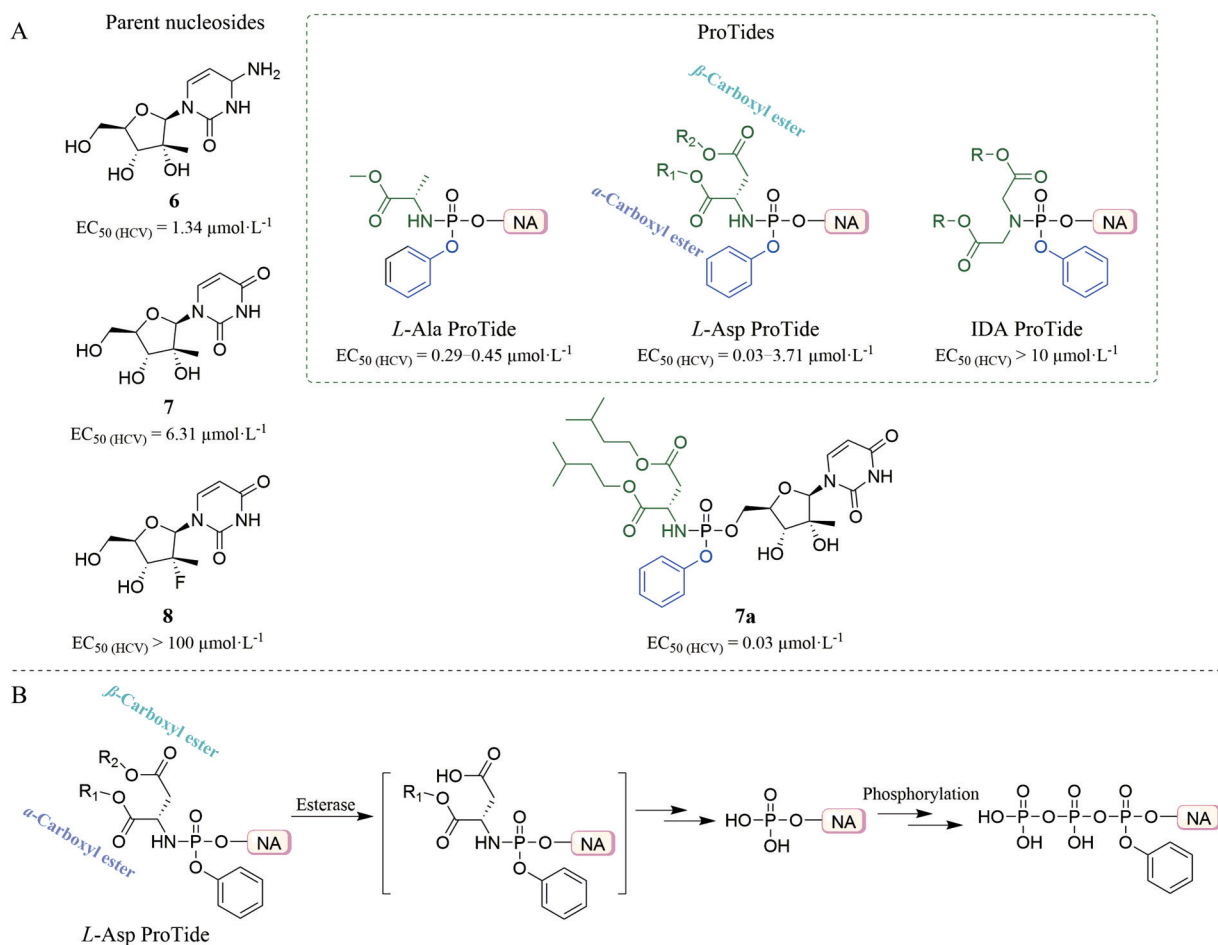


Figure 5 (A) Structures and activities of parent nucleosides 6-8 and their L-Ala ProTides, L-Asp ProTides and IDA ProTides; (B) The postulated metabolic mechanism of L-Asp ProTide

的 2'- β -甲基腺苷 ProTide **9** 和 **10** (图 6), 但这两个化合物均无抗 HCV 活性。研究发现, 化合物 **9** 和 **10** 在细胞内并未经 ProTide 类似的代谢过程产生单磷酸核苷, 而是直接发生了 P-N 及 P-S 键的断裂, 导致活性三磷酸核苷无法顺利生成而使化合物丧失了抗病毒活性, 这为后续 ProTide 药物的研发提供了重要信息。

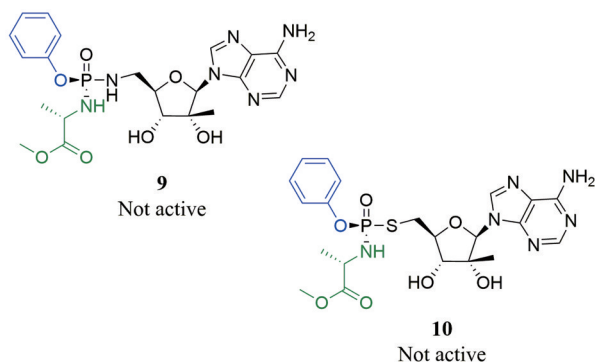


Figure 6 Structures and activities of 5'-*N* and *S* modified 2'- β -methyladenosine ProTides **9** and **10**

3.2 ProTide 技术在抗人类免疫缺陷病毒药物研究中的应用

Tenofovir alafenamide (**2**, TAF, 图 2B) 是由 Gilead Sciences 公司研发的一种 tenofovir (TFV) ProTide, 于 2015 年 11 月获得 FDA 批准用于治疗 HIV-1 感染^[61]。研究发现, TAF 对 HIV-1 的抑制效果 ($EC_{50} = 0.005 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 明显强于相应的 *D*-Ala ProTide ($EC_{50} = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 R_p 异构体 ($EC_{50} = 0.06 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 及其母体化合物 TFV ($EC_{50} = 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和另一种 TFV 前药 tenofovir disoproxil fumarate (TDF, $EC_{50} = 0.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[48]。此外, 与 TDF 相比, TAF 具有更强的血浆稳定性, 能够在淋巴组织中特异性积聚, 并在细胞中经 CTSA 代谢、磷酸化产生具有逆转酶抑制活性的二磷酸代谢物 (TFV-DP)^[41], 可以有效改善因血浆高 TFV 水平而引起的骨密度降低和肾毒性问题^[63]。临床试验结果表明, TAF 治疗效果显著, 耐受性好, 在低剂量 ($25 \text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 下即可达到与 TDF ($300 \text{mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 同样的治疗效果, 具有更高的肾脏及骨骼安全性, 可用于轻度至中度肾损伤 HIV-1 感染患者的治疗^[64-68]。

Kalčić 等^[69]用 *L*-酪氨酸 (*L*-Tyr) 衍生物替换苯酚片段对 TAF 进行了优化改造。采用“一锅法”合成得到了 *L*-Tyr ProTide 的非对映异构体混合物, 通过手性高效液相色谱法将混合物拆分为 fast-eluting epimer (FEE) 和 slow-eluting epimer (SEE), 并利用圆二色谱法、高效液相色谱法等确证 SEE 为 S_p 异构体。活性测试结果显示, SEE 较 FEE 对 HIV-1 具有更强的抑制作用。代谢研究表明, SEE 能够在细胞中快速转化为 TFV, 且 SEE

释放的 TFV 明显多于 FEE。在这些 *L*-Tyr ProTide 中, 化合物 **11** (图 7) 的抗病毒活性 ($EC_{50} = 0.07 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 尤为突出, 较 TAF 提高了近 100 倍, 并且化合物 **11** 也具有更高的选择性指数, 其 SI 值 (142 857) 较 TAF 提高了约 26 倍。对 Tyr 手性中心的研究进一步证实了 *L*-Tyr 结构的重要性, *D*-Tyr 异构体的抗 HIV-1 活性 ($EC_{50} = 0.67 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较化合物 **11** 降低了近 10 倍。稳定性实验表明, 化合物 **11** 在 pH = 1.5~10 范围内较 TAF 具有更强的化学稳定性, 且化合物 **11** 的血浆稳定性也强于 TAF。但在肝微粒体细胞中, 化合物 **11** 因 *L*-Tyr 片段中的酯键易发生断裂而被迅速降解, 这表明化合物 **11** 在口服时可能会存在较明显的首过效应。为提高代谢稳定性, 研究者将 *L*-Tyr 片段中的环戊基酯基替换为环戊基-2-氧代乙基得到化合物 **12** (图 7), 其对 HIV-1 的 EC_{50} 值可达 $6 \text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且具有更高的选择性指数 (SI = 1 533 333)。尽管化合物 **12** 的微粒体稳定性较化合物 **11** 得到了明显改善, 但仍远不及 TAF, 还存在巨大的优化空间。代谢研究表明, 此类 ProTide 优异的抗病毒活性可能与其能够被细胞高效地摄取并代谢为 TFV 的独特性质有关, 这为后续高效抗病毒药物的研究提供了参考。

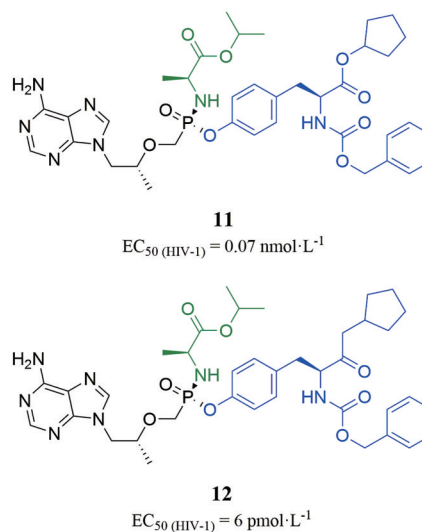


Figure 7 Structures and activities of *L*-Tyr contained TFV ProTides **11** and **12**

Stavudine (**13**, 图 8) 是一种核苷类逆转录酶抑制剂, 用于治疗 HIV-1 感染。Kandil 等^[70]对 stavudine 进行前药化修饰, 设计并合成了一系列 ProTide。生物活性评价结果显示, 多氟芳基取代的化合物 **15** 和 **16** (图 8) 对 1 型和 2 型 HIV 均具有明显的抑制作用, 对 HIV-1 的 EC_{50} 值分别为 0.030 和 $0.037 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 HIV-2 的 EC_{50} 值分别为 0.036 和 $0.047 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均高于母体化合物

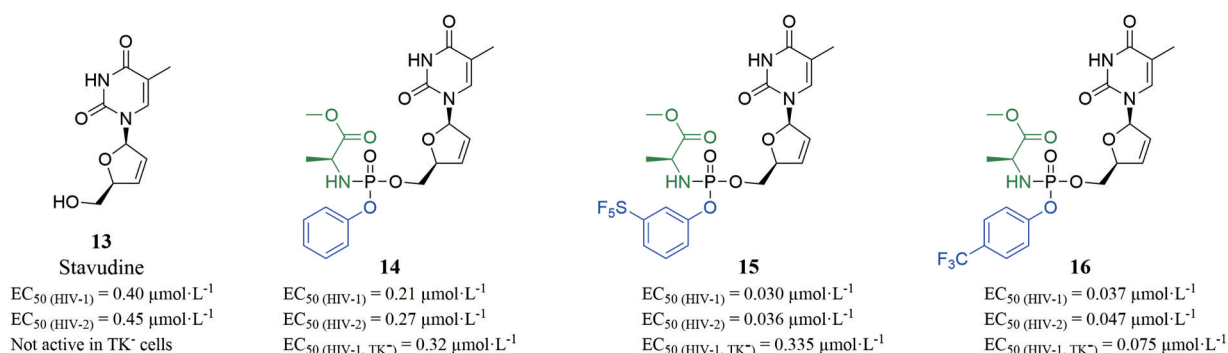


Figure 8 Structures and activities of stavudine and its ProTides 14–16

stavudine (图 8, $EC_{50}(\text{HIV-1}) = 0.40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HIV-2}) = 0.45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 不含氟取代的化合物 **14** (图 8, $EC_{50}(\text{HIV-1}) = 0.21 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HIV-2}) = 0.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 这可能与多氟芳基取代后化合物的亲脂性增强有关。此外, 化合物 **14**~**16** 在胸苷激酶 (TK) 缺陷型细胞中均保持了良好的抗 HIV-1 活性, EC_{50} 值分别为 0.32、0.335 和 $0.075 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 而 stavudine 在此类细胞中完全失活, 说明这些化合物对 TK 介导的磷酸化过程依赖较小, 能有效避开核苷类似物的单磷酸化过程。

此外, 据报道, 抗疱疹病毒药物 acyclovir (**17**, ACV, 图 9A) 经磷酸化后能够对 HIV-1 逆转录酶产生抑制活性^[71]。受此启发, Derudas 等^[72]设计并合成了一系列 ACV ProTide, 其中 *L*-Ala ProTide (图 9A) 具有较好的 HIV 抑制作用 ($EC_{50}(\text{HIV-1}) = 6.2\sim 17.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HIV-2}) = 8.9\sim 42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但部分化合物表现出了一定的细胞毒性 ($CC_{50} \geq 17 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在该研究基础上, 为获得低毒高效的抗 HIV 药物, Derudas 等^[73]通过分子对接技术使用 HIV-1 逆转录酶、腺苷酸激酶或鸟苷酸激酶、人 DNA 聚合酶 γ 对 3 600 个无环核苷类似物进行虚拟筛选, 得到了 5 种具有潜在逆转录酶抑制活性的化合物分子, 并制备了相应的 *mono*-ProTide 和 *bis*-ProTide (**18**~**22**, 图 9B)。活性结果显示, 绝大多数 ProTide 具有较好的抗 HIV-1 活性, 其中化合物 **22** 的 *mono*-ProTide 活性最佳 (**23**, $EC_{50} = 1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 选择性指数为 21。但大部分化合物, 尤其是 *bis*-ProTide, 具有较高的细胞毒性 ($CC_{50} \geq 4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3.3 ProTide 技术在抗乙型肝炎病毒药物研究中的应用 研究发现, TAF (**2**, 图 2B) 不仅能在淋巴组织中特异性聚积, 也能被肝细胞高效摄取并转化为活性代谢物 TFV-DP, 因此除用于治疗 HIV-1 感染外, TAF 同时也可用于 HBV 感染的治疗^[74]。临床试验表明, HBeAg 阴性及阳性 HBV 感染患者在服用 TAF ($25 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 后的治疗效果均与服用 TDF ($300 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 相当, 且服用 TAF 的患者肌酐清除率下降幅度、髌部及脊柱骨密度

降低幅度明显更小, 表明 TAF 具有更高的肾脏及骨骼安全性^[75,76]。2016 年 11 月, FDA 正式批准 TAF 用于 HBV 感染的治疗^[17]。

ATI-2173 (**24**, 图 10) 是由 Antios Therapeutics 公司开发的肝靶向 clevudine 磷酸酯前药, 是一种非竞争性、非链终止的聚合酶抑制剂。ATI-2173 口服后能被肝细胞高效摄取并转化为活性的三磷酸代谢物, 该活性代谢物通过与 HBV 聚合酶活性位点结合并使之发生扭曲而阻断病毒 DNA 的复制^[77,78]。通过采用 ProTide 技术, ATI-2173 避开 clevudine 的单磷酸化过程, 减少了线粒体胸苷激酶 (TK2) 的消耗, 此外, ATI-2173 的肝靶向作用也有效降低了 clevudine 的血浆暴露, 降低了骨骼肌病发生的风险, 具有更好的药代动力学性质和安全性^[78,79]。研究发现, ATI-2173 对 HBV 具有显著的抑制作用 ($EC_{50} = 1.31 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 对心、肝、肾、骨骼肌、骨髓等无明显毒性, 可与其他抗 HBV 药物联合使用^[78]。临床 I 期试验结果显示^[80], HBV 感染患者在接受为期 28 天的 ATI-2173 (10 、 25 或 $500 \text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$) 单药治疗后, 体内 HBV DNA 平均减少 $2.72\sim 2.78 \log_{10} \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。停药后, 在大部分受试者中仍观察到持续的病毒抑制和共价闭合环状 DNA 的减少, 1 名受试者在停药 24 周后体内 HBV DNA 仍低于 $10 \text{ IU}\cdot\text{mL}^{-1}$, 试验过程中没有观察到与治疗有关的严重不良事件。该试验结果证实 ATI-2173 能有效减少 clevudine 全身暴露的风险, 具有良好的抗病毒活性和较高的安全性。目前 ATI-2173 正处于临床 II 期试验阶段。

此外, Kalčic 等^[69]在抗 HIV-1 药物的探索过程中发现, 部分具有 *L*-Tyr 片段的 TFV ProTide 同样具有良好的抗 HBV 活性, 其中非对映体混合物 **25** (图 11) 的抗病毒活性 ($EC_{50} = 0.2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较 TAF ($EC_{50} = 5.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 提高了约 26 倍, 且具有较高的选择性指数 ($SI > 250\ 000$), 具有进一步研究的价值。

3.4 ProTide 技术在抗疱疹病毒药物研究中的应用 Maiti 等^[81]对 brivudin (**26**, BVDU) 及 2'-脱氧腺嘌呤

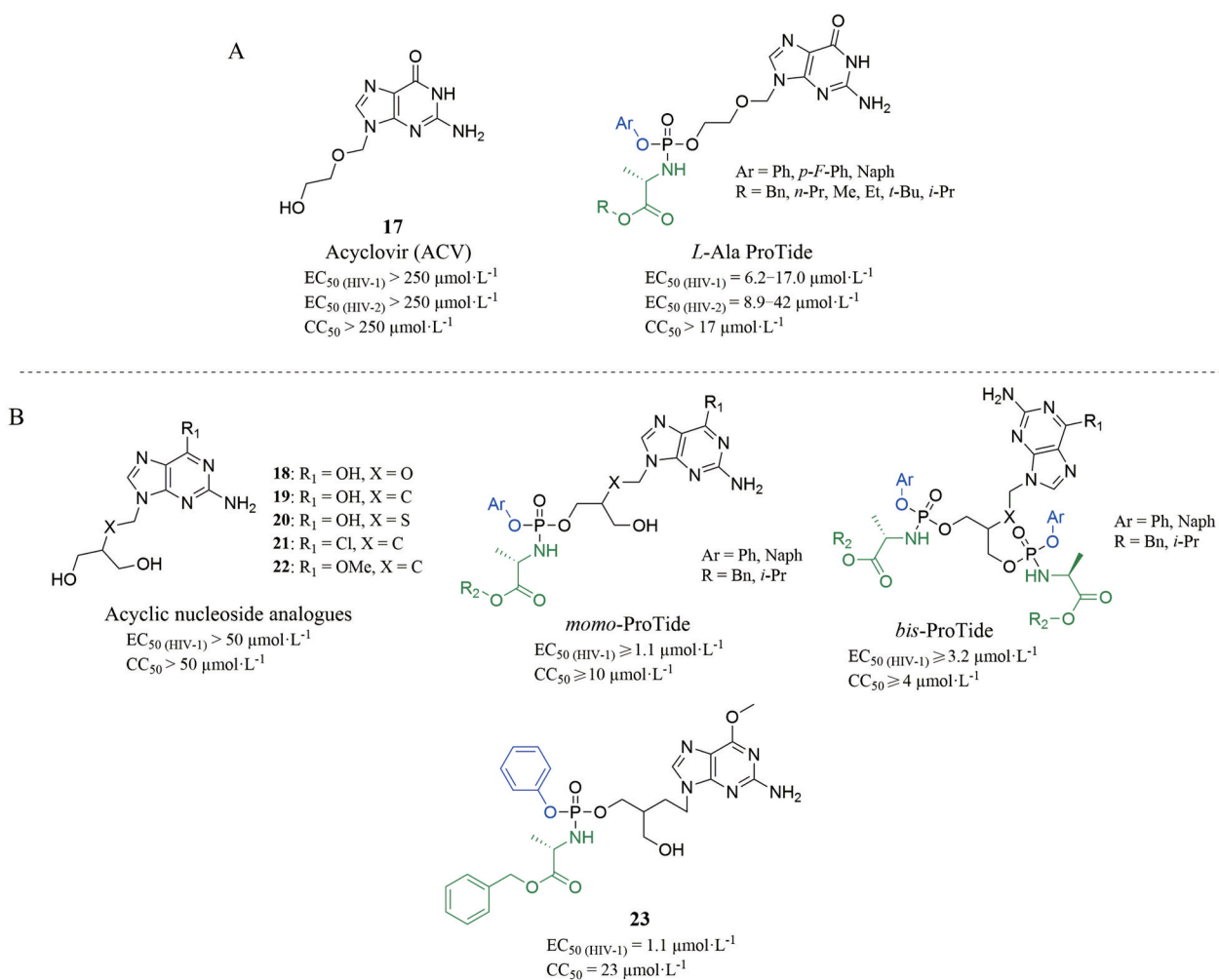


Figure 9 (A) Structures, activities and cytotoxicities of acyclovir and its *L*-Ala ProTides; (B) Structures, activities and cytotoxicities of acyclic nucleoside analogues **18–22** and their *mono*-ProTides and *bis*-ProTides

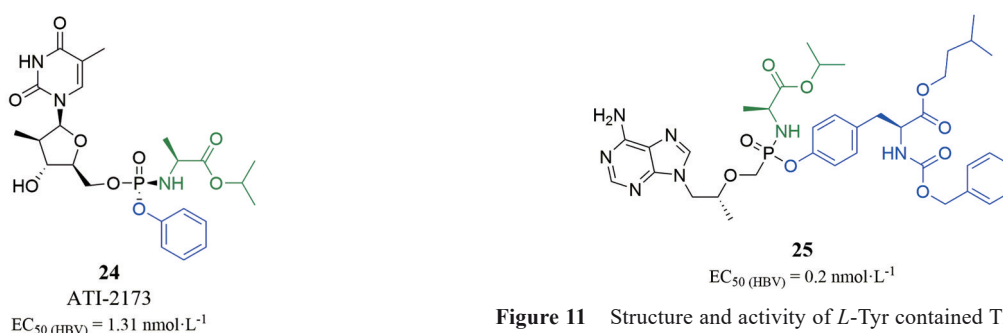


Figure 10 Structure and activity of the anti-HBV ProTide ATI-2173 that has reached clinical trials

核苷类似物 (**27~30**) 进行前药化修饰, 设计并合成了一系列包含 *L*-Ala-Me、IDA-Me 及 IDA-POM 片段的 ProTide 药物 (图 12), 并对其进行抗单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV)、抗水痘-带状疱疹病毒 (varicella-zoster virus, VZV) 和抗巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 活性评价。其中化合物 **31** 和

Figure 11 Structure and activity of *L*-Tyr contained TFV ProTide **25**

32 对 HSV-1 和 VZV 具有较为明显抑制作用, 对 HSV-1 的 EC_{50} 值分别为 0.3 和 $1.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对 VZV 的 EC_{50} 值分别为 0.21 和 $0.34 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 但均不及其母体化合物 BVDU ($EC_{50}(\text{HSV-1}) = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{VZV}) = 0.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。对于 2'-脱氧腺嘌呤核苷类似物及其 ProTide, 除少部分化合物具有抗 VZV 活性 ($EC_{50} = 2.4\text{--}68 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 外, 多数化合物基本不具备抗 HSV、VZV 或 HCMV 作用。

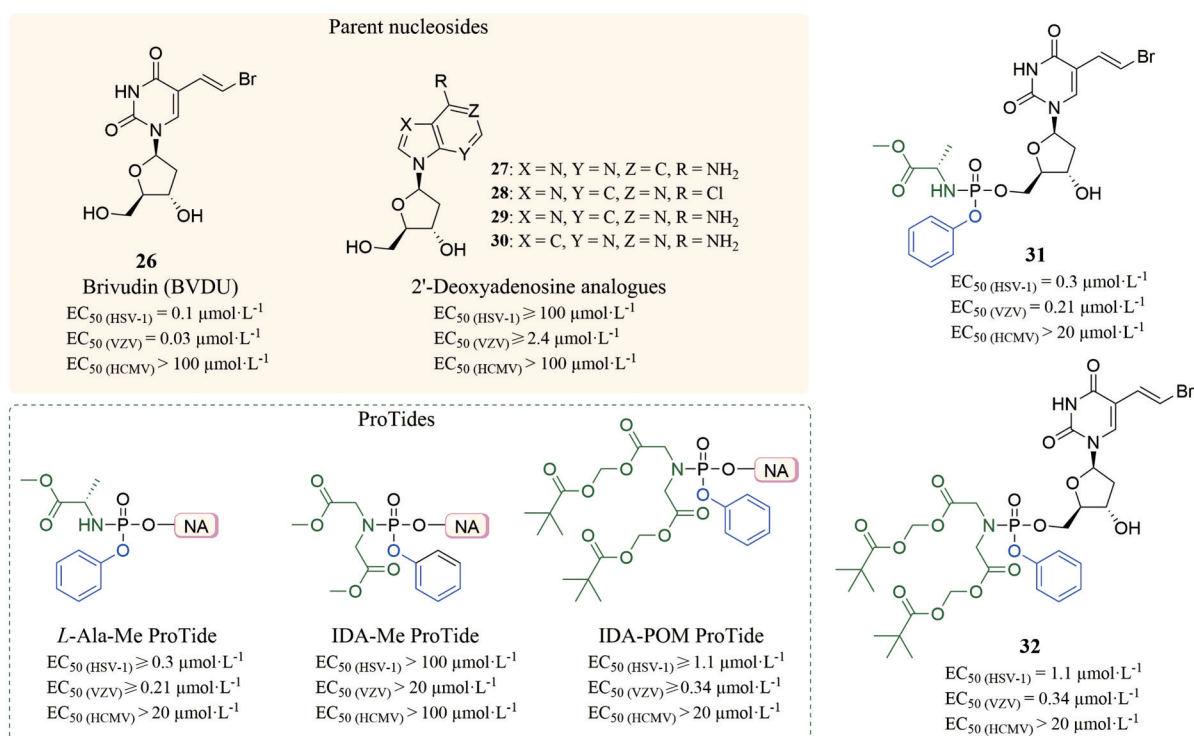


Figure 12 Structures and activities of brivudin, 2'-deoxyadenosine analogues **27–30** and their *L*-Ala-Me ProTides, IDA-Me ProTides and IDA-POM ProTides

Wang 等^[82]对嘌呤核苷类抗 HSV 药物 vidarabine (**33**, ARA, 图 13) 进行前药化修饰, 设计并合成了一系列带有不同氨基酸酯片段的 ProTide。活性测试结果显示, 这些化合物均具有明显的肝靶向作用和较强的抗 HSV-1 活性, 其中化合物 **34** 和 **35** (图 13) 活性最佳, EC_{50} 值分别为 0.52 和 $1.05 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 明显优于其母体化合物 ARA ($EC_{50} = 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

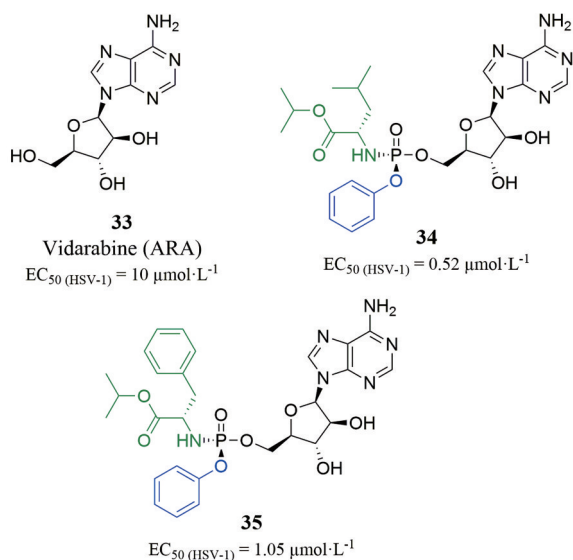


Figure 13 Structures and activities of vidarabine **33** and its ProTides **34** and **35**

Gemcitabine (**36**, 图 14) 是一种嘧啶核苷类抗肿瘤药物, 它对 HCV、HIV-1、寨卡病毒 (zika virus, ZIKV)、甲型流感病毒 (influenza A virus, IAV)、SARS-CoV-2 等 RNA 病毒同样具有抑制活性^[83–87]。为增强 gemcitabine 的抗病毒能力, 降低毒性, Zheng 等^[88]在 gemcitabine 的 4'位引入吸电子基团, 设计并合成一系列 gemcitabine 衍生物及其 ProTide。活性测试结果显示, 与 gemcitabine ($EC_{50}(\text{VZV}) = 0.028 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HCMV}) = 0.074 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 gemcitabine 衍生物 **37** (图 14, $EC_{50}(\text{VZV}) = 0.042 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HCMV}) = 0.815 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相比, 化合物 **38** (图 14) 的抗 VZV 及抗 HCMV 活性 ($EC_{50}(\text{VZV}) = 2.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $EC_{50}(\text{HCMV}) = 15.47 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 均有所减弱。但化合物 **38** 的细胞毒性 ($CC_{50} = 84.35 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较 gemcitabine ($CC_{50} = 0.0036 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 **37** ($CC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 更低, 具有更高的选择性。

3.5 ProTide 技术在抗新型冠状病毒药物研究中的应用 Remdesivir (**3**, 图 2B) 是由 Gilead Sciences 公司研发的一种病毒 RNA 依赖性 RNA 聚合酶 (RdRp) 抑制剂, 对埃博拉病毒 (ebolavirus, EBOV)、SARS 冠状病毒 (SARS-CoV) 和中东呼吸综合征冠状病毒 (MERS-CoV) 等均具有体外抑制活性^[89–92]。2019 年新型冠状病毒肺炎疫情暴发后, Wang 等^[93]发现 remdesivir 对 SARS-CoV-2 具有良好的抑制作用 ($EC_{50} = 0.77 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,

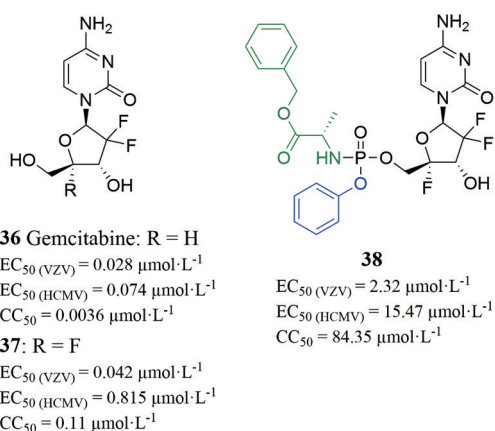


Figure 14 Structures, activities and cytotoxicities of gemcitabine, gemcitabine derivative **37** and gemcitabine derivative ProTide **38**

SI > 129.87), 结合此前 remdesivir 在临床试验中表现出的高安全性^[94], remdesivir 作为治疗 SARS-CoV-2 感染的首批候选药物进入临床^[95]。临床试验结果显示, 不同程度的 SARS-CoV-2 感染患者在接受 remdesivir 治疗后病情均得到有效改善, 治疗过程中主要存在胃肠道反应、转氨酶水平升高、超敏反应等不良反应^[96]。2020 年 10 月, FDA 批准 remdesivir 用于 SARS-CoV-2 感染住院患者的治疗^[18]。

尽管 remdesivir 获得了 FDA 的正式批准, 但部分临床试验结果显示, remdesivir 对 SARS-CoV-2 感染患者的治疗效果并不显著^[97-99], 其疗效仍存在诸多争议。研究发现, remdesivir 的疗效受限可能与其血浆稳定性差、难以在 SARS-CoV-2 感染的主要靶器官 (如肺) 中积聚、抗病毒效果欠佳等因素有关^[100-103]。针对上述问题, Hu 等^[104]在 remdesivir 的基础上对 L-Ala 酯片段进行结构修饰, 引入亚油酸结构, 设计并合成了一系列 remdesivir 衍生物。其中, 化合物 **39** (图 15) 活性最佳, 它对 SARS-CoV-2 及其 4 种突变株的抑制活性 ($EC_{50} = 0.4 \sim 15.9 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 是 remdesivir ($EC_{50} = 3.3 \sim 32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 2~7 倍 (表 2), 且细胞毒性较低 ($CC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。与 remdesivir 相比, 化合物 **39** 具有更强的血浆稳定性和肝微粒体稳定性。静脉注射后, 化合物 **39** 在肺部的浓度约是 remdesivir 的 200 倍, 其产生的活性三磷酸代谢物的浓度约是 remdesivir 的 5 倍, 具有更好的肺靶向性。同时, 化合物 **39** 也更容易被肺上皮细胞摄取并活化, 化合物 **39** 及其活性代谢物的细胞内总浓度约是 remdesivir 的 16 倍。上述结果显示, 化合物 **39** 抗 SARS-CoV-2 效果显著, 具有较大的开发价值。

另外, Zheng 等^[88]在对 gemcitabine 衍生物及其 ProTide 的探索过程中发现化合物 **38** (图 14) 对 SARS-

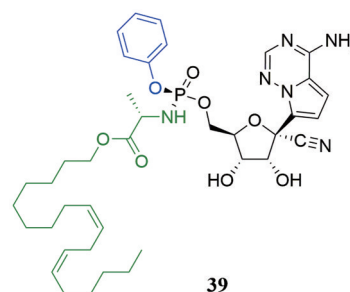


Figure 15 Structure of remdesivir derivative **39**

Table 2 Antiviral activities of remdesivir derivative **39** against SARS-CoV-2 virus and its variants

Compd.	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$				
	SARS-CoV-2	Alpha	Beta	Gamma	Delta
39	0.4	2.5	15.9	1.7	5.6
Remdesivir	3.3	4.7	32	3.7	9.2

CoV-2 具有明显的抑制作用 ($EC_{50} = 0.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 虽然其活性不及母体化合物 **37** ($EC_{50} = 0.096 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但较 hydroxychloroquine ($EC_{50} = 1.74 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 remdesivir (**3**, $EC_{50} = 1.52 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 活性更佳。但是在抗 SARS-CoV-2 活性评价过程中发现, 化合物 **38** 具有较高的细胞毒性 ($CC_{50} = 1.44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (表 3)。

Table 3 Antiviral activities and cytotoxicities of gemcitabine derivative **37** and its ProTide **38** against SARS-CoV-2

Compd.	$EC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$CC_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
37	0.096	0.26
38	0.73	1.44
Hydroxychloroquine	1.74	36.9
Remdesivir	1.52	> 40

3.6 ProTide 技术在抗流感病毒感染药物研究中的应用

Meneghesso 等^[105]发现, 尽管三磷酸尿苷衍生物对流感聚合酶表现出了较好的抑制作用, 但尿苷类化合物的抗病毒活性却普遍较弱, 这可能与尿苷类化合物的低磷酸化效率有关。据此, 该研究团队设计并合成了一系列尿苷衍生物及其 ProTide 以提高尿苷类化合物抗病毒活性和生物利用度。活性测试结果显示, 虽然 2'-脱氧-2'- α -氟尿苷 **40** (图 16) 无抗流感病毒活性 (99% 效应浓度 $EC_{99} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但其 ProTide **41** 和 **42** (图 16) 对流感病毒却表现出了中等的抑制作用, EC_{99} 分别为 49 和 81 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。此外, 含萘氧基片段 ProTide **41** 的抗病毒活性强于含苯氧基片段的 ProTide **42**, 说明增加亲脂性可提高药物的透膜性 (计算脂水分配系数 $\text{Clog}P_{41} = 2.37$, $\text{Clog}P_{42} = 1.20$)。代谢研究表明, 尿苷 ProTide 能够有效地被 CES1 水解并缓慢代谢为单磷酸尿苷。与阳性对照 ribavirin ($EC_{99} = 8.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 相

比, ProTide **41** 和 **42** 的抗流感病毒效果仍相差甚远, 这可能是其代谢为单磷酸尿苷的过程过于缓慢且不完全, 或是单磷酸尿苷转变为二磷酸尿苷和三磷酸尿苷的效率低下所致。

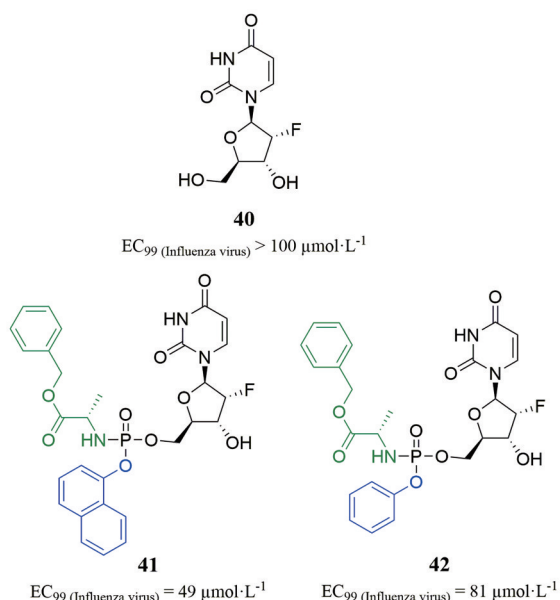


Figure 16 Structures and activities of 2'-deoxy-2'- α -fluorouridine **40** and its ProTides **41** and **42**

随后, Meneghesso 等^[106] 又对鸟苷 ProTide 进行了探索, 设计并合成了一系列 6 位修饰的 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷衍生物及其 ProTide。活性测试结果显示, 6 位修饰的 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷衍生物 **43**~**45** (图 17) 对流感病毒并不具备抑制作用 (EC₉₉ > 100 μmol·L⁻¹)。但是, 6 位修饰的 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷衍生物 ProTide 却在不同程度上表现出了抗流感病毒活性, 其中具有萘氧基和 L-Ala-Me 片段的 ProTide **46**~**48** (图 17) 抗病毒活性最佳 (EC₉₉ = 12~15 μmol·L⁻¹)。分析发现, 亲脂性过高或过低均会对活性产生不利影响, 以 ClogP 值在 2 左右为宜。代谢研究表明, 此类 ProTide 能迅速被 CES1 水解为磷酸酯代谢产物, 但该代谢产物释放出单磷酸鸟苷的过程则较为缓慢。此外, 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷单磷酸 6 位上的取代基能够被腺苷脱氨酶代谢并最终转换为 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷单磷酸, 这可能是具有不同 6 位取代基的 ProTide 表现出了相近抗流感病毒活性的原因, 说明引入合适的 6 位取代基可将 2'-脱氧-2'- α -氟鸟苷衍生物 ProTide 开发为一种双前药, 从而进一步提高化合物被细胞摄取的能力。

3.7 ProTide 技术在抗登革热病毒药物研究中的应用 AT-752 (**49**, 图 18) 是由 Atea Pharmaceuticals 公司开发的 RdRp 抑制剂, 是一种双前药, 对 2 型和 3 型登

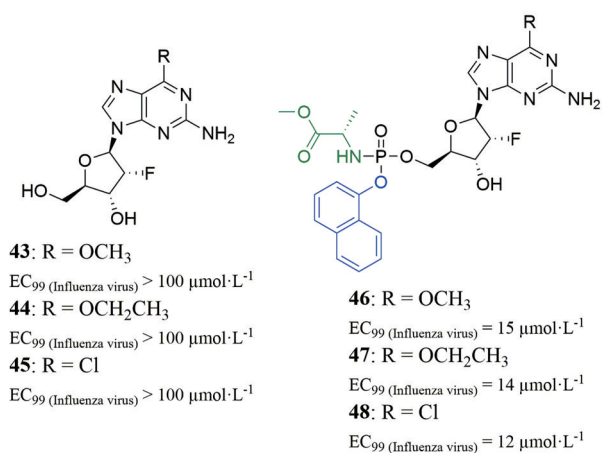


Figure 17 Structures and activities of 6-modified 2'-deoxy-2'- α -fluoroguanosine analogues **43**–**45** and their ProTides **46**–**48**

革热病毒 (dengue virus, DENV) 均具有良好的抑制作用, EC₅₀ 值分别为 0.48 和 0.77 μmol·L⁻¹, 且无明显的细胞毒性 (CC₅₀ > 170 μmol·L⁻¹)。AT-752 的代谢过程如图 18 所示, AT-752 通过在外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 中形成活性的三磷酸代谢物 AT-9010 (**50**) 而发挥竞争性抑制作用。体内活性测试结果显示, AT-752 可有效降低登革热病毒感染小鼠病毒血症的发病率并提高感染小鼠的存活率^[107]。有关 AT-752 在健康受试者中安全性、耐受性和药代动力学性质的临床 I 期试验于 2021 年 11 月完成, 结果尚未公布, 目前 AT-752 处于临床 II 期试验阶段。

Okon 等^[108] 通过引入色胺和 2-甲基硫代乙基对 2'- β -甲基鸟苷进行磷酸酯前药化修饰获得了一种结构新颖的 ProTide 化合物 **51** (图 19)。与经典 ProTide 不同, 该化合物无需酶的启动激活即可通过化学裂解产生磷酸酯核苷, 而后经 HINT1 催化发生 P-N 键断裂, 释放出单磷酸核苷并最终产生活性的三磷酸代谢物 (图 19), 具有全身给药的潜力。活性测试结果显示, ProTide **51** 对 DENV-2 的抑制效果 (EC₅₀ = 1.59 μmol·L⁻¹) 是其母体核苷 (EC₅₀ = 8.14 μmol·L⁻¹) 的 5 倍, 且无明显的细胞毒性 (CC₅₀ > 200 μmol·L⁻¹), 具有深入开发的价值。

3.8 ProTide 技术在其他抗病毒药物研究中的应用 Pileggi 等^[109] 利用交叉复分解反应合成了一系列烯基嘧啶衍生物 ProTide 并评价了其抗 DNA 及 RNA 病毒活性。其中, 烯基胸腺嘧啶 ProTide **52** (图 20) 对 VZV、HCMV、辛德比斯病毒 (sindbis virus, SINV)、柯萨奇病毒 B4 (coxsackie virus B4)、庞特托罗病毒 (punta toro virus, PTV) 和黄热病毒 (yellow fever virus, YFV) 均表现出了一定的抑制作用 (EC₅₀ = 20~58 μmol·L⁻¹), 且无明显细胞毒性 (CC₅₀ > 100 μmol·L⁻¹), 具有潜在的广谱抗病毒能力。

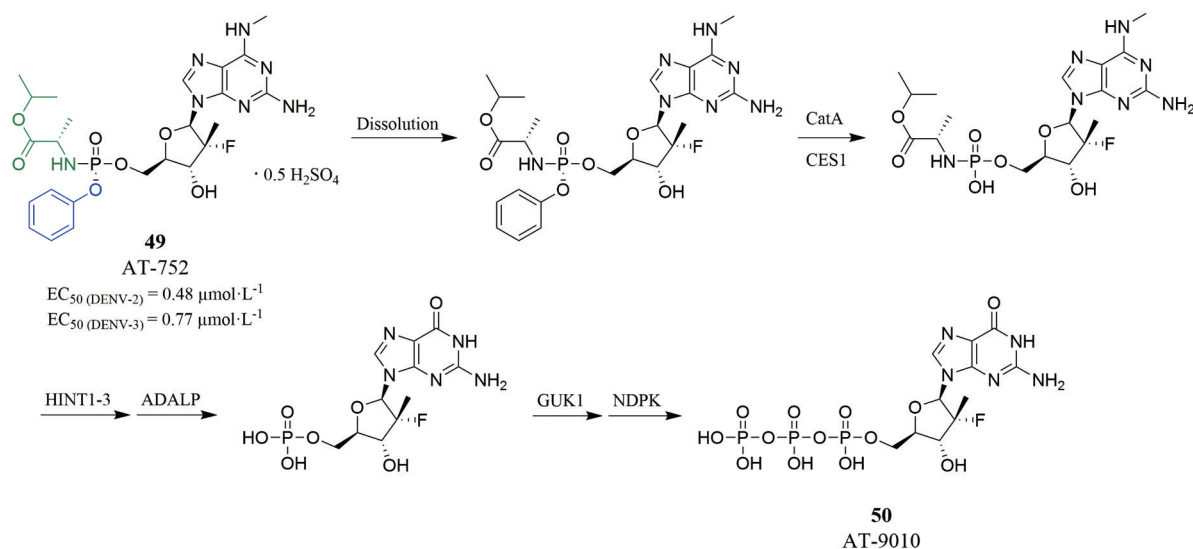


Figure 18 Structure and activities of the anti-DENV ProTide AT-752 that has reached clinical trials and its postulated metabolic mechanism

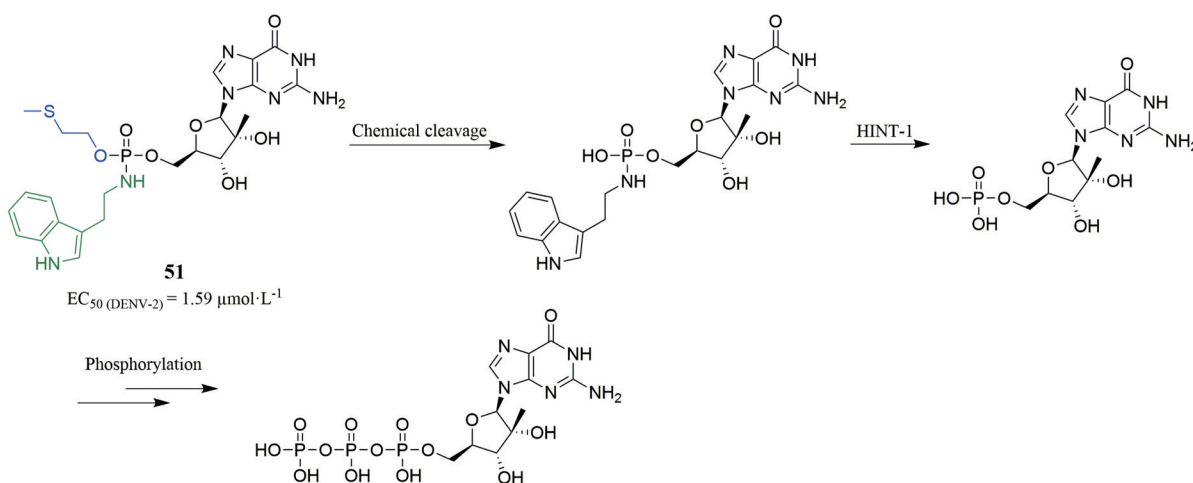


Figure 19 Structure and activity of ProTide **51** and its postulated metabolic mechanism

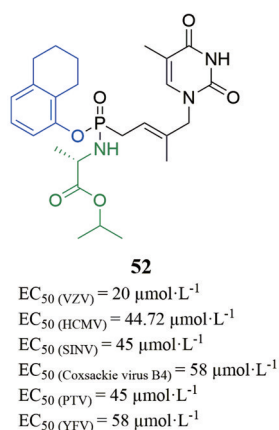


Figure 20 Structure and activities of alkenyl thymine ProTide **52**

4 总结与展望

由 Christopher McGuigan 团队开创的 ProTide 技术深刻影响了小分子药物的研发进程, 尤其为小分子抗

病毒药物的研究带来了突破性的进展。ProTide 技术不仅能够实现对现有抗病毒药物的活性优化, 还能将惰性分子转变为活性抗病毒药物, 这为新型抗病毒药物的设计与开发, 特别是“老药新用”的发掘提供了思路, 具有极其重要的借鉴意义。目前, ProTide 技术在抗丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、乙型肝炎病毒、疱疹病毒、新型冠状病毒、流感病毒等多种抗病毒药物的研发中取得了令人瞩目的成果。随着该项技术的不断发展, ProTide 的结构类型日益丰富, 各种功能化磷酸掩蔽基团的引入为调节药物的理化性质、改善生物利用度、提高抗病毒活性提供了更为多样的选择。此外, ProTide 技术的应用范围日益也扩大, 其优化对象逐步从核苷类化合物扩展至非核苷类化合物。但是, 与其他前药策略类似, 前体药物的细胞外激活仍是 ProTide 技术面临的一大挑战, 它会在一定程度上降低

药物的生物活性并引起毒副作用, 因此提高ProTide药物的稳定性和靶向性将是未来研发的重要方向。总体而言, ProTide技术的应用为抗病毒药物的研究提供了高效便利的手段, 也为应对当下和未来病毒性疾病的威胁提供了强大助力, 具有广阔的发展空间和良好的发展前景。

作者贡献: 周慧宇负责文献检索和文章撰写; 朱梅负责文章内容核对和修改; 王玉成负责文章选题、指导和审校。

利益冲突: 所有作者声明本文无任何利益冲突。

References

- [1] King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, et al. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses [M]. Amsterdam: Elsevier Academic Press, 2011: 1327-1327.
- [2] Anderson PL, Kakuda TN, Lichtenstein KA. The cellular pharmacology of nucleoside- and nucleotide-analogue reverse-transcriptase inhibitors and its relationship to clinical toxicities [J]. Clin Infect Dis, 2004, 38: 743-753.
- [3] Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, et al. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases [J]. Nat Rev Drug Discov, 2013, 12: 447-464.
- [4] Mehellou Y, Rattan HS, Balzarini J. The ProTide prodrug technology: from the concept to the clinic [J]. J Med Chem, 2018, 61: 2211-2226.
- [5] Thornton PJ, Kadri H, Miccoli A, et al. Nucleoside phosphate and phosphonate prodrug clinical candidates [J]. J Med Chem, 2016, 59: 10400-10410.
- [6] Stein DS, Moore KH. Phosphorylation of nucleoside analog anti-retrovirals: a review for clinicians [J]. Pharmacotherapy, 2001, 21: 11-34.
- [7] Balimane PV, Sinko PJ. Involvement of multiple transporters in the oral absorption of nucleoside analogues [J]. Adv Drug Deliv Rev, 1999, 39: 183-209.
- [8] Peterson LW, McKenna CE. Prodrug approaches to improving the oral absorption of antiviral nucleotide analogues [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2009, 6: 405-420.
- [9] Serpi M, Madala K, Pertusati F, et al. Synthesis of phosphoramidate prodrugs: ProTide approach [J]. Curr Protoc Nucleic Acid Chem, 2013, Chapter 15: Unit15.5. DOI: 10.1002/0471142700.nc1505s53.
- [10] Ji X, Wang J, Zhang L, et al. Application of phosphates and phosphonates prodrugs in drug research and development [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2013, 48: 621-634.
- [11] Krečmerová M, Majer P, Rais R, et al. Phosphonates and phosphonate prodrugs in medicinal chemistry: past successes and future prospects [J]. Front Chem, 2022, 10: 889737.
- [12] Serpi M, Pertusati F. An overview of ProTide technology and its implications to drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2021, 16: 1149-1161.
- [13] Mehellou Y. The ProTides boom [J]. ChemMedChem, 2016, 11: 1114-1116.
- [14] Kirby SA, Dowd CS. Phosphoryl prodrugs: characteristics to improve drug development [J]. Med Chem Res, 2022, 31: 207-216.
- [15] DILEAD. U.S. Food and Drug Administration approves Gilead's Sovaldi™ (sofosbuvir) for the treatment of chronic hepatitis C [EB/OL]. Gilead Sciences, Inc., 2013 [2022.11.01]. <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2013/12/us-food-and-drug-administration-approves-gileads-sovaldi-sofosbuvir-for-the-treatment-of-chronic-hepatitis-c>.
- [16] DILEAD. U.S. Food and Drug Administration approves Gilead's single tablet regimen Genvoya® (elvitegravir, cobicistat, emtricitabine and tenofovir alafenamide) for treatment of HIV-1 infection [EB/OL]. Gilead Sciences, Inc., 2015 [2022.11.01]. <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2015/11/us-food-and-drug-administration-approves-gileads-single-tablet-regimen-genvoya-elvitegravir-cobicistat-emtricitabine-and-tenofovir-alafenamide>.
- [17] DILEAD. U.S. Food and Drug Administration approves Gilead's Vemlidy® (tenofovir alafenamide) for the treatment of chronic hepatitis B virus infection [EB/OL]. Gilead Sciences, Inc., 2016 [2022.11.01]. <https://www.gilead.com/news-and-press/press-room/press-releases/2016/11/us-food-and-drug-administration-approves-gileads-vemlidy-tenofovir-alafenamide-for-the-treatment-of-chronic-hepatitis-b-virus-infection>.
- [18] U. S. FOOD & DRUG. FDA approves first treatment for COVID-19 [EB/OL]. FDA NewsReleaser, 2020 [2022.11.01]. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-treatment-covid-19>.
- [19] Alanazi AS, James E, Mehellou Y. The ProTide prodrug technology: where next? [J]. ACS Med Chem Lett, 2018, 10: 2-5.
- [20] De Clercq E, Li G. Approved antiviral drugs over the past 50 years [J]. Clin Microbiol Rev, 2016, 29: 695-747.
- [21] McGuigan C, Tollerfield SM, Riley PA. Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-viral drug AraA [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 6065-6075.
- [22] Jones BC, McGuigan C, Riley PA. Synthesis and biological evaluation of some phosphate triester derivatives of the anti-cancer drug AraC [J]. Nucleic Acids Res, 1989, 17: 7195-7201.
- [23] Slusarczyk M, Serpi M, Pertusati F. Phosphoramidates and phosphonamidates (ProTides) with antiviral activity [J]. Antivir Chem Chemother, 2018, 26: 2040206618775243.
- [24] McGuigan C, O'Connor TJ, Nicholls SR, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel substituted dialkyl phosphate derivatives of AZT and ddCyd [J]. Antivir Chem Chemother, 1990, 1: 355-360.
- [25] McGuigan C, Nicholls SR, O'Connor TJ, et al. Synthesis of

- some novel dialkyl phosphate derivatives of 3'-modified nucleosides as potential anti-AIDS drugs [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1990, 1: 25-33.
- [26] McGuigan C, Jones B, Tollerfield SM, et al. Synthesis and biological evaluation of haloalkyl phosphate triester derivatives of AraA and AraC [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1992, 3: 79-84.
- [27] McGuigan C, Turner S, Nicholls SR, et al. Haloalkyl phosphate derivatives of AZT as inhibitors of HIV: studies in the phosphate region [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1994, 5: 162-168.
- [28] Curley D, McGuigan C, Devine KG, et al. Synthesis and anti-HIV evaluation of some phosphoramidate derivatives of AZT: studies on the effect of chain elongation on biological activity [J]. *Antiviral Res*, 1990, 14: 345-356.
- [29] McGuigan C, Devine KG, O'Connor TJ, et al. Synthesis and evaluation of some novel phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) as anti-HIV compounds [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1990, 1: 107-113.
- [30] McGuigan C, Devine KG, O'Connor TJ, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some haloalkyl phosphoramidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT): potent activity of the trichloroethylmethoxyalaninyl compound [J]. *Antiviral Res*, 1991, 15: 255-263.
- [31] Jones B, McGuigan C, O'Connor TJ, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel phosphorodiamidate derivatives of 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1991, 2: 35-39.
- [32] McGuigan C, Nickson C, O'Connor TJ, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel lactyl and glycolyl phosphate derivatives [J]. *Antiviral Res*, 1992, 17: 197-212.
- [33] McGuigan C, Pathirana RN, Mahmood N, et al. Aryl phosphate derivatives of AZT retain activity against HIV1 in cell lines which are resistant to the action of AZT [J]. *Antiviral Res*, 1992, 17: 311-321.
- [34] McGuigan C, Pathirana RN, Davies MPH, et al. Diaryl phosphate derivatives act as pro-drugs of AZT with reduced cytotoxicity compared to the parent nucleoside [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1994, 4: 427-430.
- [35] McGuigan C, Davies M, Pathirana R, et al. Synthesis and anti-HIV activity of some novel diaryl phosphate derivatives of AZT [J]. *Antiviral Res*, 1994, 24: 69-77.
- [36] McGuigan C, Pathirana RN, Mahmood N, et al. Aryl phosphate derivatives of AZT inhibit HIV replication in cells where the nucleoside is poorly active [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 1992, 2: 701-704.
- [37] McGuigan C, Pathirana RN, Balzarini J, et al. Intracellular delivery of bioactive AZT nucleotides by aryl phosphate derivatives of AZT [J]. *J Med Chem*, 1993, 36: 1048-1052.
- [38] Siccardi D, Kandalaf LE, Gumbleton M, et al. Stereoselective and concentration-dependent polarized epithelial permeability of a series of phosphoramidate triester prodrugs of d4T: an *in vitro* study in Caco-2 and Madin-Darby canine kidney cell monolayers [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 307: 1112-1119.
- [39] Birkus G, Wang R, Liu X, et al. Cathepsin A is the major hydrolase catalyzing the intracellular hydrolysis of the antiretroviral nucleotide phosphonoamidate prodrugs GS-7340 and GS-9131 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 543-550.
- [40] Murakami E, Tolstykh T, Bao H, et al. Mechanism of activation of PSI-7851 and its diastereoisomer PSI-7977 [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 34337-34347.
- [41] Birkus G, Kutty N, He GX, et al. Activation of 9-[(R)-2-[(S)-[(S)-1-(isopropoxycarbonyl)ethyl]amino]phenoxyphosphinyl]-methoxy]propyladenine (GS-7340) and other tenofovir phosphonoamidate prodrugs by human proteases [J]. *Mol Pharmacol*, 2008, 74: 92-100.
- [42] Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases [J]. *Biochemistry*, 2002, 41: 9003-9014.
- [43] Chou TF, Baraniak J, Kaczmarek R, et al. Phosphoramidatepro-nucleotides: a comparison of the phosphoramidase substrate specificity of human and *Escherichia coli* histidine triad nucleotide binding proteins [J]. *Mol Pharm*, 2007, 4: 208-217.
- [44] Congiati C, Brancale A, McGuigan C. Molecular modelling studies on the binding of some protides to the putative human phosphoramidase Hint1 [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2007, 26: 1121-1124.
- [45] McGuigan C, Sutton PW, Cahard D, et al. Synthesis, anti-human immunodeficiency virus activity and esterase lability of some novel carboxylic ester-modified phosphoramidate derivatives of stavudine (d4T) [J]. *Antivir Chem Chemother*, 1998, 9: 473-479.
- [46] Siddiqui AQ, McGuigan C, Ballatore C, et al. Design and synthesis of lipophilic phosphoramidate d4T-MP prodrugs expressing high potency against HIV in cell culture: structural determinants for *in vitro* activity and QSAR [J]. *J Med Chem*, 1999, 42: 4122-4128.
- [47] McGuigan C, Tsang HW, Cahard D, et al. Phosphoramidate derivatives of d4T as inhibitors of HIV: the effect of amino acid variation [J]. *Antiviral Res*, 1997, 35: 195-204.
- [48] Lee WA, He GX, Eisenberg E, et al. Selective intracellular activation of a novel prodrug of the human immunodeficiency virus reverse transcriptase inhibitor tenofovir leads to preferential distribution and accumulation in lymphatic tissue [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49: 1898-1906.
- [49] Nie B, Jin CF, Zhong WH, et al. Application and recent progress of phosphoramidateprodrugs strategies and ProTide technology in drug discovery [J]. *Chin J Ogr Chem (有机化学)*, 2017, 37: 2818-2840.
- [50] Sofia MJ, Bao D, Chang W, et al. Discovery of a β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus [J]. *J Med Chem*, 2010, 53:

- 7202-7218.
- [51] Chapman H, Kernan M, Prisbe E, et al. Practical synthesis, separation, and stereochemical assignment of the PMPA pro-drug GS-7340 [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 2001, 20: 621-628.
- [52] Liu YC, Cheng JF, Hong R. Asymmetric synthesis of prodrug nucleotides (ProTides): construction of the P-stereogenic centers [J]. *Chin J Org Chem (有机化学)*, 2020, 40: 3237-3248.
- [53] Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Kowdley KV, et al. Sofosbuvir (GS-7977) plus peginterferon/ribavirin in treatment-naïve patients with HCV genotype 1: a randomized, 28-day, dose-ranging trial [J]. *J Hepatol*, 2013, 58: 663-668.
- [54] Lawitz E, Mangia A, Wyles D, et al. Sofosbuvir for previously untreated chronic hepatitis C infection [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1878-1887.
- [55] Jacobson IM, Gordon SC, Kowdley KV, et al. Sofosbuvir for hepatitis C genotype 2 or 3 in patients without treatment options [J]. *N Engl J Med*, 2013, 368: 1867-1877.
- [56] Zeuzem S, Dusheiko GM, Salupere R, et al. Sofosbuvir and ribavirin in HCV genotypes 2 and 3 [J]. *N Engl J Med*, 2014, 370: 1993-2001.
- [57] Cha A, Budovich A. Sofosbuvir: a new oral once-daily agent for the treatment of hepatitis C virus infection [J]. *P T*, 2014, 39: 345-352.
- [58] Hua R, Kong F, Wen X, et al. Efficacy and safety of alfosbuvir plus daclatasvir in Chinese patients with hepatitis C virus genotypes 1, 2, 3, and 6 infection: an open-label, phase 2 study [J]. *J Viral Hepat*, 2022, 29: 455-464.
- [59] Hua R, Kong F, Wen X, et al. SH229 plus daclatasvir for treatment of chronic hepatitis C virus infection in China: a single-arm, open-label, phase 3 study [J]. *J Hepatol*, 2021, 75: S795.
- [60] Lindqvist A, Kylefjord H, Wähling H, et al. Preclinical characterization of MIV-802, a novel uridine nucleotide HCV NS5B polymerase inhibitor, for treatment of hepatitis C virus infection [J]. *J Hepatol*, 2015, 62: S58.
- [61] Maiti M, Maiti M, Rozenski J, et al. Aspartic acid based nucleoside phosphoramidate prodrugs as potent inhibitors of hepatitis C virus replication [J]. *Org Biomol Chem*, 2015, 13: 5158-5174.
- [62] Procházková E, Hřebabecký H, Dejmeck M, et al. Could 5'-N and S ProTide analogues work as prodrugs of antiviral agents? [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2020, 30: 126897.
- [63] Ray AS, Cihlar T, Robinson KL, et al. Mechanism of active renal tubular efflux of tenofovir [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50: 3297-3304.
- [64] Markowitz M, Zolopa A, Squires K, et al. Phase I/II study of the pharmacokinetics, safety and antiretroviral activity of tenofovir alafenamide, a new prodrug of the HIV reverse transcriptase inhibitor tenofovir, in HIV-infected adults [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69: 1362-1369.
- [65] Sax PE, Zolopa A, Brar I, et al. Tenofovir alafenamide vs. tenofovir disoproxil fumarate in single tablet regimens for initial HIV-1 therapy: a randomized phase 2 study [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 67: 52-58.
- [66] Mills A, Crofoot G Jr, McDonald C, et al. Tenofovir alafenamide *versus* tenofovir disoproxil fumarate in the first protease inhibitor-based single-tablet regimen for initial HIV-1 therapy: a randomized phase 2 study [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2015, 69: 439-445.
- [67] Sax PE, Wohl D, Yin MT, et al. Tenofovir alafenamide *versus* tenofovir disoproxil fumarate, coformulated with elvitegravir, cobicistat, and emtricitabine, for initial treatment of HIV-1 infection: two randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trials [J]. *Lancet*, 2015, 385: 2606-2615.
- [68] Mills A, Arribas JR, Andrade-Villanueva J, et al. Switching from tenofovir disoproxil fumarate to tenofovir alafenamide in antiretroviral regimens for virologically suppressed adults with HIV-1 infection: a randomised, active-controlled, multicentre, open-label, phase 3, non-inferiority study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16: 43-52.
- [69] Kalčić F, Zgarbová M, Hodek J, et al. Discovery of modified amidate (ProTide) prodrugs of tenofovir with enhanced antiviral properties [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 16425-16449.
- [70] Kandil S, Pannecouque C, Chapman FM, et al. Polyfluoroaromatic stavudine (d4T) ProTides exhibit enhanced anti-HIV activity [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2019, 29: 126721.
- [71] Lisco A, Vanpouille C, Tchesnokov EP, et al. Acyclovir is activated into a HIV-1 reverse transcriptase inhibitor in herpesvirus-infected human tissues [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 4: 260-270.
- [72] Derudas M, Carta D, Brancale A, et al. The application of phosphoramidate prodrug technology to acyclovir confers anti-HIV inhibition [J]. *J Med Chem*, 2009, 52: 5520-5530.
- [73] Derudas M, Vanpouille C, Carta D, et al. Virtual screening of acyclovir derivatives as potential antiviral agents: design, synthesis, and biological evaluation of new acyclic nucleoside ProTides [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 7876-7896.
- [74] Babusis D, Phan TK, Lee WA, et al. Mechanism for effective lymphoid cell and tissue loading following oral administration of nucleoside prodrug GS-7340 [J]. *Mol Pharm*, 2013, 10: 459-466.
- [75] Chan HL, Fung S, Seto WK, et al. Tenofovir alafenamide *versus* tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1: 185-195.
- [76] Buti M, Gane E, Seto WK, et al. Tenofovir alafenamide *versus* tenofovir disoproxil fumarate for the treatment of patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B virus infection: a randomised, double-blind, phase 3, non-inferiority trial [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2016, 1: 196-206.
- [77] Jones SA, Murakami E, Delaney W, et al. Noncompetitive inhibition of hepatitis B virus reverse transcriptase protein priming and

- DNA synthesis by the nucleoside analog clevudine [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57: 4181-4189.
- [78] Squires KE, Mayers DL, Bluemling GR, et al. ATI-2173, a novel liver-targeted non-chain-terminating nucleotide for hepatitis B virus cure regimens [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e00836-20.
- [79] Wang L, Sun R, Eriksson S. The kinetic effects on thymidine kinase 2 by enzyme-bound dTTP may explain the mitochondrial side effects of antiviral thymidine analogs [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55: 2552-2558.
- [80] Squires KE, Ogilvie L, JucovA, et al. A randomized phase 1b trial of the active site polymerase inhibitor nucleotide ATI-2173 in patients with chronic hepatitis B virus infection [J]. *J Viral Hepat*, 2022. DOI: 10.1111/jvh.13753.
- [81] Maiti M, Persoons L, Andrei G, et al. Synthesis and anti-herpetic activity of phosphoramidate ProTides [J]. *ChemMedChem*, 2013, 8: 985-993.
- [82] Wang Z, Zang R, Niu Z, et al. Synthesis and antiviral effect of phosphamide modified vidarabine for treating HSV 1 infections [J]. *Bioorg Med Chem Lett*, 2021, 52: 128405.
- [83] Beran RK, Sharma R, Corsa AC, et al. Cellular growth kinetics distinguish a cyclophilin inhibitor from an HSP90 inhibitor as a selective inhibitor of hepatitis C virus [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e30286.
- [84] Clouser CL, Holtz CM, Mullett M, et al. Activity of a novel combined antiretroviral therapy of gemcitabine and decitabine in a mouse model for HIV-1 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 1942-1948.
- [85] Kuivanen S, Bespalov MM, Nandania J, et al. Obatoclox, saliphenylamide and gemcitabine inhibit Zika virus infection *in vitro* and differentially affect cellular signaling, transcription and metabolism [J]. *Antiviral Res*, 2017, 139: 117-128.
- [86] Denisova OV, Kakkola L, Feng L, et al. Obatoclox, saliphenylamide, and gemcitabine inhibit influenza A virus infection [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 35324-35332.
- [87] Zhang YN, Zhang QY, Li XD, et al. Gemcitabine, lycorine and oxysphoridine inhibit novel coronavirus (SARS-CoV-2) in cell culture [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9: 1170-1173.
- [88] Zheng Z, Groaz E, Snoeck R, et al. Influence of 4'-substitution on the activity of gemcitabine and its ProTide against VZV and SARS-CoV-2 [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 12: 88-92.
- [89] Siegel D, Hui HC, Doerffler E, et al. Discovery and synthesis of a phosphoramidate prodrug of a pyrrolo[2,1-f][triazin-4-amino] adenine C-nucleoside (GS-5734) for the treatment of Ebola and emerging viruses [J]. *J Med Chem*, 2017, 60: 1648-1661.
- [90] Agostini ML, Andres EL, Sims AC, et al. Coronavirus susceptibility to the antiviral remdesivir (GS-5734) is mediated by the viral polymerase and the proofreading exoribonuclease [J]. *mBio*, 2018, 9: e00221-18.
- [91] Brown AJ, Won JJ, Graham RL, et al. Broad spectrum antiviral remdesivir inhibits human endemic and zoonotic deltacoronaviruses with a highly divergent RNA dependent RNA polymerase [J]. *Antiviral Res*, 2019, 169: 104541.
- [92] Sheahan TP, Sims AC, Leist SR, et al. Comparative therapeutic efficacy of remdesivir and combination lopinavir, ritonavir, and interferon beta against MERS-CoV [J]. *Nat Commun*, 2020, 11: 222.
- [93] Wang M, Cao R, Zhang L, et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) *in vitro* [J]. *Cell Res*, 2020, 30: 269-271.
- [94] Mulangu S, Dodd LE, Davey RT Jr, et al. A randomized, controlled trial of ebolavirus disease therapeutics [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381: 2293-2303.
- [95] Eastman RT, Roth JS, Brimacombe KR, et al. Remdesivir: a review of its discovery and development leading to emergency use authorization for treatment of COVID-19 [J]. *ACS Cent Sci*, 2020, 6: 672-683.
- [96] Beigel JH, Tomashek KM, Dodd LE, et al. Remdesivir for the treatment of COVID-19 - final report [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1813-1826.
- [97] Goldman JD, Lye DCB, Hui DS, et al. Remdesivir for 5 or 10 days in patients with severe COVID-19 [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383: 1827-1837.
- [98] Spinner CD, Gottlieb RL, Criner GJ, et al. Effect of remdesivir vs standard care on clinical status at 11 days in patients with moderate COVID-19: a randomized clinical trial [J]. *JAMA*, 2020, 324: 1048-1057.
- [99] WHO Solidarity Trial Consortium, Pan H, Peto R, et al. Repurposed antiviral drugs for COVID-19 - interim WHO solidarity trial results [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384: 497-511.
- [100] Amirian ES, Levy JK. Current knowledge about the antivirals remdesivir (GS-5734) and GS-441524 as therapeutic options for coronaviruses [J]. *One Health*, 2020, 9: 100128.
- [101] Williamson BN, Feldmann F, Schwarz B, et al. Clinical benefit of remdesivir in rhesus macaques infected with SARS-CoV-2 [J]. *Nature*, 2020, 585: 273-276.
- [102] Sun D. Correction to: remdesivir for treatment of COVID-19: combination of pulmonary and IV administration may offer additional benefit [J]. *AAPS J*, 2020, 22: 102.
- [103] Yan VC, Muller FL. Why remdesivir failed: preclinical assumptions overestimate the clinical efficacy of remdesivir for COVID-19 and Ebola [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65: e0111721.
- [104] Hu H, Mady Traore MD, Li R, et al. Optimization of the prodrug moiety of remdesivir to improve lung exposure/selectivity and enhance anti-SARS-CoV-2 activity [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 12044-12054.
- [105] Meneghesso S, Vanderlinden E, Stevaert A, et al. Synthesis and biological evaluation of pyrimidine nucleoside monophosphate prodrugs targeted against influenza virus [J]. *Antiviral Res*,

- 2012, 94: 35-43.
- [106] Meneghesso S, Vanderlinden E, Brancale A, et al. Synthesis and biological evaluation of purine 2'-fluoro-2'-deoxyriboside ProTides as anti-influenza virus agents [J]. *ChemMedChem*, 2013, 8: 415-425.
- [107] Lin K, Good SS, Julander JG, et al. AT-752, a double prodrug of a guanosine nucleotide analog, inhibits yellow fever virus in a hamster model [J]. *PLoS Negl Trop Dis*, 2022, 16: e0009937.
- [108] Okon A, Matos de Souza MR, Shah R, et al. An chimerically activatable antiviral ProTides [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2017, 8: 958-962.
- [109] Pileggi E, Serpi M, Andrei G, et al. Expedient synthesis and biological evaluation of alkenyl acyclic nucleoside phosphonate prodrugs [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, 26: 3596-3609.