

·述评·

树立信心，奔向“消灭乙型肝炎”的未来

成军^{1,2}

2016年9月2日至9月4日在西安召开的第八届亚太肝病诊疗技术联盟(Asia-Pacific Alliance of Liver Disease, APALD)肝病学术年会开幕式上, APALD与其战略合作伙伴北京斯丹医疗、东方略的“阿波罗计划”共同提出了“消灭乙型肝炎”的口号,在业界引起了广泛的反响。全球约3.5亿人感染了乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV),中国HBsAg的携带率占普通人群的7.18%。虽然经过近25年来的不懈努力,在HBV水平和垂直传播进行了成功的阻断,但是存量HBV感染者的治疗仍然困难重重^[1]。在这种形势下提出“消灭乙型肝炎”的目标和口号,显示了HBV感染的基础与临床研究者的信心和决心,对HBV感染者来说,积极倡导抗病毒治疗,提高战胜慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)的信心,具有非凡的意义和价值。

纵观从Blumberg发现澳大利亚抗原即HBsAg以来的研究历程,特别是HBV感染诊断和治疗的演变,抗病毒治疗无疑是最为关键的治疗措施。控制了病毒,就控制了炎症,就会显著减少HBV感染带来的肝硬化(liver cirrhosis, LC)、肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)和肝功能衰竭,从而部分解决HBV所带来的严重临床后果。目前临床上所使用的干扰素(interferon, IFN- α)和聚乙二醇化干扰素(IFN),以及广泛使用的拉米夫定(lamivudine, LAM)、阿德福韦酯(adeфовir dipivoxil, ADV)、替比夫定(telbivudine, LdT)、恩替卡韦(entecavir, ETV)、替诺福韦酯(tenofovir disoproxil, TDF),部分国家和地区批准使用的克里夫定(clevudine, CVD)和恩曲他滨(emtricitabine,

ECT)都发挥了重要的病毒抑制作用。连同这些药物以及正在进行注册临床研究的替诺福韦艾拉酚胺富马酸(tenofovir alafenamide fumarate, TAF),从其临床疗效、机制、耐药、安全性和药物经济学指标进行考核,都属于第一代抗HBV治疗药物(见图1和表1)。第一代药物治疗的效果是抑制(suppression),因此,对于绝大部分患者来说,还无法根除HBV,甚至还不能阻断HBV mRNAs的转录和翻译,这一阶段仅可观察到HBV DNA复制的抑制。这一阶段的关键词是抑制,因此,对于绝大部分应用第一代药物的患者来说应该长期用药,不能轻言停药。由于长期抗病毒治疗过程中,除了各种药物的抗病毒效果存在差别,也有病毒变异和耐药的问题。当然各种药物的化学结构以及药物安全性特点不同,而且各种药物上市后销售和价格策略不同,因而药物经济学也有差异。通过对第一代抗HBV药物的综合评价,世界卫生组织(World Health Organization, WHO)、美国肝病研究学会(American Association for the Study of Liver Diseases, AASLD)、欧洲肝病研究学会(The European Association for the Study of the Liver, EASL)、亚太肝病研究学会(Asian-Pacific Association for the Study of the Liver, APASL)以及中国的CHB防治指南,都一致将ETV和TDF作为抗HBV治疗的一线药物推荐。但是现实中还不能轻言停药,必须在下一代抗病毒药物出现之前,坚持长期的抗病毒治疗,以求获得病情控制。

第一代抗HBV药物的依据有两个,一个是所谓的CHB自然史的长期研究,一个是NUCs抑制HBV DNA的短期效果。其实NUCs上市的根据和上市之初,并没有足够的证据表明NUCs长期使用一定会改善临床结局。既然CHB患者血清HBV DNA水平与长期的肝硬化和HCC的发展有关,而NUCs短期结果表明可以显著抑制HBV DNA复制,因此推断长期使用NUCs可以改善临床结局。后来的真实世界(real life)的临床研究也证实了这一点。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2016.05.001

基金项目:北京市医管局扬帆计划项目(肝炎专业)(No. ZYLX201402)、登峰计划项目(肝病专业)(No. DFL20151701)

作者单位:100015 北京,首都医科大学附属北京地坛医院¹;
100015 北京,北京亚太肝病诊疗技术联盟²

通讯作者:成军, Email: Chengj0817@sina.cn

表1 乙型肝炎病毒抗病毒治疗药物的分类

类别	代表性药物	作用机制	特点
第一代	IFN- α /Peg-IFN、NUCs	抑制 (suppression)	不能清除, 需要长期治疗, 停药后复发
第二代	RNA破坏制剂 (RNAi)、CRISP-CAS9	功能性治愈 (functional cure)	从RNA水平破坏病毒, 首次出现HBV DNA低于检测下限和HBsAg转阴
第三代	小分子药物? 免疫学药物?	治愈 (cure)	针对HBV cccDNA, 根除HBV

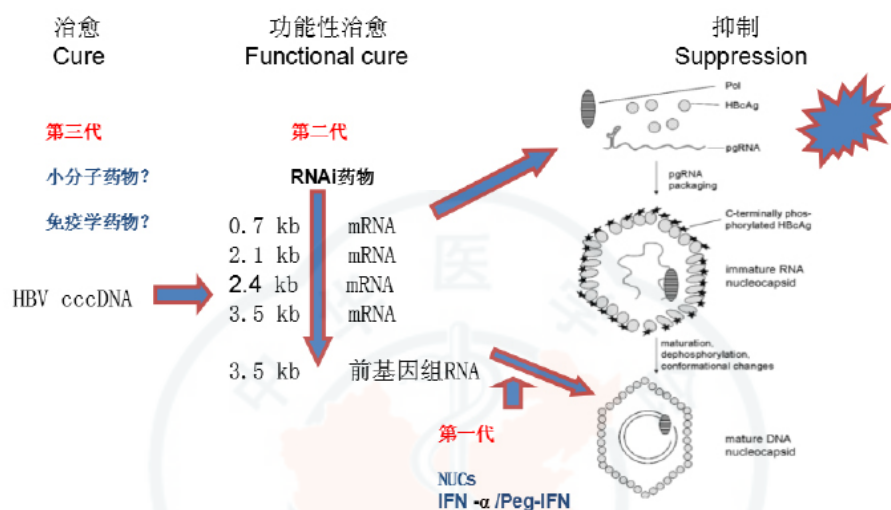


图1 HBV生活周期及NUCs作用环节

从图1可以看出, NUCs只是抑制了pgRNA逆转录为HBV DNA的第一条链, 因此用药后CHB患者血液中HBV DNA快速下降甚至低于检测下限, 但HBV cccDNA→RNAs→HBV蛋白的通路没有受到影响, 因此, 大部分NUCs经治患者HBsAg会一直阳性, 不能转阴。因为NUCs阻断了HBV复制的部分环节, 对疾病进展只是部分阻断, 也就是为什么部分CHB患者尽管NUCs抗病毒有效, 但仍然存在疾病进展、或由肝硬化发展为HCC的风险。因第一代药物只是抑制HBV的复制, 只能长期使用。HBV复制过程中存在遗传变异和药物筛选过程, 所以, 因机体对HBV免疫选择压力有所不同, 长期用药也会面对耐药的问题。最近学术上推算出HBV DNA半衰期可长达14.3年, 血清HBsAg的清除也需要52年之久。其实这是理论推算且不加干预条件下的计算结果。但是在积极干预下, 会有很显著的改变, 不能因为有这样的研究结果而丧失根除HBV的信心。HBV DNA具有整合到人基因组中的存在形式, 因此HBV感染也具有很复杂的机制和过程。这也为应用基因编辑技术寻求抗HBV新的治疗技术设置了很大障碍。从图1可以看出, 如果

应用NUCs抗HBV治疗, pgRNA的逆转录受到抑制或阻断后, 血清中的HBV DNA水平虽然下降了, 但HBV cccDNA转录成pgRNA仍然进行, 势必会形成HBV pgRNA的“堰塞湖”。因此, CHB患者在使用NUCs抗病毒治疗过程中, 血液中会存在核酸为RNA的“类病毒颗粒 (virus-like particle)”^[2]。因此, 在今后的临床抗病毒治疗研究中, 不仅要重视HBV DNA载量的检测, 而且还要更加重视HBV RNA的检测。如果含有RNA的HBV类病毒颗粒存在, 这类患者在停用NUCs后会很快恢复pgRNA逆转录为HBV DNA的过程, 从而出现复发。HBV RNA的定量检测技术已经成熟, 即将为临床抗病毒治疗的疗效判定和停药后复发的预测提供更多的客观条件。

应用于抗HBV的核苷(酸)类似物主要作用机制只是抑制3.5 kb的前基因组RNA (pgRNA) 逆转录为子代HBV DNA的第一条链, 作用的环节非常清楚, 就是干预了逆转录这一过程。这也就是为什么LAM、TDF、ECT和TAF等药物, 都是首先用于人免疫缺陷病毒 (human immunodeficiency virus, HIV) 这种逆转录病毒的抗病毒治疗, 继而

发现了其抗HBV的作用。因为HBV和HIV虽然分属DNA和RNA病毒,但在生活周期中都存在着逆转录的环节。同时,HBV cccDNA转录成pgRNA和mRNAs的过程不受抑制,因此,HBV各种病毒蛋白的翻译也不能阻断,这就是为什么HBV受到NUCs的抑制,大部分患者的HBV DNA水平降低甚至低于检测下限,而HBsAg却鲜有转阴者。近年来,随着RNAi和CRISPR/CAS9技术的进展,使我们在更为上游的环节考虑抗HBV的靶点和药物成为了可能。Arrowhead公司和Quak公司应用RNAi技术探索抗HBV的治疗药物进展迅速,特别是ARC-520和ARC-521的临床研究已经完成了III、II期注册临床,且已经取得了显著治疗作用(表2)^[3]。因为治疗的靶点更为上游,除了切割pgRNA,消除HBV DNA复制中逆转录的模板,还可以破坏mRNAs,病毒蛋白的翻译过程受到阻断。至此,在追求HBV DNA低于检测下限的同时,第一次可以谈HBsAg的下降甚至转阴的可能。也正因为首次出现了可以追求HBV DNA和HBsAg双转阴的药物,因此抗HBV药物的研发进入到了一个新的时代。这类药物暂且称之为第二代抗HBV药物,是我们追求HBsAg的转阴真正成为可能(见图1和表1)。这样的临床治疗结局,也称之为功能性治愈(functional cure)。在这一阶段,既能够实现HBV DNA低于检测下限和HBsAg转阴,又能使得HBV感染引起的炎症、纤维化、肝细胞癌的因素和机制得到了进一步的控制,第二代药物势必会显著优于第一代药物,肝硬化、肝细胞癌和肝功能衰竭的临床结局会进一步得到改善。

第二代药物的研发固然可追求HBV DNA和HBsAg的双转阴,肝硬化、肝细胞癌和肝功能衰竭的进展也会得到更好的控制,但这一阶段还没有完

全清除肝细胞核中的HBV cccDNA,这部分患者仍然会面对着一一定程度的HBV复燃和疾病的反复。因此,只有在HBV cccDNA这一层次上考虑具有针对性的治疗药物和治疗措施,才能迎来HBV从肝细胞中的清除,才能够谈CHB的治愈(cure),这样的药物就属于第三代(见图1和表1)。第三代抗HBV的药物如何去设计?最终清除肝细胞核中的HBV cccDNA究竟靠针对什么环节的药物或治疗措施?赢得最终清除肝细胞核中的HBV cccDNA胜利的药物究竟属于小分子化合物,还是免疫调节剂,或者是兼而有之进行联合治疗,目前还不十分清楚,但是已经有了很多的进展(见表2)^[4]。HBV cccDNA的基础研究进展十分有限,从目前有限的资料来看,对HBV cccDNA有影响的因素包括:IL-6对肝细胞核中HBV cccDNA的积累具有抑制作用;表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)可在诱导细胞增殖的同时促进肝细胞核中HBV cccDNA的合成。低氧因子-1(HO-1)可以阻断肝细胞核中HBV cccDNA的补充。肝细胞核因子1 α (hepatocyte nuclear factor 1 α , HNF1 α)是肝细胞核中HBV cccDNA合成所必需的因子。组蛋白的磷酸化修饰及其与HBV cccDNA的结合是HBV cccDNA代谢过程中的关键步骤。但是,HBV cccDNA动态平衡机制的研究进展缓慢,这是制约彻底清除肝细胞中HBV的重要因素。目前认为,HBxAg和HBcAg参与HBV cccDNA的结构形成(图2)^[5],其宿主结合蛋白的研究,特别是表观遗传学研究,具有重要前景。研究结果表明,HBV DNA、HBV病毒蛋白、HBV病毒蛋白结合蛋白的磷酸化、糖基化、豆蔻酯化及甲基化修饰,参与HBV cccDNA合成代谢调节,蕴藏着重要的治疗靶点,应该大力促进^[6]。因此,关于HBV cccDNA的

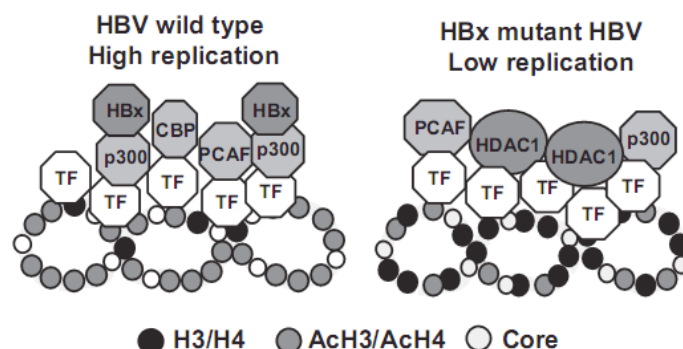


图2 HBV病毒结构蛋白是HBV cccDNA结构的重要组成部分

表 2 抗 HBV 新药研发的进展

类型	名称	机制	进展
NUCs	TAF (GS-7340)	HBV DNA逆转录酶抑制剂	III
	AGX-1009		II
	Besiforvir (LB-80380)		III
免疫调节剂	IFN λ	免疫调节抗病毒	II
病毒入胞抑制剂	TLRs激动剂 (如GS-9620)		III
	Myrcludex-B	针对NTCP受体的抑制剂	II a
	Cyclosporins		临床前
病毒核衣壳组装抑制剂	Oxysterols		临床前
	Bay41-4109, GLS-4	影响核衣壳结构的稳定性	I, I b
	AT-61, AT-130		临床前
	NZ-4		II
HBsAg释放抑制剂	NVR-1221, NVR-3-778	抑制HBsAg释放	I a, I b
	REP 9AC		II
RNAi	REP 2139-Ca		II
	ARC-520, ARC-521	破坏pgRNA和mRNAs阻断逆转录与病毒蛋白翻译	III, II
	ISIS-HBVRX		I
	ALN-HBV		临床前
HBV cccDNA降解与沉默	TKM-HBV		I
	NUC B1000	HBV基因组定点编辑技术	临床前
	CRISPR/CAS9技术: ZFNs, TALENs		临床前
	PD-1L阻断剂		II a
抑制性T淋巴细胞	Tamogens	免疫激活	III
治疗性疫苗	Transgene		I
	乙克	抑制HBV cccDNA合成	III
RcDNA向cccDNA转化抑制剂	CCC-0975		临床前
	CCC-0346	LT- β R激动剂	临床前
固有免疫调节剂	APOBEC3A诱导剂		临床前
适应性免疫调节剂	APOBEC3B诱导剂	治疗性疫苗	II
	GS-4774		I b
	DV601		I
	TG1050		

基础研究，将是一个非常重要的方向。

参 考 文 献

1 成军主编. 现代肝炎病毒分子生物学[M]. 3版. 北京: 科学出版社,2013.

2 Wang J, Xu ZW, Liu S, et al. Dual gRNAs guided CRISPR/ Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication[J]. World J Gastroenterol,2015,21(32):9554-9565.

3 Gish RG, Yuen MF, Chan HL, et al. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent[J]. Antiviral Res,2015,121:97-108.

4 Lin CL, Kao JH. Novel therapies for hepatitis B virus cure-Advances and perspectives[J]. Aliment Pharmacol Ther,2016,44(3):213-222.

5 Belloni L, Pollicino T, Nicola FD, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function[J]. PNAS,2009,106(47):19975-19979.

6 Song MA, Kwee SA, Tiirikainen M, et al. Comparison of genome-scale DNA methylation profiles in hepatocellular carcinoma by viral status[J]. Epigenetics,2016,11(6):464-474.

(收稿日期: 2016-09-17)

(本文编辑: 孙荣华)

成军. 树立信心, 奔向“消灭乙型肝炎”的未来[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志:电子版,2016,10(5):513-516.