

控制溶瘤腺病毒YSCH-01复制的抗病毒药物 筛选探究

刘敏^{1#} 钱伟^{1#} 张婷婷² 方先龙² 章康健^{2,3} 陶均佳^{1*}

(¹上海市奉贤区中心医院, 上海 201400; ²上海元宋生物技术有限公司, 上海 201400;

³浙江理工大学材料科学与工程学院智能生物材料研究所, 杭州 310018)

摘要 该文目的是通过体外实验筛选能够有效抑制重组溶瘤腺病毒YSCH-01复制的药物, 为产品的临床安全使用提供指导。首先, 选取了文献中常见的5种潜在可以抑制腺病毒的药物, 采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)杀伤实验测试了这5种药物对人源细胞的自身毒性, 排除了细胞毒性最强的赛度替尼。然后, 采用结晶紫染色法检测了剩余4种药物对YSCH-01病毒杀伤细胞能力的抑制效果。同时, 测定了这4种药物对YSCH-01病毒复制能力的抑制效果。结果显示, 西多福韦和司他夫定显著地降低YSCH-01病毒的复制和杀伤能力, 更昔洛韦次之。最后, 进一步确定了西多福韦和司他夫定对YSCH-01病毒的半数抑制浓度, 计算出这2种药物的安全指数(safety index, SI)值。上述研究表明, 西多福韦和司他夫定对人源细胞不良影响小, 对溶瘤腺病毒YSCH-01抑制能力强, 可作为溶瘤腺病毒YSCH-01在临床应用中的安全备用药物。

关键词 溶瘤腺病毒; YSCH-01; 病毒复制; 西多福韦; 司他夫定; 更昔洛韦

Screening of Antiviral Drugs to Control the Replication of Oncolytic Adenovirus YSCH-01

LIU Min^{1#}, QIAN Wei^{1#}, ZHANG Tingting², FANG Xianlong², ZHANG Kangjian^{2,3}, TAO Junjia^{1*}

(¹Shanghai Fengxian District Central Hospital, Shanghai 201400, China; ²Shanghai Yuansong Biotechnology Co., LTD,

Shanghai 201400, China; ³Institute of Intelligent Biomaterials, School of Materials Science and Engineering,

Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310018, China)

Abstract The purpose of this article is to select the drugs which can effectively inhibit the recombinant oncolytic adenovirus YSCH-01 replication through *in vitro* experiments, to provide guidance for ensuring safety use of adenovirus products in clinical. First, five drugs commonly reported in the literature with potential to inhibit adenovirus were selected. The toxicity of these five drugs on human cells was tested by CCK-8 (cell counting kit-8) and Cedutininib, the most cytotoxic drug, was excluded. Then, crystal violet staining was used to detect the inhibitory effect of the remaining four drugs on YSCH-01 killing ability. At the same time, the inhibitory effect of these 4 drugs on YSCH-01 replication was measured. The results showed that Cidofovir and Stavudine significantly inhibited the replication and killing ability of YSCH-01, followed by Ganciclovir. Further, the half inhibitory concentrations of Cidofovir and Stavudine against YSCH-01 were determined and the SI values of the two drugs were

收稿日期: 2022-12-29 接受日期: 2023-03-06

医企合作项目(批准号: 2021-KY-16-03)资助的课题

[#]共同第一作者

*通讯作者。Tel: 021-57423202, E-mail: 26831917@qq.com

Received: December 29, 2022

Accepted: March 6, 2023

This work was supported by Hospital-Enterprise Cooperation Project (Grant No.2021-KY-16-03)

[#]These authors contributed equally to this work

*Corresponding author. Tel: +86-21-57423202, E-mail: 26831917@qq.com

calculated. This study showed that Cidofovir and Stavudine had little adverse effect on human cells but shown strong inhibition against adenovirus YSCH-01, which could be used as standby safe drugs for clinical application of adenovirus YSCH-01.

Keywords oncolytic adenovirus; YSCH-01; virus replication; Cidofovir; Stavudine; Ganciclovir

重组溶瘤腺病毒YSCH-01(重组L-IFN腺病毒注射液)为上海元宋生物技术有限公司开发的一类广谱抗肿瘤新药,目前在上海市奉贤区中心医院进行研究者发起的临床研究,中国临床试验中心注册号为ChiCTR2200057458,美国临床试验网站注册号为NCT05180851。YSCH-01是由双重调控的复制型人5型腺病毒作为载体并携带了经优化后的重组类干扰素免疫抗癌基因(Liu-interferon, *L-IFN*)研发而成的。该双重调控的复制型5型腺病毒载体能特异性在肿瘤细胞中复制,靶向裂解肿瘤细胞而对正常细胞无明显毒性;其载体上插入的治疗基因可随病毒载体在肿瘤细胞内大量复制,同时在肿瘤细胞内大量表达L-IFN蛋白并将其分泌到胞外,后者不仅对肿瘤细胞有直接杀伤作用,还能够刺激免疫系统发挥免疫调节的作用,从而发挥双重抗肿瘤作用。但在肿瘤细胞中大量复制的腺病毒可能进入血液,有引起毒副作用的风险。因此,出于安全考虑,需要尽可能准备能有效抑制腺病毒感染的药物,以满足临床安全用药所需。

理想的抗病毒新药因既要能够有效地抑制病毒的感染或增殖过程,又不能对人体正常细胞产生明显的毒副作用,故而开发过程充满了挑战。目前进入临床试验的单纯疱疹病毒类溶瘤病毒常用更昔洛韦作为安全备用药。但对于人腺病毒(human adenovirus, HAdV)相关临床小分子药物,相对较少,其研发难度则更具挑战,因为人腺病毒至少有52种血清型,被划分为七个不同的亚群(A~G),且不同亚群具有不同的传染致病性^[1-3]。常规用于抑制病毒的药物有多种,例如中药、化学药、生物药等^[4-7],每种药物都有各自的优缺点,有不同的使用时机,也会在抗病毒的同时带来一些副作用。

鉴于目前尚无针对人腺病毒的抗病毒药物上市^[8],发生腺病毒感染往往以常规抗病毒治疗及对症缓解为主,本研究主要是在体外筛选能够有效抑制人5型腺病毒(adenovirus type 5, Ad-5)的小分子药物,旨在为重组溶瘤腺病毒YSCH-01的临床应用提供参考。结合正处于临床或临床试验研发中的抗

病毒药物报道,我们从抑制病毒基因组复制[西多福韦(Cidofovir)、更昔洛韦(Ganciclovir)]、阻断病毒RNA和蛋白合成[利巴韦林(Ribavirin)]、终止病毒DNA链延长[司他夫定(Stavudine)、Ganciclovir]、抑制关键细胞信号通路[赛度替尼(Cerdulatinib)]这4个方面共选取了5种药物进行后续筛选。选择的这5种药物分别在抗疱疹病毒、巨细胞病毒、嗜肝病毒和人类免疫缺陷病毒等方面有良好的效果^[9-13],但是在抑制或清除人腺病毒方面尚且没有清晰全面的研究。本研究在体外实验中测试了这几种药物对人体细胞的毒性和对人5型腺病毒复制的抑制能力,以期筛选出对人体细胞毒性小但能显著抑制人5型腺病毒复制的药物。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人肺癌细胞A549和人宫颈癌细胞HeLa由中科院分子细胞科学卓越创新中心刘新垣院士课题组赠予。人正常细胞HFF-1购自上海中乔新舟生物科技有限公司。人三乳腺癌细胞MDA-MB-231购自中国科学院细胞库。

1.1.2 病毒 重组溶瘤腺病毒YSCH-01由上海元宋生物技术有限公司提供。

1.1.3 药物与试剂 利巴韦林、西多福韦、更昔洛韦、司他夫定及赛度替尼均购自MedChem Express公司;结晶紫购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;CCK-8检测试剂盒购自上海翌圣生物科技有限公司;DMEM(Gibco)培养基购自ThermoFisher Scientific公司;胎牛血清(Sunrise)购自上海尚智生物科技有限公司;QuickTiter腺病毒滴度快速测定试剂盒购自北京西美杰科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 各药物对细胞毒性的测定 将A549细胞以4 000个每孔接种于96孔培养板中,每孔100 μ L完全培养液(含10%胎牛血清的DMEM),每列6个复孔,共铺9列。同时设置1列只有培养液没有细胞的空白对照,铺好后放回37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养。将Ribavirin、Ci-

dofovir、Ganciclovir、Stavudine、Cerdulatinib这5种药物分别用完全培养液进行梯度稀释并设对照组(利巴韦林、更昔洛韦、司他夫定浓度梯度均设置为0、31.25、62.5、125、250、500、1 000、2 000、4 000 $\mu\text{mol/L}$, 西多福韦浓度梯度设置为0、3.125、6.25、12.5、25、50、100、200、400 $\mu\text{mol/L}$, 赛度替尼浓度梯度设置为0、1、2、5、10、20、25、40、50 $\mu\text{mol/L}$), 将培养18 h后的A549细胞的培养液换为含上述浓度梯度药物的培养液, 每种药物1块96孔培养板。然后将96孔培养板在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养72 h, 再各孔加入10 μL CCK-8试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后使用酶标仪读取在450 nm波长下的吸光度(D)值, 使用Graphad prism 8.0作图, 用自带的分析方法计算各药物对应的半数毒性浓度(the 50% cytotoxic concentration, CC_{50})值。

同上, 人源正常细胞系HFF-1细胞(含15%胎牛血清的DMEM完全培养基培养)和人源宫颈癌细胞系HeLa细胞(含10%胎牛血清的DMEM完全培养基)均以4 000个每孔接种于96孔培养板中, 人源三阴乳腺癌细胞系MDA-MB-231细胞(含10%胎牛血清的RPMI 1640完全培养基)以10 000个每孔接种于96孔培养板中。均以100 μL /孔的体积接种, 每列6个复孔, 共铺9列, 同时设置1列空白对照。将上述3种细胞培养18 h后换液, 换为含上述西多福韦、司他夫定药物浓度梯度的培养液, 每种药物1块96孔培养板, 具体同A549细胞。然后将96孔培养板在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续培养72 h, 再各孔加入10 μL CCK-8试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h后使用酶标仪读取在450 nm波长下的吸光度值, 使用Graphad prism 8.0作图, 用自带的分析方法计算各药物对应的 CC_{50} 值。

1.2.2 各药物对YSCH-01病毒空斑形成抑制能力的测定 A549细胞以60 000个每孔接种48孔培养板, 每孔0.5 mL完全培养液, 铺好后放回培养箱培养。用无血清DMEM培养基稀释病毒, 以100 MOI(multiplicity of infection)的接种比例将YSCH-01病毒接种细胞, 10 μL /孔, 同时设不加病毒的空白对照组。于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内感染1 h, 然后弃上清, 分别换成0.5 mL含安全性较好的利巴韦林、更昔洛韦、西多福韦、司他夫定浓度梯度的新鲜培养液, 设置不加病毒及药物的对照组和只加病毒的对照组。其中利巴韦林浓度梯度为0.098、0.195、0.39、0.781、1.563、6.25 $\mu\text{mol/L}$, 更昔洛韦浓度梯度为1.563、6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$, 西多福韦浓度梯度为3.12、

6.25、12.5、25、33.3、50 $\mu\text{mol/L}$, 司他夫定浓度梯度为6.25、15.625、31.25、62.5、83.39、125 $\mu\text{mol/L}$ 。将上述培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内培养72 h后弃上清, 用2%的结晶紫甲醇溶液室温染色15 min后漂洗、拍照。

1.2.3 各药物对YSCH-01病毒复制抑制能力的测定 A549细胞以60 000个每孔接种48孔培养板, 每孔0.5 mL完全培养液, 铺好后放回培养箱培养。用无血清DMEM培养基稀释病毒, 以100 MOI的接种比例将YSCH-01病毒接种细胞, 10 μL /孔, 同时设不加病毒的空白对照组。置37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内感染1 h, 然后弃上清, 分别换成0.5 mL含安全性较好的利巴韦林、更昔洛韦、西多福韦、司他夫定浓度梯度的新鲜培养液, 设置只加病毒的对照组。其中利巴韦林浓度梯度为0.098、0.195、0.390、1.563 $\mu\text{mol/L}$, 更昔洛韦浓度梯度为1.563、6.25、25、100 $\mu\text{mol/L}$, 西多福韦浓度梯度为3.12、6.25、25、50 $\mu\text{mol/L}$, 司他夫定浓度梯度为6.25、15.625、62.5、125 $\mu\text{mol/L}$ 。将上述培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内培养72 h后, 整板取出, 用封口膜封好并装入自封袋中, 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱与室温反复冻融3次, 使病毒充分释放, 用腺病毒滴度快速测定试剂盒进行滴度检测。

1.2.4 各药物对YSCH-01病毒抑制的 IC_{50} 检测 A549、HeLa细胞以4 000个每孔接种96孔培养板, 100 μL /孔, 每列3个复孔, 共铺10列, 铺好后放回37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内进行过夜培养。用无血清培养液稀释病毒, 以5 MOI的YSCH-01病毒液接种细胞, 10 μL 每孔, 同时设不加病毒的对照组, 接种后的细胞于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱内感染1 h, 弃上清, 换成含不同药物浓度(西多福韦浓度分别为0.195、0.391、0.782、1.563、3.125、6.25、12.5 $\mu\text{mol/L}$, 司他夫定浓度分别为1.563、3.125、6.25、15.62、31.25、62.5、83.38 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养液100 μL , 每个浓度设3个复孔, 以不加病毒及药物组和只加病毒组作对照。将96孔培养板置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温箱内培养72 h后, 整板取出, 用封口膜封好并装入自封袋中, 置于-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱与室温反复冻融3次, 使病毒充分释放, 用腺病毒滴度快速测定试剂盒进行滴度检测。使用Graphad prism作图, 用自带的分析方法计算各药物对应的半数抑制浓度(the 50% inhibit concentrations, IC_{50})值。再根据各药物的 CC_{50} 值和 IC_{50} 值计算其安全指数SI, $\text{SI}=\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ 。

1.2.5 数据处理 所有实验数据均采用Graphad

prism 8.0软件处理分析并进行绘图, 实验数据用(平均值 $\pm$ 标准误)表示。实验数据用Graphad prism自带的“log(inhibitor) vs. response—Variable slope (four parameters)”进行非线性拟合, 计算各药物对应的 CC_{50} 值和 IC_{50} 值。

2 结果

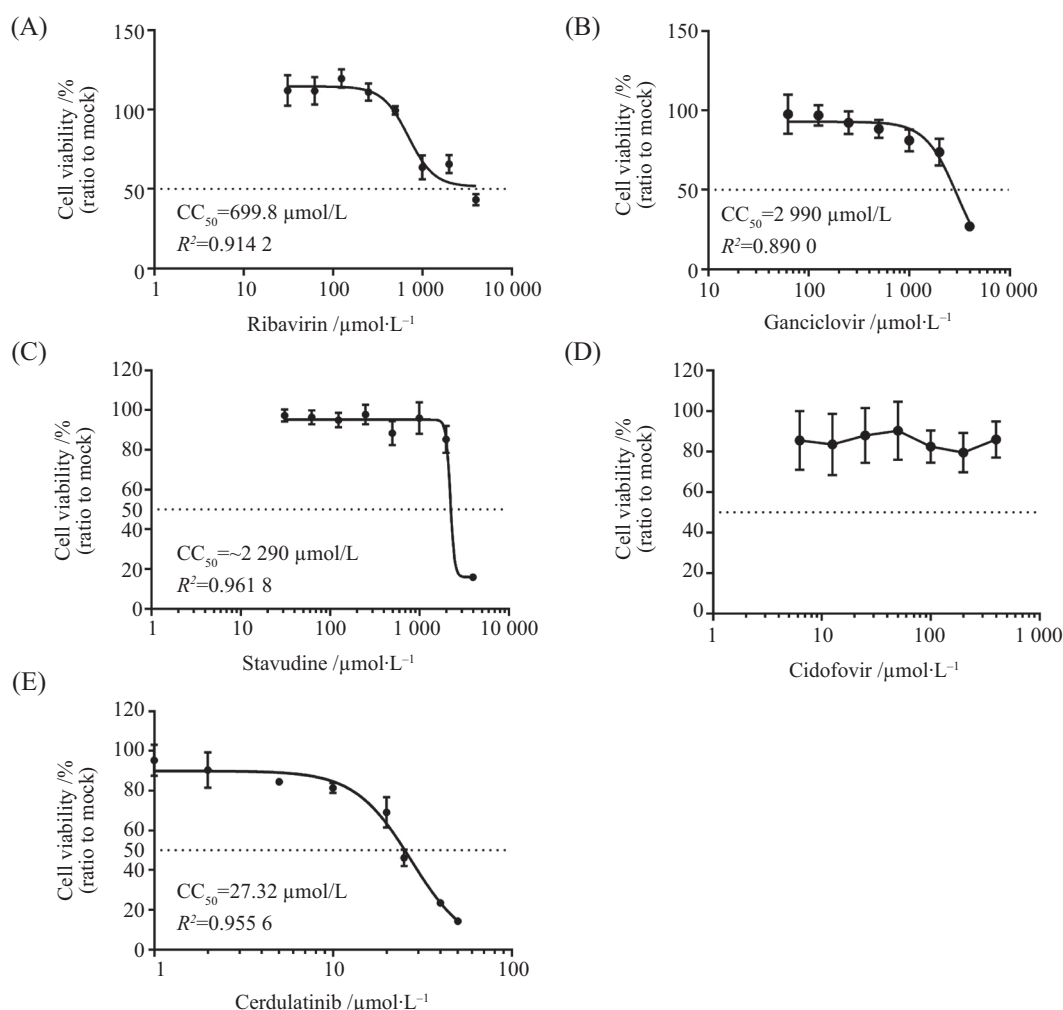
2.1 更昔洛韦、司他夫定和西多福韦对人体细胞安全性较高

通过CCK-8实验检测5种药物在A549细胞中的 CC_{50} , 结果(图1)显示, 赛度替尼与对A549细胞的半数毒性浓度最低, 为27.32 $\mu\text{mol/L}$, 表明赛度替尼对人体细胞本身的杀伤能力强, 安全性差, 后续研究剔除

此药物。利巴韦林的半数毒性浓度为699.8 $\mu\text{mol/L}$, 说明对人体细胞本身具有一定的杀伤力。更昔洛韦和司他夫定在A549细胞中的半数毒性浓度约为2 990 $\mu\text{mol/L}$ 和2 290 $\mu\text{mol/L}$, 比较安全。而西多福韦则未检测到其对A549细胞的半数毒性浓度, 提示该药物对细胞生长活力的影响极小, 非常安全。

2.2 各药物均能抑制YSCH-01病毒空斑形成

各药物以浓度梯度作用于以100 MOI感染YSCH-01病毒的A549细胞, 处理72 h后结晶紫染色观察病毒感染造成的空斑。数据(图2)显示, 各药物能明显抑制病毒造成细胞空斑形成的浓度分别是: 利巴韦林0.195 $\mu\text{mol/L}$, 更昔洛韦1.563 $\mu\text{mol/L}$, 西多福韦3.125 $\mu\text{mol/L}$, 司他夫定15.635 $\mu\text{mol/L}$ 。但



A: 利巴韦林对A549细胞的抑制曲线; B: 更昔洛韦对A549细胞的抑制曲线; C: 司他夫定对A549细胞的抑制曲线; D: 西多福韦对A549细胞的抑制曲线; E: 赛度替尼对A549细胞的抑制曲线。

A: inhibition curve of ribavirin on A549 cell; B: inhibition curve of ganciclovir on A549 cell; C: inhibition curve of stavudine on A549 cell; D: inhibition curve of cidofovir on A549 cell; E: Inhibition curve of cerdulatinib on A549 cell.

图1 5种药物对A549细胞的半数毒性浓度值

Fig.1 The 50% cytotoxic concentrations of five drugs for A549 cell

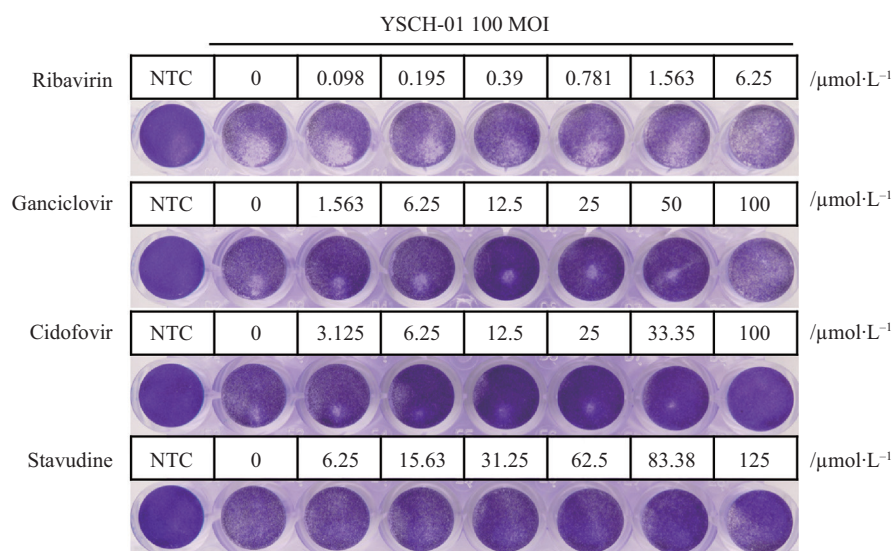


图2 4种药物均能抑制YSCH-01病毒空斑形成

Fig.2 The four drugs inhibit plaque formation of YSCH-01

同时观察到,高浓度的利巴韦林及更昔洛韦处理反而形成更多空斑,即高浓度药物对YSCH-01病毒的抑制效果出现减弱。为此,我们进一步通过对病毒滴度的检测来确定更稳定抑制YSCH-01病毒的药物。

2.3 西多福韦和司他夫定抑制YSCH-01病毒复制具有剂量依赖性

为进一步确定利巴韦林、更昔洛韦、西多福韦、司他夫定对溶瘤腺病毒YSCH-01复制的抑制效果,我们检测了不同剂量药物处理对YSCH-01病毒在A549细胞中复制的影响。YSCH-01病毒的复制后滴度结果(图3)显示,利巴韦林终浓度约0.195 μmol/L时,其对YSCH-01病毒复制的抑制作用最大,浓度逐渐增加反而降低了其抑制作用,与上述空斑形成的结果具有一致性;更昔洛韦的终浓度在1.635 μmol/L及以上时,其对YSCH-01病毒复制的抑制作用较显著,但没有显示出较好的剂量依赖关系;西多福韦和司他夫定则对YSCH-01病毒复制的抑制显示出剂量依赖性,药物使用浓度越高,其对YSCH-01复制的抑制效果越强。综合这4种药物对溶瘤腺病毒YSCH-01在A549细胞中空斑形成和复制的结果,我们初步选择司他夫定和西多福韦作为备选安全抗YSCH-01病毒的药物。

2.4 确认西多福韦和司他夫定对人源细胞的安全性

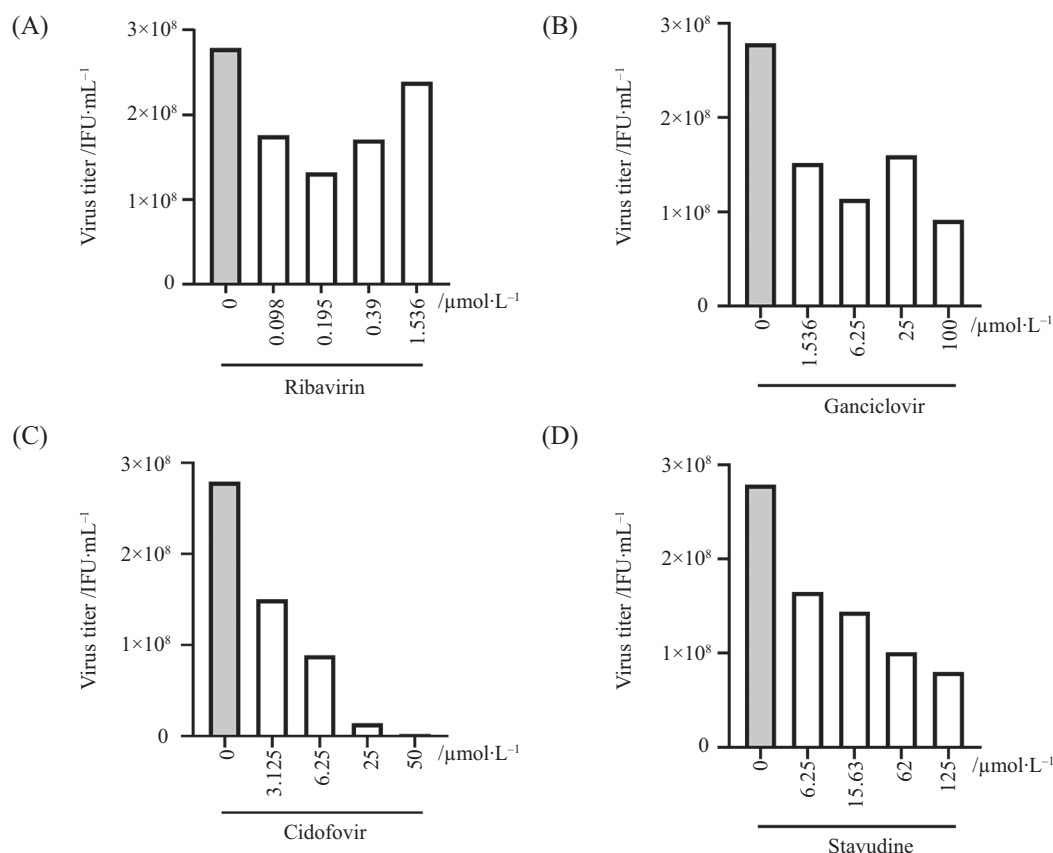
为了进一步确认西多福韦和司他夫定对人源细

胞的安全性,我们选择了在人源正常细胞系HFF-1、人源三阴乳腺癌细胞系MDA-MB-231和人源宫颈癌细胞系HeLa中继续测试西多福韦和司他夫定的CC₅₀。图4结果显示,西多福韦在HFF-1、MDA-MB-231和HeLa细胞中的半数毒性浓度均大于400 μmol/L,显示出优异的安全性。司他夫定在HFF-1、MDA-MB-231和HeLa细胞中的半数毒性浓度分别为907.9 μmol/L、1 401 μmol/L和1 515 μmol/L,同样显示出优异的安全性。综上,所筛选出来的西多福韦和司他夫定药物均对多种人源细胞具有很高的CC₅₀值,非常安全。

2.5 西多福韦和司他夫定对溶瘤腺病毒YSCH-01的半数抑制浓度测定

通过测定不同浓度西多福韦和司他夫定处理下溶瘤腺病毒YSCH-01在A549和HeLa细胞中复制72 h后的滴度,可分别计算西多福韦和司他夫定在这两种细胞中对溶瘤腺病毒YSCH-01的半数抑制浓度。图5结果显示,西多福韦在A549细胞中对YSCH-01的半数抑制浓度为1.437 μmol/L,在HeLa细胞中对YSCH-01的半数抑制浓度为1.088 μmol/L;司他夫定在A549细胞中对YSCH-01的半数抑制浓度为29.27 μmol/L,在HeLa细胞中对YSCH-01的半数抑制浓度为27.38 μmol/L。

根据西多福韦和司他夫定对A549细胞的CC₅₀和在A549细胞中对溶瘤腺病毒YSCH-01的IC₅₀可分别计算其在A549细胞中的安全指数SI值。经计算,



A: 不同浓度的利巴韦林抑制YSCH-01病毒复制; B: 不同浓度的更昔洛韦抑制YSCH-01病毒复制; C: 不同浓度的西多福韦抑制YSCH-01病毒复制; D: 不同浓度的司他夫定抑制YSCH-01病毒复制。

A: Ribavirin at different concentrations inhibited the replication of YSCH-01 virus; B: Ganciclovir at different concentrations inhibited the replication of YSCH-01 virus; C: Cidofovir at different concentrations inhibited the replication of YSCH-01 virus; D: Stavudine at different concentrations inhibited the replication of YSCH-01 virus.

图3 4种药物均能抑制YSCH-01病毒复制

Fig.3 The four drugs inhibit the replication of YSCH-01 virus

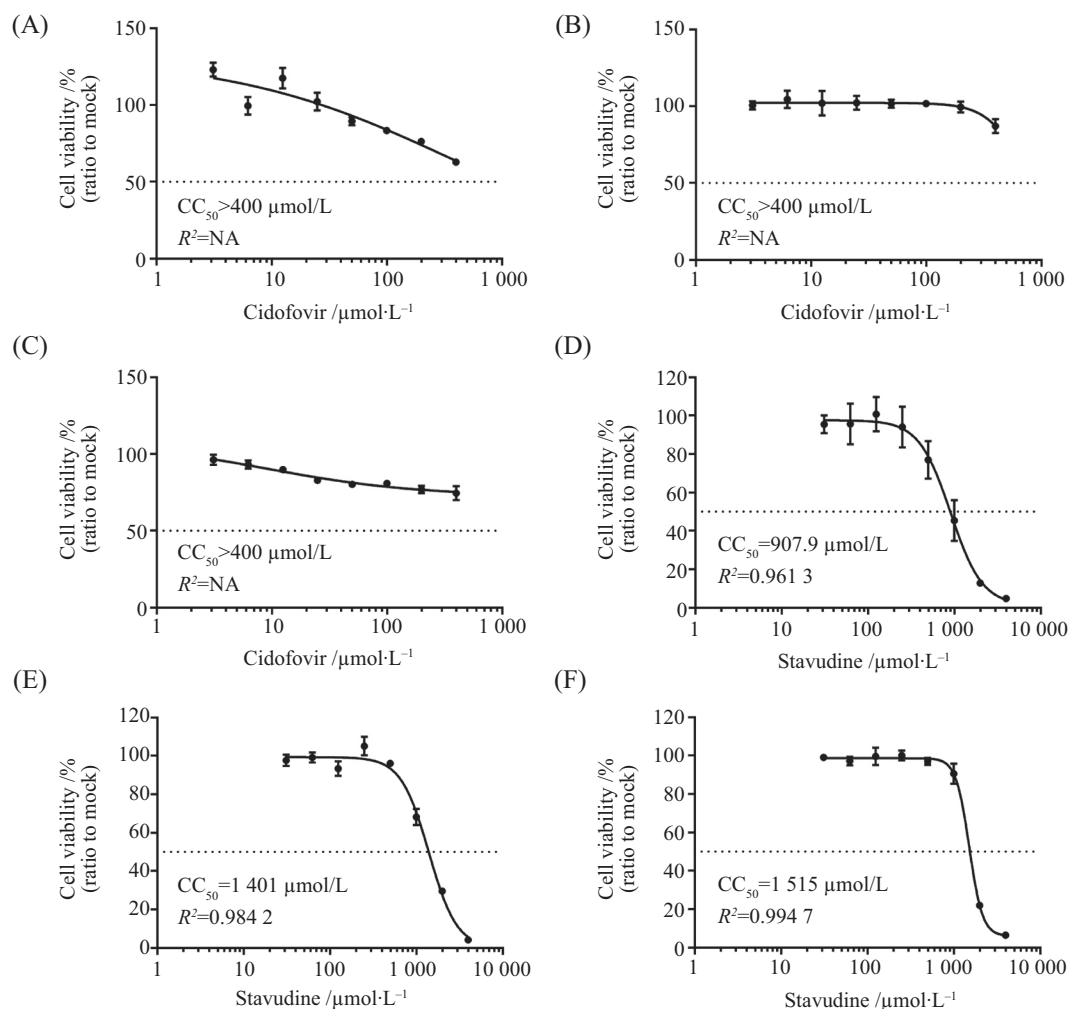
在A549细胞中司他夫定的SI值为79, 而西多福韦由于未检测出其对A549细胞的CC₅₀值, 按照其最大剂量范围估算, 其SI值大于278。同样可计算西多福韦在HeLa细胞中的SI值大于368, 司他夫定在HeLa细胞中的SI值为55。在测试的不同人源细胞系中, 这两种药物的SI值均远大于10, 表明其安全性高, 可作为溶瘤腺病毒YSCH-01的备选安全药物。

3 讨论

特异性针对人腺病毒的上市治疗药物还没有被报道过^[14-15], 仅有少量广谱抗病毒药被用于临床治疗腺病毒感染的研究^[16-21]。由于临床存在这方面的刚需, 近来也有不少研究者尝试开发各种类型的药物来特异性抑制腺病毒, 但目前大多处于临床前研究阶段, 进入临床阶段的都较少^[14-15, 22-25]。我们通过体外实验筛选到了能够有效抑制人5型腺病毒

复制的药物, 同时还综合考虑了药物对人体细胞的潜在毒副作用。经比较, 认为有两款药物较为合适, 其中西多福韦的用药浓度在50 μmol/L时效果最好, 基本上完全抑制了腺病毒的复制。但目前缺少其在体内对人腺病毒复制的抑制效果测试, 其在体内的副作用也尚不明确, 下一步需要设计并开展相关实验进行研究。基于现有文献报道, 西多福韦的副作用较低, 若进一步的研究证实没有明显的体内副作用, 可考虑选用此药物作为溶瘤腺病毒YSCH-01的安全备用药物。

在安全性测试中, 西多福韦对人源正常成纤维细胞HFF-1、人源肺癌细胞A549、人源三阴乳腺癌细胞MDA-MB-231及人源宫颈癌细胞HeLa的CC₅₀值均大于400 μmol/L, 一定程度上说明西多福韦在人源细胞中有足够的安全性, 但也可能是恰好选取的这几种细胞对此药物不敏感。为进一步确定安全



A: 西多福韦对HFF-1细胞的抑制曲线; B: 西多福韦对MDA-MB-231细胞的抑制曲线; C: 西多福韦对HeLa细胞的抑制曲线; D: 司他夫定对HFF-1细胞的抑制曲线; E: 司他夫定对MDA-MB-231细胞的抑制曲线; F: 司他夫定对HeLa细胞的抑制曲线。

A: inhibition curve of cidofovir on HFF-1 cell; B: inhibition curve of cidofovir on MDA-MB-231 cell; C: inhibition curve of cidofovir on HeLa cell; D: inhibition curve of stavudine on HFF-1 cell; E: inhibition curve of stavudine on MDA-MB-231 cell; F: inhibition curve of stavudine on HeLa cell.

图4 西多福韦和司他夫定对多种人源细胞的半数毒性浓度值

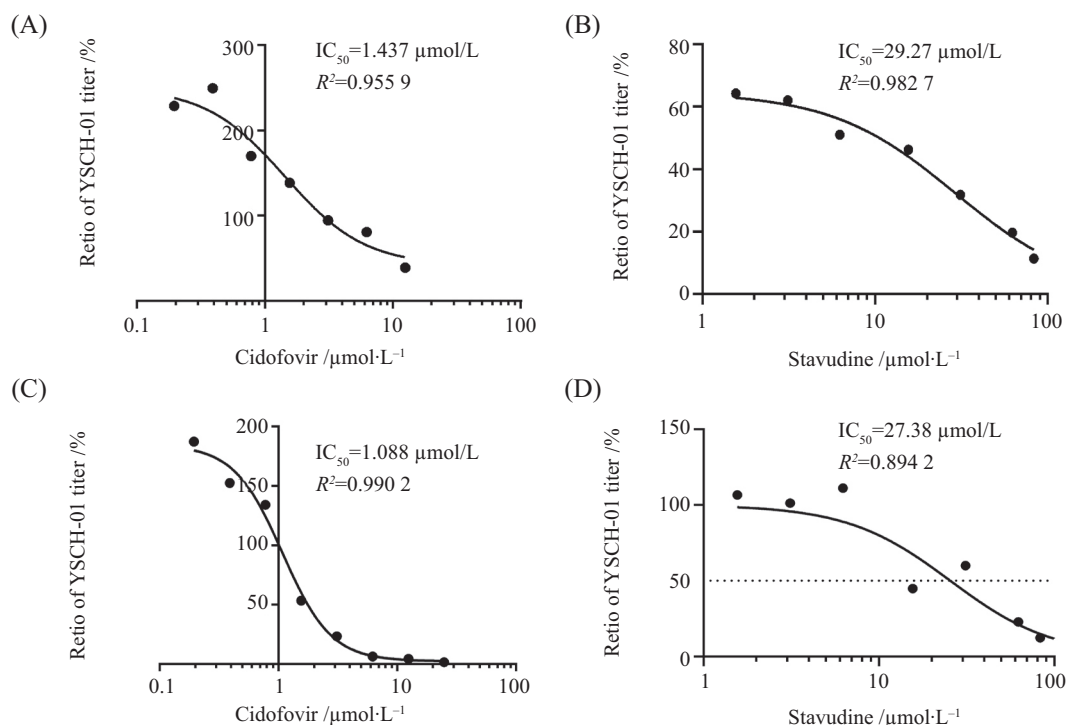
Fig.4 The 50% cytotoxic concentrations of cidofovir and stavudine to multiple human cells

性, 后续可查找或筛查对此药物敏感的人源细胞株, 并在体内实验时要特别关注其敏感细胞株对应的组织并对其进行重点分析。

免疫功能在治疗腺病毒感染中起到重要的作用, 有文献报道在儿童造血干细胞移植后感染腺病毒早期采用药物西多福韦治疗有一定的效果, 但由于其免疫功能低下, 并不能在停药后继续发挥良好的作用^[18]。经过造血干细胞治疗后的患者采用药物西多福韦进行早期干预治疗, 发现西多福韦对腺病毒相关疾病的早期治疗可抑制体内病毒复制并降低同种异体SCT受者的死亡率^[26]。这可能说明西多福韦对腺病毒疾病的早期干预治疗很重要, 而免疫功能对于抑制腺病毒的复制同样重要。目前体外实验

虽然取得了较好的效果, 但由于机体免疫功能的差距, 是否取得等效的效果需要进一步深入探究, 只能推测这些药物在免疫功能较好的患者早期干预治疗中能起到效果。有研究发现, 在免疫系统健全的个体中, 口服利巴韦林可能是治疗严重腺病毒肺炎的良好选择之一^[21]。但该药物对本研究中的溶瘤病毒并没有理想的抗病毒效果, 也不呈现剂量依赖性, 这提示同一抗病毒药物对不同的腺病毒的复制力影响可能存在显著差异。

还有文献报道, 在腺病毒传播的最初阶段给予利巴韦林后血浆中腺病毒的DNA负荷减少, 但是也有患者体内腺病毒DNA负荷出现了增加的趋势, 这一结果与我们体外实验中的空斑形成抑制、病毒复



A: 西多福韦在A549细胞中对YSCH-01病毒的半数抑制浓度; B: 司他夫定在A549细胞中对YSCH-01病毒的半数抑制浓度; C: 西多福韦在HeLa细胞中对YSCH-01病毒的半数抑制浓度; D: 司他夫定在HeLa细胞中对YSCH-01病毒的半数抑制浓度。

A: IC₅₀ of Cidofovir for YSCH-01 virus in A549 cell; B: IC₅₀ of Stavudine for YSCH-01 virus in A549 cell; C: IC₅₀ of Cidofovir for YSCH-01 virus in HeLa cell; D: IC₅₀ of Stavudine for YSCH-01 virus in HeLa cell.

图5 西多福韦和司他夫定在A549和HeLa细胞中对YSCH-01病毒的半数抑制浓度

Fig.5 IC₅₀ of Cidofovir and Stavudine for YSCH-01 virus in A549 and HeLa cell

制抑制实验结果有相同的趋势, 这是否与患者的免疫功能有关则需要进一步研究^[27]。这些报道结果提示即使药物体外研究很安全, 但是对于体内实际情况还需要进行实验来研究。同时, 药物的副作用也是很重要的一方面, 如果明确某药物有副作用, 那么我们应该选用同款药物的前体药或者改变为环状或者链状结构的类似药, 但前提是这些类似药也要能够达到较好的抑制腺病毒复制的作用^[28]。综上, 本研究筛选的西多福韦、司他夫定对临床试验中的腺病毒YSCH-01抗癌产品提供了用药安全所需的抗病毒药物研究提供了参考。

参考文献 (References)

- [1] GHEBREMEDHIN B. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance [J]. Eur J Microbiol Immunol, 2014, 4(1): 26-33.
- [2] ESPINOLA E E, BARRIOS J C, RUSSOMANDO G, et al. Computational analysis of a species D human adenovirus provides evidence of a novel virus [J]. J Gen Virol, 2017, 98(11): 2810-20.
- [3] GREBER U F, SUOMALAINEN M. Adenovirus entry: stability, uncoating, and nuclear import [J]. Mol Microbiol, 2022, 118(4): 309-20.
- [4] GAO H, LIU L, QU Z Y, et al. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine *in vitro* [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(2): 197-202.
- [5] SHANG L, QU Z, SUN L, et al. Astragaloside IV inhibits adenovirus replication and apoptosis in A549 cells *in vitro* [J]. J Pharm Pharmacol, 2011, 63(5): 688-94.
- [6] REEVES P M, BOMMARIUS B, LEBEIS S, et al. Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases [J]. Nature medicine, 2005, 11(7): 731-9.
- [7] YANG Z, SUN B, XIANG J, et al. Role of epigenetic modification in interferon treatment of hepatitis B virus infection [J]. Front Immunol, 2022, doi: 10.3389/fimmu.2022.1018053.
- [8] MARTINEZ-AGUADO P, SERNA-GALLEGO A, MARRUGAL-LORENZO J A, et al. Antiadenovirus drug discovery: potential targets and evaluation methodologies [J]. Drug Discov Today, 2015, 20(10): 1235-42.
- [9] BLUNT M D, KOEHRER S, DOBSON R C, et al. The dual Syk/JAK inhibitor cerdulatinib antagonizes B-cell receptor and microenvironmental signaling in chronic lymphocytic leukemia [J]. Clin Cancer Res, 2017, 23(9): 2313-24.
- [10] DE CLERCQ E. Cidofovir in the therapy and short-term prophylaxis of poxvirus infections [J]. Trends Pharmacol Sci, 2002, 23(10): 456-8.
- [11] UCKUN F M, PENDERGRASS S, QAZI S, et al. Phenyl phosphoramidate derivatives of stavudine as anti-HIV agents with

- potent and selective *in-vitro* antiviral activity against adenovirus [J]. *Eur J Med Chem*, 2004, 39(3): 225-34.
- [12] GAVIN P J, KATZ B Z. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children [J]. *Pediatrics*, 2002, 110(1Pt 1): e9.
- [13] BRUNO B, GOOLEY T, HACKMAN R C, et al. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2003, 9(5): 341-52.
- [14] MAZZOTTA S, BERASTEGUI-CABRERA J, VEGA-HOLM M, et al. Design, synthesis and *in vitro* biological evaluation of a novel class of anti-adenovirus agents based on 3-amino-1,2-propanediol [J]. *Bioorg Chem*, 2021, 114: 105095.
- [15] IMPARATO R, ROSA N, DE BERNARDO M. Antiviral drugs in adenovirus-induced keratoconjunctivitis [J]. *Microorganisms*, 2022, doi: 10.3390/microorganisms10102014.
- [16] OZEN S, OZER M A. Ganciclovir ophthalmic gel treatment shortens the recovery time and prevents complications in the adenoviral eye infection [J]. *Int Ophthalmol*, 2017, 37(1): 245-9.
- [17] HILLENKAMP J, REINHARD T, ROSS R S, et al. The effects of cidofovir 1% with and without cyclosporin a 1% as a topical treatment of acute adenoviral keratoconjunctivitis: a controlled clinical pilot study [J]. *Ophthalmology*, 2002, 109(5): 845-50.
- [18] LEGRAND F, BERREBI D, HOUHOU N, et al. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2001, 27(6): 621-6.
- [19] ROUPHAEL N G, HURWITZ S J, HART M, et al. Phase Ib trial to evaluate the safety and pharmacokinetics of multiple ascending doses of filociclovir (MBX-400, cyclopropavir) in healthy volunteers [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2019, doi: 10.1128/AAC.00717-19.
- [20] ACOSTA E, BOWLIN T, BROOKS J, et al. Advances in the development of therapeutics for cytomegalovirus infections [J]. *J Infect Dis*, 2020, 221(Suppl 1): S32-S44.
- [21] YOON B W, SONG Y G, LEE S H. Severe community-acquired adenovirus pneumonia treated with oral ribavirin: a case report [J]. *BMC Res Notes*, 2017, 10(1): 47.
- [22] MAZZOTTA S, MARRUGAL-LORENZO J A, VEGA-HOLM M, et al. Optimization of piperazine-derived ureas privileged structures for effective antiadenovirus agents [J]. *Eur J Med Chem*, 2020, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111840.
- [23] KARIMI A, MORADI M T, ALIDADI S, et al. Anti-adenovirus activity, antioxidant potential, and phenolic content of black tea (*Camellia sinensis Kuntze*) extract [J]. *J Complement Integr Med*, 2016, 13(4): 357-63.
- [24] MARRUGAL-LORENZO J A, SERNA-GALLEGO A, GONZALEZ-GONZALEZ L, et al. Inhibition of adenovirus infection by mifepristone [J]. *Antiviral Res*, 2018, 159: 77-83.
- [25] WANG X, ZHANG Q, ZHOU Z, et al. Retinoic acid receptor beta, a potential therapeutic target in the inhibition of adenovirus replication [J]. *Antiviral Research*, 2018, 152: 84-93.
- [26] NEOFYTOS D, OJHA A, MOOKERJEE B, et al. Treatment of adenovirus disease in stem cell transplant recipients with cidofovir [J]. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, 13(1): 74-81.
- [27] LANKESTER A C, HEEMSKERK B, CLAAS E C, et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 38(11): 1521-5.
- [28] HOSTETLER K Y. Synthesis and early development of hexadecyloxypropylcidofovir: an oral antipoxvirus nucleoside phosphonate [J]. *Viruses*, 2010, 2(10): 2213-25.