

抗乙肝病毒治疗新策略:阻断 P-ε 相互作用

黄亚运^{1,2}, 胡康洪^{1,2*}

(1. 湖北工业大学 中德生物医学中心, 武汉 430068; 2. 发酵工程湖北省协同创新中心, 武汉 430068)

摘要: 目前, 临床上治疗乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)导致的慢性乙肝药物存在应答率低、副作用大和耐药性等缺点, 急需寻找抗病毒治疗的新靶点。HBV 反转录过程中, 反转录酶(P 蛋白)和位于病毒前基因组 RNA (Pregenome RNA, pgRNA) 5' 邻近的 RNA 包装信号(ε)的相互作用(又称 P-ε 相互作用)非常关键, 该相互作用有宿主蛋白如热激蛋白的参与。P-ε 复合物形成后, 一方面引发反转录的启动, 另一方面启动核衣壳的包装。目前封闭 P-ε 相互作用的策略主要有热激蛋白抑制剂、ε 适配子和阻断 P 蛋白的化合物三个方面, 其机制为针对性靶向 P 蛋白或者宿主蛋白, 从而直接或间接地阻断 P-ε 相互作用。前期, 我们首次体外筛选到干扰 P-ε 相互作用的适配子, 体外实验及动物实验均证实, 该类适配子强烈抑制 HBV 复制。总之, P-ε 相互作用为抗乙肝研究的临床治疗提供了一个极具吸引力和应用前景的药物靶点, 上述三种策略绕过或克服了目前临床上 HBV 对化疗药的耐药问题, 具有较高的应用前景。

关键词: 乙型肝炎病毒(HBV); 反转录酶(P 蛋白); RNA 包装信号(ε); P-ε 相互作用; 前基因组 RNA(pgRNA)

中图分类号: R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8721(2014)06-0713-08

前言

人类乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)是嗜肝 DNA 病毒科的代表类型, 为通过反转录进行复制的小分子 DNA 病毒^[1]。HBV 感染是世界性的公共健康问题, 慢性感染导致肝纤维化、肝硬化和肝癌^[2]。目前, 慢性乙肝临床治疗主要通过注射干扰素或服用核苷(酸)类似物如拉米夫定、阿地福韦等。然而, 干扰素应答率低, 副作用大; 使用核苷(酸)类似物易引起耐药性病毒突变株的出现以及停药反弹^[2-5]。因此, 在抗病毒战略中, 确立新颖的药物靶标并有针对性地发展新药显得日益紧迫。

嗜肝 DNA 病毒的复制与其他反转录病毒的复制有很大区别, HBV 聚合酶也是反转录酶, 称为 P 蛋白, 包含末端蛋白(TP)、反转录酶(RT)及 RNaseH 三个结构, 在 TP 和 RT 二个结构之间还存在一个无功能意义的 Spacer 区。其中, TP 区为嗜肝 DNA 病毒所独有, 所有其他反转录病毒没有此区域, 提示该结构可发展为抗病毒靶标。病毒前基因组 RNA(Pregenome RNA, pgRNA)从细胞核进入细胞质并经翻译产生衣壳亚单位(core)和 P 蛋

白, 后者结合至 pgRNA 的 5' 端附近的 RNA 包装信号(ε)的茎环结构上, 启动衣壳亚单位的聚合和装配以及反转录起始。在反转录合成 HBV 负链 DNA 之前, HBV 的 P 蛋白首先需要以 ε 分子内的侧向突出(Bulge)结构为模板, 合成 3~4 个寡核苷酸作为反转录合成的起始引物, 这一过程称为引发(priming)。新合成的引物与 P 蛋白 TP 区内第 63 位的 Tyr 残基共价结合。在起始引物合成后, P 蛋白及新合成的引物转位至 pgRNA 3' 末端附近的 DR1 * 区, 以 pgRNA 为模板, 合成互补性 HBV 负链 DNA。负链 DNA 合成后, P 蛋白则以其为模板, 催化合成与之互补的正链 DNA^[1-2, 6], 完成病毒的复制(图 1)。

病毒核衣壳包装过程的关键步骤在于, P 蛋白和 pgRNA 5' 末端 εRNA 茎环之间特异性识别, 形成核糖核蛋白(RNP)复合物, 该复合物的形成需要宿主蛋白如热激蛋白的参与以及 ATP 供应能量(图 1)。除了包装, P-ε 复合物形成后从头合成反转录的引物, 启动反转录合成病毒 cDNA^[8]。鉴于这一事实, P-ε 间的相互作用为抗乙肝病毒研究和临床治疗策略提供了一个极具吸引力和应用前景的药物靶点。目前, 封闭 P-ε 相互作用的策略主要有 ①热激蛋白抑制剂; ②筛选 ε 适配子, 充当野生型 ε 的竞争性抑制剂; ③封闭 P 蛋白的化合物。现分述如下:

1 热激蛋白抑制剂

1.1 热激蛋白(Heat-shock protein, Hsp) 热激蛋白(Heat-shock protein, Hsp) 又称伴侣蛋白, 在细

收稿日期: 2014-07-01; 修回日期: 2014-09-24

基金项目: 湖北工业大学启动基金(Nr. 337. 193); “十二五”国家科技重大专项基金(2012ZX10004503-008)

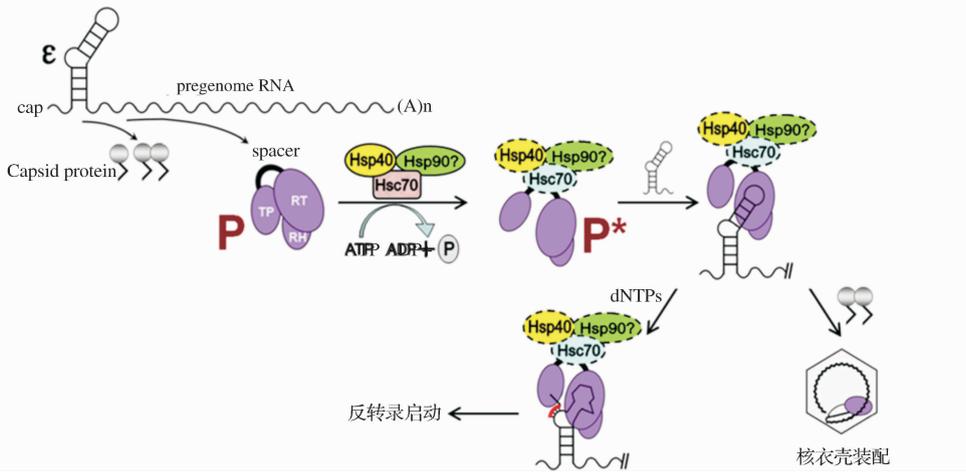
作者简介: 黄亚运(1989-), 女, 湖北宜城人, 硕士研究生, 主要从事生物工程研究, Tel: 15827341085, E-mail: hyy09012025@163.com

* 通讯作者: 胡康洪(1964-), 湖北武汉人, 博士生导师, 主要从事生物医药研究, Tel: 18062676968, E-mail:

hukh@mail.hbut.edu.cn

胞中的主要功能为防止具有重要功能的蛋白的错误折叠及积累。主要的原核生物细胞溶质的分子伴侣系统,除了 60kD Hsp60(细菌中的 GroEL)伴侣蛋白,还有 Hsc70 和 Hsp90。伴侣蛋白的活性一般依赖于 ATP,通常还通过多种辅助伴侣蛋白如 Hop 等进行共同调节^[9-10]。Hsp70(细菌中的 Dna K)与 Hsp40(细菌中的 Dna J)以及其他 J 结构域蛋白相互协调,通常有更广义的作用,比如非天然蛋白质的

折叠,包括新生的或者错误折叠的蛋白质,然而很少用来直接调节天然底物活性^[11]。Hsp90 对于大部分蛋白生物合成是非必须的,它通常充当一个很专业的分子伴侣来激活多种近似天然客户蛋白,包括一些重要的调控分子比如类固醇激素受体和激酶^[12-13]。通常情况下,Hsp90 需要和 Hsp70 系统共同协调作用,通过 Hsp70-Hsp90 及辅助蛋白 Hop 介导调节^[14]。



ε RNA is a RNA hairpin located at the 5' end of the pgRNA. It is firstly specially recognized by P protein with the assistance of cellular chaperones. Subsequently, using the ε bulge structure as template, the P protein catalyzes the generation of a 3- to 4- nt primer that is covalently linked to the TP domain. Binding of P protein to ε RNA also triggers the process of nucleocapsid assembly. (modified from Feng H and Hu K, *Virologica Sinica* 2009)

图 1 HBV P 蛋白的复制启动^[2]

Figure 1 Replication initiation of P protein of hepatitis B virus.^[2]

1.2 热激蛋白与 HBV 反转录的作用 长久以来,缺乏在体外可溶的具有活力的重组 P 蛋白,严重阻碍了对 HBV 复制中 P-ε 相互作用细节的理解。近年来发展的无细胞系统,使得利用鸭 HBV(DHBV)模型在体外详细地生化分析 P-ε 相互作用成为可能。Wang 等人利用兔网织红细胞裂解液(Rabbit reticulocyte lysate, RL)成功地体外翻译了有活性的 DHBV P 蛋白,P 蛋白能和另外单独加入的体外转录的 DeRNA 特异性结合,并启动引发^[15]。从这一系统取得了二项重要发现:① De 和 P 蛋白结合后,还必须经历一个构象转换才能引发。在这一过程中,De 的上茎的碱基对融化解链成为开环,便于 P 蛋白 TP 区的空间靠近^[7,16]。也就是说,物理结合和结构重排是 ε 和 P 蛋白相互作用的二个重要步骤,在此之后,才能发生蛋白引发。② RL 系统不仅具备翻译活力,其组份中包含的 ATP 和 Hsp 等细胞伴侣分子^[17-20]对 P-De 复合物功能性重建至关重

要。

Nassal 研究组^[18]把带有溶解度增强域如 NusA、GrpE 或者 GST 等元件导入大肠杆菌,并从中成功获取了可溶性的重组 DHBV P 蛋白,使得在体外利用纯组分重建具有引发活性的 RT 复合物,用来分析单个伴侣蛋白的作用^[18]。对于 GST-融合 P 蛋白,把整个 RNase H 结构域以及 Spacer 区移除后,形成截短版的 miniP 仍具有引发活性,已经报道了它的活性严格依赖于 Hsp70 和 Hsp90 系统^[19]; Nassal 等^[18]主要利用 NusA-融合 P 蛋白(NusDP)进行研究,结果表明 Hsc70、Hsp40 和 ATP 对产生有活性的、亚稳定的 P* 是必要的。

最初,Hu J 研究组^[37]认为 Hsp90 对于 HBV 反转录的引发是必须的,但 Nassal 组对此有怀疑态度。为了搞清楚 Hsp90 的具体作用,他们^[20]在体外详细研究了 Hsp70 和 Hsp90 是单个的还是共同作用来影响嗜肝病毒的 P 蛋白活性。对于 Hsp90,

使用 ATP 酶活力缺陷的突变体或者和辅助伴侣蛋白 Hop 相互作用;对于 Hsp70,通过 Hsc70 核苷酸交换因子 Bag-1 来影响 ADP-ATP 交换速率。Bag-1 属于一个蛋白家族,这个蛋白家族所有蛋白包含至少一个保守的拷贝数,大约 50 个氨基酸长度的 Bag 结构域介导它们和 Hsp70 的相互作用^[21]。通过 ATP 水解和 ADP-ATP 交换,Hsp70 对底物循环的结合和释放,这是 Hsp70 活性的标志^[11]。Bag-1 通过 ADP-ATP 交换率来加快这个循环,这依赖于 Bag-1 亚型和 Bag-1 在 Hsp70 中的比例,可能增加或减少所有伴侣蛋白的活性。结果发现:Hsp70 系统再加上 ATP 足以激活 P 蛋白,还通过 Bag-1、Hsp90 和 Hop 显著增强活性^[22]。因此,在体外,Hsp70 是将 P 蛋白转入激活状态的必要因子,Hsp90 仅仅维持激活程度。

1.3 Hsp 抑制剂前景 鉴于热激蛋白在 P- ϵ 相互作用中发挥不可或缺的作用,发展热激蛋白抑制剂抑制其活性,进而阻断 P- ϵ 的相互作用,达到抑制 HBV 反转录的作用,成为人们一直追求的目标。目前,已有 Hsp90 抑制剂格尔德霉素(geldanamycin, GA)抗肿瘤的报道^[23],其抗肿瘤活性通过竞争性结合 Hsp90 N-末端 ATP/ADP 的结合位点,改变 Hsp90 构象,特异性抑制 Hsp90 所需的 ATP 酶的活性,并使其不能与效应蛋白及其他小分子蛋白形成复合体,从而抑制其行使正常的分子伴侣功能,最终导致客户蛋白降解,阻断肿瘤赖以生存的信号通路。最近, Bian 等^[39]构建了一个靶向 HBV 表面基因 siRNA 和靶向 Hsp 家族中 Hsc70 的 shRNA (siHsc70),让它们共同作用于 HepG2. 215 细胞系,发现可以高效下调 HBV 表达和复制水平。

传统的抗 HBV 治疗时,病毒 P 蛋白中 RT 区域内 YMDD 基序变异引起耐药,影响化疗效果,而以上述发现的热激蛋白为靶点发展的抑制剂,使病毒不能仅仅凭借简单的突变来躲避药物攻击,从而可以减少耐药病毒的产生。因此,以这些细胞自身相对保守的蛋白为靶点的抗病毒药物设计,已经成为新型抗 HBV 药物开发的一条新思路。但是,考虑到热激蛋白也是寄主肝细胞重要的功能蛋白,对细胞毒性较大,发展热激蛋白抑制剂作为抗 HBV 药物的前景是有限的。

2 适配子

2.1 SELEX 技术与适配子 SELEX 技术即“指数富集配体系统进化(Systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)”。该技术是建

立在随机寡聚核苷酸文库的基础上通过重复地进行多轮分离和 PCR 扩增,从而得到能与各种靶分子在空间构型特异匹配的高亲和结合的寡聚核苷酸片段的组合化学技术,筛选所得的高亲和寡聚核苷酸片段被称作适配子^[24]。适配子靶标可以从有机小分子到复杂的蛋白质甚至完整的细胞,适配子是具有高亲和力,特异性和稳定性的有前景的药物候选化合物^[25]。此外,这些优点扩大了适配子作为治疗和诊断用途的可能性。第一个以适配子为基础的药物已被批准用于眼部血管疾病的治疗^[26]。

2.2 适配子对 HBV 复制的影响 由于 HBV 受到各种实验模型的限制, DHBV 则提供了一个有价值的替代模型。早期,对于 DHBV,通过体外表达重组 P 蛋白而成功地获得具有引发活性的 RNP 后,我们在世界上首次运用 SELEX 技术,体外筛选到与 DHBV P 蛋白高亲和的适配子,这些适配子一旦和 P 蛋白结合后,不再启动引发反应,阻止了病毒反转录合成^[40]。利用这些体外筛选的适配子,我们发现在 De 分子内:①具备开环的上茎结构有利于和 P 蛋白结合;② ϵ 分子内完整的侧向突出结构对 DHBV 反转录酶的启动引发至关重要^[27]。随后,报道了在 DHBV 基因组中,适配子序列替换野生型 HBV ϵ 序列后,在体内不发生回复突变而长期存在^[28]。对于 HBV,直到最近, Hu J 研究组才成功地在体外利用真核生物表达系统重组了具有活性的 RNP 复合物^[29],使我们研究组运用 SELEX 为基础筛选针对 HBV 的核酸适配子成为可能。在此基础上,我们从两个大的 ϵ RNA 文库中成功分离出与截短的乙型肝炎病毒 P 蛋白(miniP)高亲和力的 RNA 适配子^[30]。其中一个库(称为 AS),上部 ϵ 茎是完全随机的;另一个库(称为 S),维持天然保守顶端环序列。强结合高特异性适配子均从 S 库中获得,证明 ϵ 顶端环对于和 P 蛋白的相互作用至关重要,从而结束了学术界对此问题的多年争论。对筛选获得的与 P 蛋白强结合的适配子进行生化分析,我们首次揭示了 ϵ 分子内与 P 蛋白相互作用重要的序列和结构决定子^[31]。体外筛选得到具有最高亲和力和特异性结合的 S9 适配子,在瞬时共转染 HepG2 细胞和稳定表达 HBV 的 HepG2. 2. 15 细胞系中均强烈抑制病毒复制。这种抑制作用表明适配子的确能充当与 pgRNA 上野生型 ϵ 的竞争性抑制剂,干扰后者与 P 蛋白的结合,从而阻断病毒复制^[30]。无疑,体外 SELEX 为基础的适配子代表了一种有潜力用于治疗病毒性慢性乙肝的新型策略。

2.3 适配子应用前景 1998年,第一个适配子药物 Fomivirsen 被美国 FDA 批准上市,用于治疗巨细胞病毒引起的艾滋病患者的视网膜炎^[26]。截至今天,尚无新的适配子药物被批准上市。我们开发的诱饵适配子 S9,在细胞内以及正在开展的动物水平内能够抑制 HBV P- ϵ 复合物形成,从而阻断 HBV 复制。其效果和优点主要有:① S9 通过竞争性结合作用抑制野生型 P- ϵ 复合物形成,从而达到抑制 HBV 复制水平的效果;② 目前处于临床前研究的抗 HBV siRNA 药物在肝细胞内抗病毒特异性不强,“脱靶效应”造成细胞毒性,限制了该药物的进一步运用。相反,我们筛选得到的适配子 RNA 长达 60 多个碱基,与宿主细胞 mRNA 的杂交错配几率小很多,细胞毒性小。较强的抗病毒活力和较低的细胞毒性,使得该类 RNA 适配子有望发展为临床应用的新型抗 HBV 药物;③ 适配子所具备的高级结构,使其和野生型 ϵ RNA 相比,更能紧密地结合 P 蛋白,从而成为争夺病毒 P 蛋白的竞争抑制剂,这在机理上完全不同于 siRNA 的情况,很好地规避了目前临床上传统化疗药物的耐药性问题。总之,我们发展的 RNA 适配子有望解决当前慢性乙肝临床治疗中出现的低应答率、副作用和病毒逃逸形成耐药突变株等实际难题^[32]。

在实际给药中, RNA 适配子可以预先通过化学修饰的方法,提高 RNA 的稳定性。体外实验和小动物测试实验证实:适配子可以通过慢病毒包装的方式高效递送到肝脏细胞内,但慢病毒系统能否真正运用到人体内尚存在疑问。最近,我们开发了一种非常适合包装 RNA 的脂质体,静脉注射给药后,观察到该类脂质体在约 10 分钟内就在肝脏中滞留达 90%。通过膜融合的方式, RNA 药物被有效地释放进入肝细胞内。但目前仍需解决的问题是:① 化学修饰的 RNA 造成的细胞毒问题;② 脂质体在血液中的免疫原性问题。显而易见,在适配子被大规模的商品化之前,仍有许多问题需要人们克服和解决。

3 封闭 P 蛋白的化合物

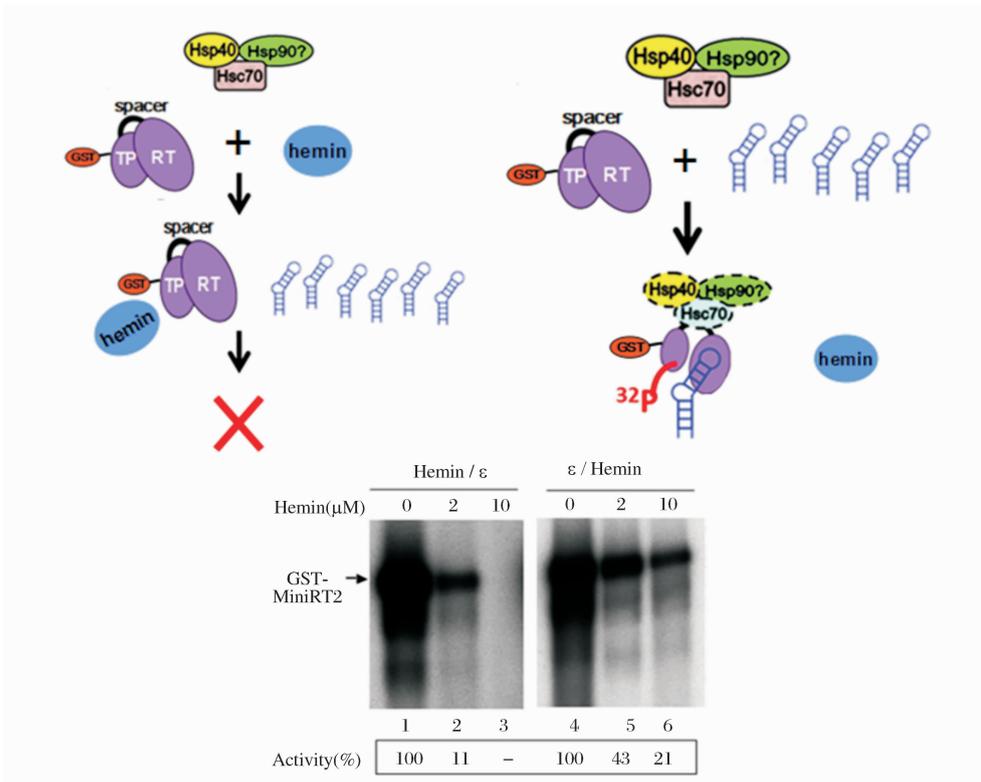
通过封闭 P 蛋白来阻断 P- ϵ 相互作用的化合物主要有血红素和羰基 J 酸衍生物(the carbonyl J acid),由于羰基 J 酸衍生物靶向 P 蛋白的具体位点还不是很清楚^[38],这里我们着重介绍血红素这类化合物。

3.1 血红素(hemin) 血红素(铁原卟啉 IX)是最

常见的金属卟啉(metalloporphyrin, MP),它是血红蛋白、肌红蛋白、脑红蛋白、细胞色素、过氧化氢酶和过氧化物酶的辅基。每个血红素由四个吡咯类亚基组成一个环,环中心为一个亚铁离子。血红素作为辅基还参与电子转移和氧化基本活动,由于所有这些基本活动很关键,血红素合成和降解几乎所有步骤与氧化平衡和许多信号传导途径紧密调节。20 世纪 70 年代以来,商业化的血红素制剂如氯高铁血红素(protohemin)和正铁血红素剂(Panhematin)已被 FDA 批准用于治疗急性卟啉症。除了自然铁卟啉环,多种合成的 MP 可以络合其它金属,如锌、铜、钴、镁、锰、锡、镍或铬。在缺铁时可以自然形成锌原卟啉,它是一个极好的缺铁性贫血的血清标志物,并有利于对新生儿黄疸的治疗^[34]。

3.2 血红素对 HBV 反转录的影响 据此前报道,血红素可以通过与人类免疫缺陷病毒(HIV)RT 连接域内残留的 398 到 407 位置的色氨酸残基潜在结合,从而抑制 HIV 反转录^[35]。进一步诱变研究表明,401 和 402 位置的色氨酸残基对血红素结合到 HIV RT 非常重要^[36]。Hu J 研究组^[33]猜测在 HBV 中可能会发生类似的作用,于是体外研究证实血红素确实能够抑制 HBV 复制。同时确定绿高铁血红素可以明确靶向 P 蛋白,但需要进一步在嗜肝病毒 TP 和 RT 域确定其结合位点。

Hu J 研究组^[33]还探索了血红素这类药物的抗病毒机理,发现这些化合物可能通过分子内卟啉环和 HBV P 蛋白的 TP 区中第 63 位的 Tyr 发生芳香族基团堆砌,从而封闭了酪氨酸基团。前已述及,该位置的 Tyr 侧链上的羟基本应直接和新合成的引物共价结合,启动反转录。封闭该关键位点, RNP 复合物无法行使正常功能。实验表明,在添加血红素之前让 ϵ RNA 与 P 蛋白结合,仍观察到蛋白引发活性(图 2,右)。相反,预先孵育血红素和 P 蛋白,随后再加入 ϵ RNA,由于 P 蛋白的结合位点被血红素封闭,不再形成 P- ϵ 复合物启动引发反应(图 2,左)。他们发现,氯化血红素和相关的卟啉化合物可以抑制纯化的莫洛尼鼠类白血病病毒 RT 和大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段,其效力略差于对 HBV 和 DHBV RT 的抑制作用。在细胞所能承受的浓度范围内,血红素和原卟啉 IX 可以在转染 HBV 和 DHBV 基因片段的肝癌细胞中部分阻断 DNA 合成和 RNA 包装,也能够抑制从昆虫细胞中纯化的 HBV P 蛋白引发活性。



GST-MiniRT2 was incubated with hemin before the addition of the εRNA (hemin/ε) (lanes 2 and 3) or incubated with εRNA before the addition of hemin (ε/hemin) (lanes 5 and 6). The ^{32}P -labeled GST-MiniRT2, as a result of protein priming, was resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and detected by autoradiography. Controls are those cells without incubation of εRNA or hemin (lanes 1 and 4) and their priming activity is defined as 100. Relative protein-priming activity is indicated at the bottom as a percentage of that of controls. The minus sign indicates undetectable protein-priming activity. (revised from Lin L and Hu J, J Virol, 2008)

图 2 RNP 复合物形成之前或之后加入 hemin 对 DHBV GST-MiniRT2 引发活性的影响^[33]

Figure 2 Inhibition of DHBV GST-MiniRT2 priming activity before or after RNP complex formation^[33]

3.3 血红素的应用前景 由于 P-ε 相互作用在病毒反转录的起始蛋白引发和核衣壳装配中起关键的双重作用,高铁血红素和它的类似物能靶向 P 蛋白独特的 TP 域,表现出对 HBV P-ε 相互作用的强抑制效果,因此这类化合物有望发展为一种新型、高效抗 HBV 慢性感染的药物。连同先前的发现,抗生素格尔德霉素能靶向用来建立和维持 P-ε 互作的重要宿主辅助因子 Hsp90,间接阻断 HBV P-ε 相互作用^[23,37]。血红素类化合物可以直接靶向 P 蛋白阻断 HBV P-ε 相互作用,将其与现有的核苷类似药物的联合作用,有望克服目前临床化疗中的耐药问题。然而,血红素也存在局限性,这些化合物分子量较大,细胞摄取效率很低,这也是它能真正被运用到临床上应克服的瓶颈。

小结与展望

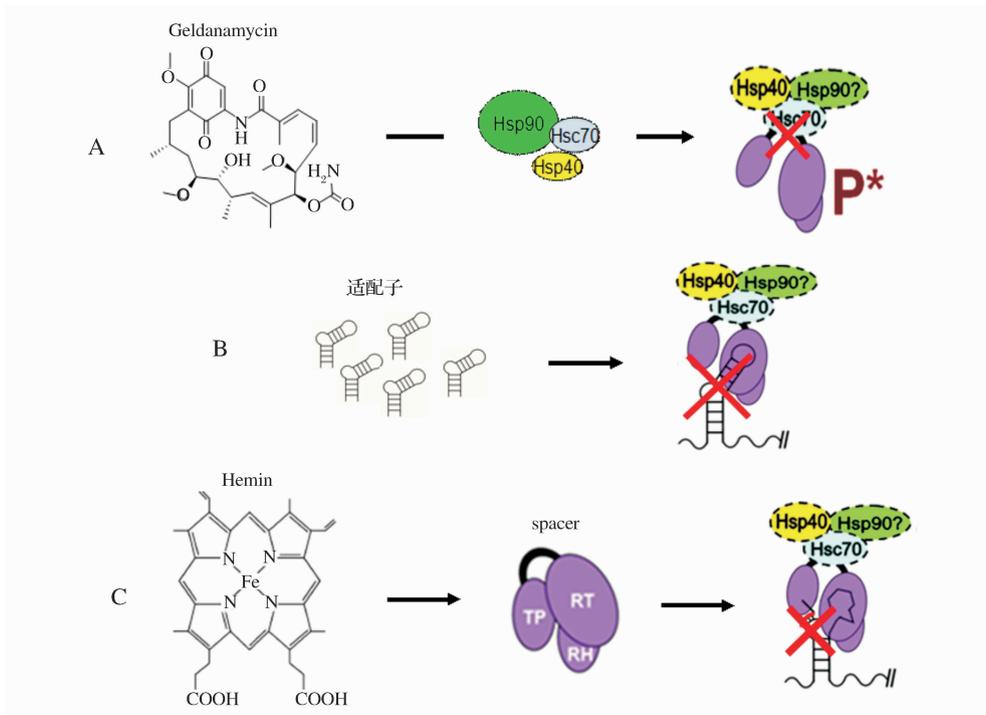
慢性 HBV 感染目前不能治愈,而 HCV 可以治愈,其主要原因就在于 HBV 会在肝脏细胞内形成

持续而稳定的 cccDNA(表现为 HBsAg 阳性)。传统的抗病毒药物作用靶点多为病毒的蛋白,作用机制是抑制病毒的复制无法清除 cccDNA。但是由于病毒的高速复制率,病毒复制酶的错误倾向性及在药物的压力下,病毒极易产生变异,降低对药物的敏感性,产生耐药株。病毒可以依靠自身基因的不断变异来逃避药物的攻击,耐药是传染性病毒治疗中的难题。本世纪以来,乙肝病毒感染的病原生物学研究取得显著进展,目前用 microRNA 和抗核心蛋白的小分子药物正在临床试验。此外,大量参与病毒感染、复制及释放等各个环节的细胞因子被确证,作用于细胞蛋白的抗病毒活性化合物被大量发现。以发现的细胞蛋白作为靶点,病毒不能仅仅凭借简单的突变来躲避药物攻击。

不同于传统的抗病毒药物,本文介绍的这三类化合物可以靶向 P 蛋白或者宿主蛋白,从而直接或间接的阻断 P-ε 相互作用(图 3)。热休克蛋白抑制

剂通过靶向宿主伴侣蛋白,间接阻断 P-ε 相互作用,进而影响 HBV 复制(图 3,A)。本研究组筛选获得的适配子,能通过竞争性结合作用抑制 HBV P-ε 复合物的形成,从而达到抑制 HBV 复制的效果(图 3,B)。氯高铁血红素和相关的化合物靶向 TP 结构域

的 N 末端,阻断 P-ε 相互作用(图 3,C)。由于以细胞蛋白和 P-ε 相互作用为靶点的抗病毒研究绕过了病毒耐药问题,有望进一步发展成为新型、有效的抗 HBV 药物,替代或与现有核苷类似物联合用药,弥补传统药物的不足。



A. Geldanamycin inhibits P-ε interaction indirectly by suppression of Hsp90^[14,17,23];
 B. ε aptamers compete with the wild-type ε for binding the P protein, thereby blocking the P-ε interaction^[27,30-31,40];
 C. Hemin targets the N-terminus of TP domain. Blockage of the Tyr residue within the region results in preventing the initiation of P-ε complex^[32-34].

图 3 开发干扰 P-ε 相互作用的抗 HBV 药物的三种策略

Figure 3 Three strategies for developing anti-HBV drugs to interfere P-ε interaction

最后,病毒 pgRNA 上还有一些对 P-ε 相互作用产生影响的顺式元件,比如 ω、φ、DR1 * 等^[6]。对这些元件进行突变或封闭,可能会负性调节或阻断 P-ε 相互作用。将这些策略与上述三种药物结合,对于有效克服 HBV 耐药性变异株,彻底治愈慢性乙肝具有很好的应用前景。

参考文献:

[1] Beck J, Nassal M. Hepatitis B virus replication [J]. World J Gastroenterol, 2007,13(1):48-64.
 [2] Feng H, Hu K. Structural Characteristics and Molecular Mechanism of Hepatitis B V-irus Reverse Transcriptase [J]. Virol Sin, 2009, 24(6): 509-517.
 [3] Ying C, Li Y, Leung C H, et al. Unique antiviral mechanism discovered in anti-hepatitis B virus research

with a natural product analogue [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(20): 8526-8531.
 [4] Ganem D, Prince A M. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences [J]. N Engl J Med, 2004, 350(11): 1118-1129.
 [5] Glebe D. Recent advances in hepatitis B virus research: a German point of view [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(1): 8-13.
 [6] Nassal M. Hepatitis B viruses; reverse transcription a different way[J]. Virus Res, 2008,134(2): 235-249.
 [7] Beck J, Nassal M. Formation of a functional hepatitis B virus replication initiation c-omplex involves a major structural alteration in the RNA template[J]. Mol Cell Biol, 1998, 18: 6265-6272.
 [8] Hu J, Lin L. RNA-protein interactions in hepadnavirus reverse transcription [J]. NIH Public Access, 2013,

- 14; 1606-1618.
- [9] Hartl F U, Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein[J]. *Science*, 2002, 295(8): 1852-1858.
- [10] Young J C, Agashe V R, Siegers K, et al. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(10): 781-791.
- [11] Mayer M P, Bukau B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2005, 62(6): 670-684.
- [12] Whitesell L, Lindquist S L. HSP90 and the chaperoning of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(10): 761-772.
- [13] Picard D. Chaperoning steroid hormone action[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2006, 17(6): 229-235.
- [14] Smith D F. Tetratricopeptide repeat cochaperones in steroid receptor complexes[J]. *Cell Stress Chaperones*, 2004, 9(2): 109-121.
- [15] Wang G H, Seeger C. The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis[J]. *Cell*, 1992, 71(4): 663-670.
- [16] Beck J, Nassal M. Sequence- and structure-specific determinants in the interaction between the RNA encapsidation signal and reverse transcriptase of avian hepatitis B viruses[J]. *J Virol*, 1997, 71(7): 4971-4980.
- [17] Hu J, Toft D O, Seeger C. Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids[J]. *EMBO J*, 1997, 16(1): 59-68.
- [18] Beck J, Nassal M. Efficient Hsp90-independent in vitro activation by Hsc70 and Hsp40 of duck hepatitis B virus reverse transcriptase, an assumed Hsp90 client protein[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(38): 36128-36138.
- [19] Hu J, Toft D, Anselmo D, et al. In vitro reconstitution of functional hepadnavirus reverse transcriptase with cellular chaperone proteins[J]. *J Virol*, 2002, 76(1): 269-279.
- [20] Stahl M, Retzlaff M, Nassal M, et al. Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system[J]. *Nuc Acids Res*, 2007, 35(18): 6124-6136.
- [21] Takayama S, Reed J C. Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(10): E237-E241.
- [22] Brehmer D, Rüdiger S, Gassler C S, et al. Tuning of chaperone activity of Hsp70 proteins by modulation of nucleotide exchange[J]. *Nat Struct Biol*, 2001, 8(5): 427-432.
- [23] Ochel H J, Schulte T W, Nguyen P, et al. The benzoquinone ansamycin geldanamycin stimulates proteolytic degradation of focal adhesion kinase[J]. *Mol Genet Metab*, 1999, 66(1): 24-30.
- [24] 胡康洪, 冯辉. 利用适配子抗病毒性肝炎的新型治疗策略[J]. *中华实验和临床感染病杂志*, 2009, 3[2]: 231-236.
- [25] Shangguan D, Li Y, Tang Z, et al. Aptamers evolved from live cells as effective molecular probes for cancer study[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 11838-11843.
- [26] Ng E W, Shima D T, Calias P, et al. Pegaptanib a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5: 123-132.
- [27] 胡康洪, 冯辉, 李卉. ε 分子内完整的侧向突出结构对鸭乙肝病毒反转录酶启动引发至关重要[J]. *病毒学报*, 2009, 25(4): 296-302.
- [28] Schmid B, Rösler C, Nassal M. A high level of mutation tolerance in the multifunctional sequence encoding the RNA encapsidation signal of an avian hepatitis B virus and slow evolution rate revealed by in vivo infection[J]. *J Virol*, 2011, 85(18): 9300-9313.
- [29] Scott S A, Boregowda A, Hu J, et al. In vitro epsilon RNA-dependent protein priming activity of human hepatitis B virus polymerase[J]. *J Virol*, 2012, 86(9): 5134-5150.
- [30] Feng H, Beck J, Nassal M, et al. A SELEX-Screened Aptamer of Human Hepatitis B Virus RNA Encapsidation Signal Suppresses Viral Replication[J]. *Plos One*, 2011, 6(11): 1-10.
- [31] Feng H, Chen P, Zhao F, et al. Evidence for Multiple Distinct Interactions between Hepatitis B Virus P Protein and Its Cognate RNA Encapsidation Signal during Initiation of Reverse Transcription[J]. *Plos One*, 2013, 8(8): 1-12.
- [32] 王薇薇, 胡康洪. RNA 药物抗乙型肝炎病毒的研究进展[J]. *武汉大学学报*, 2010, 56(1): 063-068.
- [33] Lin L, Hu J. Inhibition of Hepadnavirus Reverse Transcriptase-ε RNA Interaction by Porphyrin Compounds[J]. *J Virol*, 2008, 82(5): 2305-2312.
- [34] Warren N, Schmidt M, Meleah Mathahs, et al. Heme and HO-1 inhibition of HCV, HBV, and HIV[J]. *Pharmacology*, 2012, 3(129): 1-13.
- [35] Argyris E G, Vanderkooi J M, Paterson Y. Mutagenesis of key residues identifies the connection subdomain of HIV-1 reverse transcriptase as the site of inhibition by heme[J]. *Eur J Biochem*, 2001, 268: 925-931.

- [36] Argyris E G, Vanderkooi J M, Venkateswaran P S, et al. The connection domain is implicated in metalloporphyrin binding and inhibition of HIV reverse transcriptase[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274: 1549-1556.
- [37] Hu J, Seeger C. Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93: 1060-1064.
- [38] Wang Y, Wen Y, Nassal M. Carbonyl J Acid Derivatives Block Protein Priming of Hepadnaviral P Protein and DNA-Dependent DNA Synthesis Activity of Hepadnaviral Nucleocapsids[J]. *J Virol*, 2012, 86(18): 10079-10092.
- [39] Bian Z, Xiao A, Cao M, et al. Anti-HBV efficacy of combined siRNAs targeting viral gene and heat shock cognate 70[J]. *Virol J*, 2012, 9(275): 1-14.
- [40] Hu K, Beck J, Nassal M. SELEX-derived aptamers of the duck hepatitis B virus RNA encapsidation signal distinguish critical and non-critical residues for productive initiation of reverse transcription[J]. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(14): 4377-4389.

New Strategy for Anti-HBV Therapy: Blocking P-ε interaction

HUANG Ya-yun^{1,2}, HU Kang-hong^{1,2*}

(1. Hubei University of Technology, Sino-Germay Biomedical Center, Wuhan 430068, China;

2. Hubei Collaborative Innovation Center for Industrial Fermentation, Wuhan 430068, China)

Abstract: Clinically being applied treatment against chronic hepatitis has three limitations: low response rates, severe adverse effects and a high rate of drug resistance. Hence, novel targets for antiviral therapy need to be developed so as to provide an armory of different strategies. During the replication of hepatitis B virus, the interaction of viral polymerase (P protein, also called P) and εRNA is indispensable for the initiation of reverse transcription via protein priming and the pregenome RNA (pgRNA) packaging. Three strategies are currently developed for blocking P-ε interaction: heat shock protein inhibitors, aptamers and chemical compounds for blocking formation of P-ε complex. Previously, our group has for the first time worldwide in vitro screened several aptamers, which are able to interfere with the P-ε interaction. A strong inhibition against HBV was observed in vitro and in vivo experiments, respectively. In conclusion, the so far developed chemicals suppressing the P-ε interaction may bypass or overcome the viral resistance problems during clinic treatment and represent a highly attractive option for therapeutic intervention.

Key words: Hepatitis B virus (HBV); Replication; Polymerase (P protein); εRNA; Pregenome RNA (pgRNA)

* Corresponding author: HU Kang-hong, E-mail: hukh@mail.hbut.edu.cn