

抗乙肝病毒药物研究新进展

刘求明^{1,2}, 尧晨光¹, 郭晓红², 胡康洪^{1*}

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

2. 武汉生物工程学院, 生命科学与技术学院, 应用生物技术研究中心 430068)

摘要:慢性病毒性乙型肝炎的根治是完全清除肝脏乙肝病毒,但是目前一线治疗药物恩替卡韦(ETV)和替诺福韦酯(TDF)等不能达到根治的目的。乙肝病毒 cccDNA 持续潜伏在肝细胞核中,机体的免疫应答也不能将其清除。目前用于治疗乙肝的药物包括核苷(酸)类似物、非核苷(酸)类似物和免疫调节剂,但这些药物均有各自的局限性,因此寻找新的药物作用靶点和研发新型抗乙肝病毒药物显得极为迫切。鉴于近年来乙肝病毒 cccDNA 和宿主免疫治疗的研究有了突破性进展,本文总结了新型乙肝病毒药物研究和发展现状,并展望了未来靶向病毒和宿主免疫反应的治疗策略。

关键词:乙肝病毒;抗乙肝病毒药物;cccDNA;核苷(酸)类似物;药物作用靶点;免疫调节剂

中图分类号:R373.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-8721(2016)05-0000-00

乙型肝炎病毒(Hepatitis B virus, HBV)是典型的嗜肝性 DNA 病毒[1,2],慢性感染乙肝病毒会发展成为肝硬化、肝功能代谢失偿甚至肝癌。肝病是全世界高死亡率病症之一,据统计 2013 年大约有 686000 例死亡病例是由乙肝病毒感染引起的[3]。尽管当前的疫苗使用很成功,但是乙肝病毒感染仍然是威胁公众健康的难题,目前的治疗效果不尽令人满意。

乙肝病毒诱导肝脏疾病的严重性在受感染的个体中差别很大,超过 95% 的成年人感染乙肝病毒 6 个月后自发的清除,而超过 90% 的婴幼儿感染后发展成为慢性感染[4,5]。在乙肝病毒携带者中除了毛玻璃肝细胞的出现可能是因为大包膜蛋白在内质网中积累导致外,乙肝病毒感染不足以引起细胞病变效应[6]。因此通常认为乙肝病毒感染引起的相关肝脏疾病的严重性取决于宿主免疫反应抗病毒的本质和程度。

乙肝表面抗原(HBsAg)清除和乙肝分泌型抗原(HBeAg)血清转化被认为是乙肝有效治疗的标志。美国食品和药品监督管理局(FDA)已经批准

用于慢性乙肝病毒治疗的药物分为两类:一类是免疫调节剂,包括干扰素 α (IFN- α)和聚乙二醇干扰素 α ;另一类是核苷类似物和核苷酸类似物前体药,核苷类似物包括拉米夫定、替比夫定和恩替卡韦,核苷酸类似物前体药包括阿德福韦酯和富马酸替诺福韦酯等[7,8]。

1 目前抗病毒药物的局限性

治疗乙肝的最终目的是消除核内 cccDNA,或者抑制 cccDNA 的转录活性。目前国际乙肝病毒专业管理部门推荐的第三代乙肝一线治疗药物 pegIFN- α 2a、ETV 和 TDF[9],其药理性质有巨大差异,例如干扰素为免疫调节剂,激活 JAK-STAT 信号通路抑制病毒复制[5]。干扰素治疗效果持久并且具有较高的病毒表面抗原清除率,但其应答率低且副作用大,例如有流行性感冒症状出现、易疲劳、嗜中性白血球减少症、血小板减少症和精神不振[10]。核苷类似物直接作用于病毒逆转录酶,阻断乙肝病毒复制。缺点是疗程漫长,需要终身治疗,因为核苷类似物是在胞质环境中抑制乙肝病毒复制,对核内 cccDNA 库没有影响。另一方面乙肝病毒聚合酶在病毒复制时有错误倾向,长期服用此类药物易积累耐药抗性,副作用也相应增加,并且一旦停止给药,病毒容易反弹[11,12]。

在过去的几十年里面,核苷类似物和干扰素联合用药治疗慢性乙肝已经引起了广泛的关注。核苷类似物治疗可能缓解病毒介导的 T 细胞枯竭,促使乙肝病毒特异性 T 细胞更好的应答聚乙二醇治疗。用核苷类似物 ETV 和 TDF 结合聚乙二醇干扰素的治疗策略表现出了较好疗效,用药后 HBsAg 和

收稿日期:2016-05-18;修回日期:2016-06-26

基金项目:湖北省自然科学基金重点项目(项目号:No. 2014CFA075),题目:RNA 诱饵分子抗 HBV 功效的体内研究;国家自然科学基金(项目号:No. 31301137),题目:AMPK 经 ZO-1 抑制人舌癌细胞增殖与迁移的分子机理。

作者简介:刘求明、尧晨光并列第一作者。刘求明(1991-),男,湖北人,硕士研究生,主要从事分子病理学研究。E-mail: liuqiuming123@sina.com;尧晨光(1989-),男,湖北人,硕士研究生,主要从事生物工程研究。E-mail: mengqingchenguang@163.com

* **通讯作者:**胡康洪,教授,主要从事再生医学研究,E-mail: hukh@mail.hbut.edu.cn

HBeAg 均发生血清转化。在单独使用聚乙二醇干扰素或核苷类似物治疗率差的情况下,免疫介导的治疗或者潜在的核苷类似物联合病毒靶向系统和cccDNA 抑制剂可能是治疗乙肝病毒持续性感染的较好方法。

2 药物作用新靶点

随着科学研究的进步,人们对乙肝病毒复制循

环和病毒与宿主相互作用关系持续深入,新的作用靶点和新型抗病毒药物不断被发现(见表 1)。除了作用于病毒逆转录的核苷类似物和提高免疫应答的干扰素外,针对于病毒侵入、病毒 DNA 转录、病毒粒子的包装和释放的也正在研制中,特别是对封闭和降解 cccDNA 研究相当火热,也取得了阶段性进展。

表 1 现存的和潜在的抗乙肝病毒药物(截至 2016 年 1 月)
Table 1 Existing and potential anti-HBV drugs (up to January 2016)

Classification	Name	Mechanism	Clinical Phases	Developers
	Lamivudine(LMV)	Inhibiting HBV DNA replication	Approved by FDA in 1998	GlaXoSmithkline
	Adefovir dipivoxil (ADV)	Inhibiting HBV DNA replication	Approved by FDA in 2002	Gilead Science
	Entecavir (ETV)	Inhibiting HBV DNA replication	Approved by FDA in 2005	Bristol-Myers Squibb
	Telbivudine (LdT)	Inhibiting HBV DNA replication	Approved by FDA in 2006	Novartis
	Tenofovir disoproxil fumarate	Inhibiting HBV DNA replication	Approved by FDA in 2008	Gilead Science
Nucleos(t)ide (TDF) and nucleos(t)ide analogues	Clevudine(CLV)	Inhibiting HBV DNA replication	Approved in Korea and Philippines	Bukwang Pharmaceutical Ildong Pharmaceuticals and LG Life Sciences
	Besifovir(LB80380)	Inhibiting HBV DNA replication	Phase III	Gilead Science
Interferon	Tenofovirafenamide(TAF)	Prodrug	Phase III	Cantra Vir Pharmaceutical
	CMX157	Prodrug	Phase II	Gilead Science
	AGX-1009	Prodrug	Phase I in China	Cantra Vir Pharmaceutical
	IFN- α	Immune modulator	Approved by FDA in 1992	Agenix
	pegIFN- α 2a	Immune modulator	Approved by FDA in 2005	Merck
	Myrecludex-B	Entry Inhibitor	Phase II	Genentech
	ZFNs	Inactivating cccDNA	Preclinical	Myr-GmbH
	TALENs	Inactivating cccDNA	Preclinical	
	CRISPR-Cas9	Inactivating cccDNA	Preclinical	
	CCC-0975	Blocking cccDNA synthesis	Preclinical	
CCC-0346	Blocking cccDNA synthesis	Preclinical		
Non-nucleos(t)ide analogues	Lymphotoxin beta receptor activator	Degrading cccDNA	Phase I	
	ARC-520	RNA interference	Phase II	Arrowhead Research
	ARB-1467	RNAinterference	Phase II	Tekmira
	ALN-HBV	RNAinterference	Preclinical	Alnylam
	TKM-HBV	RNAinterference	Preclinical	Tekmira
	NVP-018	Inhibiting cyclophilin	Phase I	Tekmira Pharmaceuticals Corporation
	CPI-431-32	Inhibiting cyclophilin	Preclinical	Ciclofilin Pharma
	SCYX1454139	Inhibiting cyclophilin	Preclinical	
	Bay 41-4109	Degrading nucleocapsid	Phase I	AiCuris
	GLS4	Degrading nucleocapsid	Phase II	Sunshine Lake Pharma of HEC
	NVR-3778	Degrading nucleocapsid	Phase II	Novira Therapeutics
	AT-61 和 AT130	Inhibiting capsid assemble	Preclinical	Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory
	Rep 2319-Ca	Inhibiting HBsAg secretion	Phase II	REPLICor Inc

续表 1

Classification	Name	Mechanism	Clinical Phases	Developers
Immune modulators	GS-9620	TLR-7 activator	Phase II	Gilead Science
	STING agonist	PRR activator	Preclinical	OnCore
	CYT-003	TLR-9 activator	Preclinical	Tekmira Pharmaceuticals Corporation
	SB9200	RIG-I and NOD-2 activator	Phase II	Spring Bank Pharmaceuticals
	GS-4774	Therapeutic Vaccine	Phase II	Gilead Science
	TG1050	Therapeutic Vaccine	Phase I	Trangene
	ABX203	Therapeutic Vaccine	Phase III	ABIVAX
	GS-4774	Therapeutic Vaccine	Phase II	Gilead Science
	INO-1800	Therapeutic Vaccine	Phase I	Inovio
	DV-601	Therapeutic Vaccine	Phase I	Dynvax Technologies Corporation
	NASVAC	Therapeutic Vaccine	Phase I	CIGB
	PD-1 and PD-L1 inhibitor	Restore adaptive immune response		

2.1 阻止乙肝病毒进入肝细胞

Myrcludex-B 是从乙肝病毒大包膜蛋白 preS1 结构域中衍生出的人工合成脂肽,它结合钠离子/牛磺胆酸共转运蛋白 NTCP 受体,封闭受体功能域,阻止乙肝病毒进入细胞,从而避免了病毒在细胞间的横向传播^[13]。环孢菌素 A 及其衍生物作为乙肝病毒的抑制剂也能够靶向 NTCP 受体,抑制乙肝病毒感染^[14]。CPI-431-32 和 SCYX1454139 是环孢菌素 A 衍生物^[15],在慢性乙型肝炎病人肝移植中获得极好疗效,甚至不用乙型肝炎免疫球蛋白(HBIG)处理^[16],HBsAg 血清转化率提高。

Rep2319,是一种核酸多聚物(nucleic polymer, NAP),研究表明 NAP 在体内外能抑制鸭乙肝病毒感染^[17]。作为新的广谱的抗病毒化合物,NAP 具有硫代磷酸寡核苷酸序列非依赖性,可封闭病毒吸附位点和表面蛋白装配^[18]。在 II 期临床研究中,Rep2319 已经表现出显著的抗病毒效果,12 个慢性乙型肝炎病人服用 Rep2319 药物 20-24 周后,有 8 个病人血清中检测不到乙肝病毒 RNA。然后这 8 个病人使用聚乙二醇干扰素和胸腺素 $\alpha 1$,其中四个有 HBsAg 清除和 HBsAb 血清转化^[19]。

2.2 靶向乙肝病毒逆转录

P 蛋白是乙肝病毒复制循环过程中一个多功能蛋白,具有聚合酶、RNA 酶、引发逆转录和包装等活性。临床上使用乙肝药物大部分是核苷类似物,而所有的核苷类似物都是靶向乙肝病毒 P 蛋白。乙肝病毒 P 蛋白分为 TP 区、S 区、RT 区和 RNase H 区,逆转录起始前 P 蛋白结合到 pgRNA 5' 端 ϵ 结构,在宿主伴侣分子作用下 TP 结构域末端开始合成 4 个碱基短核苷酸链作为引物,与 ϵ 侧向突出互

补配对,然后转位到 3' 端与 DR1 重复序列互补配对起始 DNA 合成。FDA 批准的抗乙肝病毒的核苷类似物有拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替比夫定和替诺福韦,它们分别是核苷酸 C、A、G、T、A 的类似物^[20]。在乙肝病毒 DNA 合成时它们冒充正常的核苷酸连接到 DNA 链,使得乙肝病毒 DNA 合成终止。另外在 HIV 和 HBV 共感染患者治疗时发现恩曲他滨不仅能抑制 HIV,对 HBV 也有显著的抑制效果。还有一些抑制乙肝病毒 P 蛋白与 ϵ 结合的药物如血红素等未进入临床。

由我们研究组^[21-23]发现的竞争性 RNA 适配子是一种 ϵ 突变体,具有更强的 P 蛋白亲和力,能有效干扰乙肝病毒 P 蛋白与 ϵ 结合从而阻断病毒反转录。该适配子在细胞水平具有良好的抗病毒效果。与 siRNA 相比,该适配子分子量大,稳定性高,毒性小,颇具成为抗乙肝病毒药物的潜能。

2.3 靶向乙肝病毒 cccDNA

近些年 cccDNA 相关药物的研究也取得了阶段性进展,主要靶点包括抑制 cccDNA 形成、转录和直接封闭或降解 cccDNA。

最近,Cai 等报道两种新的双取代磺胺类化合物 CCC-0975 和 CCC-0346 能够阻断 rcDNA 转变成 cccDNA 这一过程^[24],该类化合物有磷酸二酯酶活性和蛋白酶抑制剂活性,降低乙肝病毒脱蛋白的 rcDNA 和 cccDNA 的水平。这两种化合物是基于细胞高通量筛选鉴定出来的,其作用机制和靶点尚不清楚。

工程位点特异性突变的核酸酶包括锌指核酸酶 ZFNs、转录激活子样效应核酸酶 TALENs 和 CRISPR-Cas9 也应用于治疗人类病毒性疾

ZFNs 能够靶向病毒基因,例如聚合酶、核心蛋白和 X 蛋白的基因序列^[25],有效破坏靶基因。然而在慢性乙肝病人中靶向性蛋白的传递仍然是一个治疗上的挑战。TALENs 是最近发展起来的序列特异性核酸酶,靶向乙肝病毒特异位点并破坏目标序列。Bloom 报道设计的靶向 S 或 C 开放阅读框的 TALENs 能引起 35% cccDNA 分子突变^[26],靶向乙肝病毒 DNA 保守区域的 TALENs 能显著性降低病毒 HBeAg、HBsAg、HBcAg 和 pgRNA 的产生。在转染线性全长乙肝病毒 DNA 的 Huh7 细胞中引起核酸的误修复最终导致 cccDNA 水平下降^[27]。CRISPR-Cas9 系统是一种新型针对 DNA 目的序列的位点特异性剪切的基因组编辑工具,由 sgRNA 靶向 cccDNA 序列^[28]。Lin 等^[29]利用 CRISPR-Cas9 系统构建了多个靶向乙肝病毒基因组不同区域的 sgRNA,在细胞水平和动物水平均证明 sgRNA 能够显著性破坏乙肝病毒表达模板,并降低核心蛋白和表面蛋白的产生。

另有报道一些小分子化合物能够通过改变表观调控阻碍 cccDNA 转录成 pgRNA 从而中断乙肝病毒复制。这些小分子分别为 P300/CBP 相关因子组蛋白乙酰转移酶抑制剂、hSirt1 活化剂和 JMJD3 组蛋白脱甲基酶抑制剂^[30],它们通过控制 cccDNA 周围的组蛋白的乙酰化和甲基化,抑制乙肝病毒基因组复制。

2014 年在乙肝病毒领域最激动人心的成果是由 Lucifora 等人^[31]发现了 IFN- α 能诱导乙肝病毒 cccDNA 特异性降解,且无细胞毒性。淋巴毒素 β 受体 LT β R 也具有相似的功效,均能够在受感染细胞里面上调载脂蛋白 B mRNA 编辑酶催化性多肽 APOBEC3A 和 APOBEC3B 胞嘧啶脱氨酶的表达,由乙肝病毒核心蛋白介导转运到核内与 cccDNA 相互作用,形成 AP 位点,最终导致 cccDNA 的降解,不影响宿主的 DNA。

2.4 RNA 干扰和基因沉默

RNA 干扰是使用互补的双链 RNA 沉默转录后水平的同源性基因的 mRNA,在哺乳动物细胞中称为小分子干扰 RNA。在乙肝病毒感染的细胞中,序列特异性和剂量依赖性 siRNA 主要针对乙肝病毒的表面蛋白和聚合酶的 mRNA。siRNA 结合到互补乙肝病毒 mRNA 和 pgRNA 并将其降解,阻断翻译和转录^[32]。动物实验已经表明乙肝病毒 RNA 的长期抑制剂 ARC-520 和 DPC(dynamic polyconjugate)纳米粒子传递载体一起注射到黑猩猩体内

可以抑制 HBsAg、HBeAg 和乙肝病毒 DNA^[33],清除效率达到 100%。ARC-520 实现乙肝病毒感染的功能性治愈和在 RNA 干扰的机制下恢复适应性免疫系统。Iib 期临床试验表明,58 名乙肝患者接受治疗后均未出现过严重不良反应,HBeAg 和 HBsAg 分别下降 1.3log 和 1.2log,展现出良好的耐受性。

2.5 抑制乙肝病毒核衣壳装配

乙肝病毒核衣壳由核心蛋白组成,它的结构对乙肝病毒 DNA 和病毒粒子的合成很重要,通过核衣壳装配的有效抑制剂可以中断乙肝病毒复制。核衣壳装配抑制剂包括芳基丙烯酰胺类衍生物,例如 AT-61 和 AT-130,和杂芳基二氢嘧啶类化合物 HAP,例如 Bay 41-4109 和 GLS4。芳基丙烯酰胺类衍生物对拉米夫定抗性突变株有较好作用,能够诱导改变乙肝病毒核衣壳三级和四级结构。AT-130 通过结合到核心蛋白二聚体中间界面的疏水性口袋,中断核衣壳装配,从而扰乱病毒粒子的装配程序^[34,35]。

HAP 是核衣壳或核心颗粒装配的抑制剂,不影响核心蛋白表达和病毒转录。尽管如此,核心蛋白的表达仍会减少一部分,是由于它抑制了核衣壳装配和病毒复制。HAP 在体内和体外通过阻止衣壳化抑制乙肝病毒粒子产生^[36],Bay 41-4109 能够抑制核衣壳形成,同时使得核心蛋白的半衰期变短。这些药物通过扰乱病毒粒子的装配程序抑制病毒粒子产生,导致正常核衣壳的不稳定。NVR-1221 也是一种 HAP 药物,直接作用于乙肝病毒核心蛋白,目前正处于临床 Ia 试验阶段^[37]。

2.6 抑制病毒形态发生和释放

乙肝病毒高度糖基化对病毒装配很重要,特异性葡萄糖苷酶抑制剂能阻断病毒的装配过程。N-壬基脱氧野苳霉素 NN-DNJ 为一种亚胺糖,是 N-连接多糖内质网葡糖苷酶抑制剂,葡糖苷酶参与包膜蛋白上糖基的修饰过程,而糖基的修饰与包膜的正确折叠有关。抑制葡糖苷酶能够引起乙肝病毒包膜蛋白错误折叠,进而抑制病毒衣壳组装和释放。研究表明 NN-DNJ 对乙肝病毒感染的土拨鼠有抗病毒活性^[38]。N-壬基脱氧半乳霉素 NN-DGJ 也是一种葡萄糖苷酶抑制剂,在病毒装配之前表现抗病毒活性,阻断乙肝病毒 pgRNA 衣壳化。该药物有望用于土拨鼠肝炎病毒模型,但是药物毒性可能限制它的应用。Dyson 等^[39]使用分子方法筛选噬菌体开放文库,鉴定出肽寡核苷酸适配子,特异性干扰病毒

装配过程中核心颗粒和包膜蛋白的相互作用。

3 免疫系统的调节

乙肝病毒感染的持续性和它的 cccDNA 长期存在导致免疫反应不充分。有效控制病毒的感染需要协调先天性免疫和适应性免疫。乙肝病毒只诱导微弱的先天性免疫反应,可以逃逸免疫细胞识别。慢性乙型肝炎的病因与病毒特异性 T 细胞反应较弱或缺乏有关,因此增强抗乙肝病毒感染的先天性免疫和恢复 T 细胞抗病毒功能也是抗乙肝的有效手段。

3.1 靶向先天性免疫系统

3.1.1 TLR7 激活剂

先天性免疫反应通过免疫监视系统模式识别受体激活,如 TLR。当 TLR 受体活化时,干扰素通路、其它细胞因子和趋化因子被诱导生成,刺激自然杀伤细胞和细胞毒性 T 淋巴细胞,同时激活先天性免疫和适应性免疫^[40]。已发现 TLR-7 和很多其它受体在慢性乙肝病毒感染的病人体内活性受抑制,在感染后导致免疫功能紊乱^[41]。GS-9620 是一种选择性口服 TLR7 激活剂,在土拨鼠和黑猩猩短期试验中发现能降低肝脏和血清中 HBsAg 和病毒核酸。TLR7 激活后的免疫反应能够消除 HBsAg、HBeAg 和 HBcAg,抑制乙肝病毒复制。该药物具有药效高、容忍度高和副作用小等优点^[42]。GS-9620 和核苷类似物的联合用药能够有效治疗乙肝病毒感染^[43],最近 I b 期临床研究证明了 GS-9620 的安全性。

3.1.2 STING 激活剂

干扰素基因刺激物(stimulator of IFN genes, STING)是一个细胞内 DNA 感受器,被 GMP-AMP 合酶(cGAS)周期性激活^[44]。DMXAA 是一个 STING 激活剂,能在培养的鼠科肝细胞和乙肝病毒感染的鼠科动物模型中有效抑制乙肝病毒复制^[45]。和 TLR 激活剂相比较,DMXAA 具有更强抗乙肝病毒活性和较弱促炎症反应等特点,能够抑制乙肝病毒复制、病毒转录和促进 cccDNA 降解,这或许可以缓解 T 细胞枯竭,恢复乙肝病毒特异性 T 细胞反应活性。

3.2 靶向适应性免疫系统

3.2.1 治疗性疫苗

目前临床普遍使用重组 HBsAg 疫苗。病毒滴度过大会导致免疫反应不充分,在用治疗性疫苗处理之前通常使用核苷类似物做预处理。一旦病毒滴度下降,病毒粒子的抗原呈递激活 T 细胞反应。

GS-4774 是一个重组的、热原杀伤的酵母源疫苗,能够表达乙肝病毒表面抗原、核心抗原和 X 抗原^[46],具有高安全性和高容忍度。TG1050 是一种非复制型腺病毒血清型 5 源疫苗,编码缩短型乙肝病毒核心蛋白、聚合酶 Pol 和 2 个包膜蛋白结构域组成的融合蛋白^[47]。在持续性感染的小鼠模型中 TG1050 实现了乙肝病毒表面抗原血清转换。尽管治疗性疫苗在慢性乙型肝炎病人中是一引人注目的治疗手段,但仍存在诸多挑战,例如克服免疫枯竭。其它问题例如基因型和最好使用方式的差异性也需要解决。

3.2.2 PD-1 和 PD-L1 抑制剂

在慢性乙型肝炎患者当中,TCR 受体持续受高的病毒滴度和 HBsAg 刺激,导致乙肝病毒特异性 CD8+ T 细胞发生功能性紊乱,呈现枯竭状态,而且 T 细胞处于中间分化状态^[48],以致于不能控制乙肝病毒感染。在慢性感染过程中,随着病毒滴度和抗原量增加,共抑制受体在枯竭 T 细胞表面上的表达显著性上调,例如 PD-1、CTLA-4、CD244 和 Tim 等^[49,50]。研究表明阻止抑制受体相互作用可以恢复枯竭的 CD8+ T 细胞的功能,提高 T 细胞增殖、细胞毒性和细胞因子产生的能力,有效控制乙肝病毒感染^[51,52]。PD-1 是细胞程序性死亡受体 1,能和抗原呈递细胞表面配体 PD-L1 相互作用,在这些抑制受体中,PD-1 的抑制性更明显^[53]。PD-1/PD-L1 抑制剂能够阻止其相互作用,恢复枯竭的 CD8+ T 细胞控制乙肝病毒感染的能力^[54]。

4 小结与展望

以上所讨论新的药物作用靶点可以分为三类:(1)靶向病毒复制周期;(2)靶向宿主因子;(3)增强宿主先天性免疫应答和适应性免疫应答,针对各个靶点的新型抗乙肝病毒化合物尚处于临床前阶段。第三代抗乙肝新药核苷类似物尽管有很好疗效,但具有应答率低、需终身用药等缺点。干扰素与核苷类似物联合使用克服了单独用药的缺陷,却始终不能清除潜伏在肝内的 cccDNA。因此,直接靶向 cccDNA 能从根本上解决乙肝病毒持续感染的难题,但是临床前研究暴露出诸多挑战,例如序列靶向核酸酶和表观调控药物的有效传递性和脱靶效应^[24]。综合以上药物各方面的特点,联合治疗为实现治愈乙肝提供了可能性。

参考文献:

[1] Benhenda S, Cougot D, Buendia M A, Neuvut C.

- Hepatitis B virus X protein, molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis[J]. *Adv Cancer Res*, 2009, 103:75-109.
- [2] Kremsdorf D, Soussan P, Paterlini-Brechot P, Brechot C. Hepatitis B virus related hepatocellular carcinoma: Paradigms for viral-related human carcinogenesis [J]. *Oncogene*, 2009, 25(27): 3823-3833.
- [3] DALYs and HALE Collaborators. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990- 2013; a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. *Lancet*, 2015, 385(9963): 117-171.
- [4] Lee W M. Hepatitis B virus infection[J]. *N Engl J Med*, 1997, 337(24): 1733-1745.
- [5] Liang T J. Hepatitis B: the virus and disease[J]. *Hepatology*, 2009, 49(5Suppl): S13-21.
- [6] Wang H C, Wu H C, Chen C F, Fausto N, Lei H Y, Su I J. Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress [J]. *Am J Pathol*, 2003, 163(6):2441-2449.
- [7] Keeffe E B, Marcellin P. New and emerging treatment of chronic hepatitis B[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2007, 5(3): 285-294.
- [8] Palumbo E. New drugs for chronic hepatitis B[J]. *Am J Therapeut*, 2008, 15(2): 167-172.
- [9] Sarin S K, Kumar M, Lau G K, Abbas Z, Chan H L, Chen C J, Chen D S, Chen H L, Chen P J, Chien R N, Dokmeci A K, Gane E, Hou J L, Jafri W, Jia J, Kim J H, Lai C L, Lee H C, Lim S G, Liu C J, Locarnini S, Al Mahtab M, Mohamed R, Omata M, Park J, Piratvisuth T, Sharma B C, Sollano J, Wang F S, Wei L, Yuen M F, Zheng S S, Kao J H. APASL clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update[J]. *Hepatol Int*, 2016, 10(1):1-98.
- [10] van Zonneveld M, Flink H J, Verhey E, HBV 99-01 Study Group. The safety of pegylated interferon alpha-2b in the treatment of chronic hepatitis B: predictive factors for dose reduction and treatment discontinuation [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2005, 21(9): 1163-1171.
- [11] Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3[J]. *Nature*, 2001, 413(6857): 732-738.
- [12] Arch R H, Gedrich R W, Thompson C B. Translocation of TRAF proteins regulates apoptotic threshold of cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 272(3): 936-945.
- [13] Petersen J, Dandri M, Mier W, Lütgehetmann M, Volz T, von Weizsäcker F, Haberkorn U, Fischer L, Pollok J M, Erbes B, Seitz S, Urban S. Prevention of hepatitis B virus infection in vivo by entry inhibitors derived from the large envelope protein[J]. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(3): 335-341.
- [14] Watashi K, Sluder A, Daito T, Matsunaga S, Ryo A, Nagamori S, Iwamoto M, Nakajima S, Tsukuda S, Borroto-Esoda K, Sugiyama M, Tanaka Y, Kanai Y, Kusuhara H, Mizokami M, Wakita T. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP)[J]. *Hepatology*, 2014, 59(5):1726-1737.
- [15] Gallay P A, Bobardt M D, Chatterji U, Trepanier D J, Ure D, Ordonez C, Foster R. The Novel Cyclophilin Inhibitor CPI-431-32 Concurrently Blocks HCV and HIV-1 Infections via a Similar Mechanism of Action[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(8):e0134707.
- [16] Fung J, Chan S C, Cheung C, Yuen M F, Chok K S, Sharr W, Chan A C, Cheung T T, Seto W K, Fan S T, Lai C L, Lo C M. Oral Nucleoside/Nucleotide Analogs Without Hepatitis B Immune Globulin After Liver Transplantation for Hepatitis B[J]. *Am J Gastroenterol*, 2013, 108(6): 942-948.
- [17] Noordeen F, Vaillant A, Jilbert A R. Nucleic acid polymers prevent the establishment of duck hepatitis B virus infection in vivo[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11):5291-5298.
- [18] Bazinet M, Pantea V, Cebotarescu V, Cojuhari L, Jimbei P, Vaillant A. Significant reduction of HBsAg and HDV RNA by thenucleic acid polymer REP 2139 in Caucasian patients with chronic HBV/HDV co-infection[J]. *J Hepatol*, 2015, 62:S257-S258.
- [19] Jansen L, Vaillant A, Stelma F, Kootstra N A, Al-Mahtabet M. Serum HBV-RNA levels decline significantly in chronic hepatitis B patients dosed with the nucleic-acid polymer REP 2139-Ca[J]. *J Hepatol*. 2015, 62:S250.
- [20] Clark D N, Hu J. Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies[J]. *Future Virol*, 2015, 10(3): 283-295.
- [21] 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.
- [22] Feng H, Chen P, Zhao F, Nassal M, Hu K. Evidence for multiple distinct interactions between hepatitis B virus P protein and its cognate RNA encapsidation signal during initiation of reverse transcription[J/OL]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72798.
- [23] Feng H, Beck J, Nassal M, Hu K. A SELEX-screened aptamer of human hepatitis B virus RNA encapsidation signal suppresses viral replication[J/OL]. *PLoS One*, 2011, 6(11): e27862.
- [24] Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich C E, Saputelli J R, Mason W S, Xu X, Guo J T, Block T M, Cucconati A, Guo H. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56(8): 4277-4288.
- [25] Weber N D, Stone D, Sedlak R H, De Silva Feelixge H S, Roychoudhury P, Schiffer J T, Aubert M, Jerome K R. AAV mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97579.
- [26] Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activatorlike effector nucleases[J]. *Mol Ther*, 2013, 21(10): 1889-1897.
- [27] Chen J, Zhang W, Lin J, Wang F, Wu M, Chen C, Zheng Y, Peng X, Li J, Yuan Z. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases[J]. *Mol Ther*, 2014, 22(2): 303-311.
- [28] Makarova K S, Haft D H, Barrangou R, Brouns S J, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica F J, Wolf Y I, Yakunin A F, van der Oost J, Koonin E V. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2011, 9(6): 467-477.
- [29] Lin S R, Yang H C, Kuo Y T, Liu C J, Sung K C, Lin Y Y, Wang H Y, Wang C C, Shen Y C, Wu F Y, Kao J H, Chen D S, Chen P J. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo[J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2014, 3: e186.
- [30] Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. *PNAS*, 2009, 106(47): 19975-19979.
- [31] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl M F, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou W M, Thasler W E, Hüser N, Durantel D, Liang T J, Münk C, Heim M H, Browning J L, DeJardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA[J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1221-1228.
- [32] Giladi H, Rivkin L, Felig Y, Felig Y, Nussbaum O, Galun E. Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice[J]. *Mol Ther*, 2003, 8(5): 769-776.
- [33] Gish R G, Yuen M F, Chan H L, Given B D, Lai C L, Locarnini S A, Lau J Y, Wooddell C I, Schluep T, Lewis D L. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. [J]. *Antiviral Res*, 2015, 121: 97-108.
- [34] Katen S P, Chirapu S R, Finn M G, Zlotnick A. Trapping of hepatitis B virus capsid assembly intermediates by phenylpropanamide assembly accelerators[J]. *ACS Chem Biol*, 2010, 5(12): 1125-1136.
- [35] Katen S P, Tan Z, Chirapu S R, Zlotnick A. Assembly-directed antivirals differentially bind quasiequivalent pockets to modify hepatitis B virus capsid tertiary and quaternary structure[J]. *Structure*, 2013, 21(8): 1406-1416.
- [36] Stray S J, Bourne C R, Punna S, Lewis W G, Finn M G, Zlotnick A. A heteroaryldihydropyrimidine activates and can misdirect hepatitis B virus capsid assembly[J]. *PNAS*, 2005, 102(23): 8138-8143.
- [37] Stray S J, Zlotnick A. BAY 41-4109 has multiple effects on Hepatitis B virus capsid assembly[J]. *J Mol Recognit*, 2006, 19(6): 542-548.
- [38] Block T M, Lu X, Mehta A S, Blumberg B S, Tenant B, Ebling M, Korba B, Lansky D M, Jacob G S, Dwek R A. Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking[J]. *Nat Med*, 1998, 4(5): 610-614.
- [39] Böttcher B, Tsuji N, Takahashi H, Dyson M R, Zhao S, Crowther R A, Murray K. Peptides that block hepatitis B virus assembly: analysis by cryomicroscopy, mutagenesis and transfection[J]. *EMBO J*, 1998, 17(23): 6839-6845.
- [40] Sasai M, Yamamoto M. Pathogen recognition receptors: ligands and signaling pathways by toll-like receptors[J]. *Int Rev Immunol*, 2013, 32(2): 116-133.
- [41] Momeni M, Zainodini N, Bidaki R, Hassanshahi G,

- Daneshvar H, Khaleghinia M, Ebrahim M, Karimi-Googheri M, Askari A, Arababadi M K, Kennedy D. Decreased expression of toll like receptor signaling molecules in chronic HBV infected patients[J]. *Hum Immunol*, 2014, 75(1): 15-19.
- [42] Lopatin U, Wolfgang G, Tumas D, Frey CR, Ohmstede C, Hesselgesser J, Kearney B, Moorehead L, Subramanian G M, McHutchison J G. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of GS-9620, an oral Toll-like receptor 7 agonist [J]. *Antivir Ther*, 2013, 18(3): 409-418.
- [43] Lanford R E, Guerra B, Chavez D, Frey C R, Ohmstede C, Hesselgesser J, Kearney B, Moorehead L, Subramanian G M, McHutchison J G. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144 (7): 1508-1517.
- [44] Civril F, Deimling T, de Oliveira M C C, Ablasser A, Moldt M, Witte G, Hornung V, Hopfner K P. Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS [J]. *Nature* 2013, 498(7454): 332-337.
- [45] Guo F, Han Y, Zhao X, Wang J, Liu F, Xu C, Wei L, Jiang J D, Block T M, Guo J T, Chang J. Sting agonists induce an innate antiviral immune response against hepatitis B virus [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(2): 1273-1281.
- [46] Gaggar A, Coeshott C, Apelian D, Rodell T, Armstrong B R, Shen G, Subramanian G M, McHutchison J G. Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, a hepatitis Bvirus-specific therapeutic vaccine, in healthy subjects; a randomized study [J]. *Vaccine*, 2014, 32(39):4925-4931.
- [47] Martin P, Dubois C, Jacquier E, Dion S, Mancini-Bourguine M, Godon O, Kratzer R, Lelu-Santolaria K, Evlachev A, Meritet J F, Schlesinger Y, Villeval D, Strub J M, Van Dorsselaer A, Marchand J B, Geist M, Brandely R, Findeli A, Boukhebbza H, Menguy T, Silvestre N, Michel M L, Inchauspé G. TG1050, an immunotherapeutic to treat chronic hepatitis B, induces robust T cells and exerts an antiviral effect in HBV-persistent mice[J]. *Gut*, 2015, 64(12):1961-1971.
- [48] Legat A, Speiser D E, Pircher H, Zehn D, Fuentes Marraco S A. Inhibitory receptor expression depends more dominantly on differentiation and activation than “Exhaustion” of human CD8 T cells[J]. *Front Immunol*, 2013, 4:455.
- [49] Blackburn S D, Shin H, Haining W N, Zou T, Workman C J, Polley A, Betts M R, Freeman G J, Vignali D A, Wherry E J. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection[J]. *Nat Immunol*, 2009, 10(1): 29-37.
- [50] Protzer U, Maini M K, Knolle P A. Living in the liver; hepatic infections[J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12 (3): 201-213.
- [51] Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga M E, Kaminski M, Gostick E, Price D A, Freeman G J, Wherry E J, Chang K M. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade[J/OL]. *PLoS Pathog*. 2009, 5(2): e1000313.
- [52] Raziiorrouh B, Schraut W, Gerlach T, Nowack D, Grüner N H, Ulsenheimer A, Zachoval R, Wächtler M, Spannagl M, Haas J, Diepolder H M, Jung M C. The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function[J]. *Hepatology*, 2010, 52 (6): 1934-1947.
- [53] Bengsch B, Martin B, Thimme R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation[J]. *J Hepatol*, 2014, 61(6):1212-1219.
- [54] Boni C, Fisicaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection[J]. *J Virol*, 2007, 81 (8): 4215-4225.

Recent Advances in Hepatitis B Virus Antivirals

LIU Qiuming^{1,2}, YAO Chenguang¹, GUO Xiaohong², HU Kanghong^{1*}

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

2. Center of Applied Biotechnology, College of Life Science and Technology,

Wuhan Institute of Bioengineering, Wuhan 430068, China)

Abstract: The ultimate goal of chronic hepatitis B virus (HBV) therapy is full eradication of the virus from

the liver. However, this is rarely achieved with the clinically available first-line agents (entecavir and tenofovir disoproxil fumarate) due to the inability to eliminate covalently closed circular DNA (cccDNA), which persists in the nucleus of infected hepatocyte cells, and failure of the host to induce an adequate specific immune response to control the infection. Currently, the clinical treatment for chronic HBV infection mainly includes nucleos(t)ide analogues (NAs), non-NAs and immune modulatory agents; however, each agent has individual advantages and drawbacks. It is, therefore, extremely urgent to identify novel targets involved in viral replication and develop novel anti-HBV drugs. In light of the breakthroughs in cccDNA research and host immune treatments, this review aims to summarize the state of the recent HBV drug research and development to highlight future therapeutic strategies to target the virus and host immune response.

Key words: Hepatitis B virus; Anti-HBV drugs; cccDNA; Nucleos(t)ide analogues; Drug targets; Immune modulators

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