

靶向HBV cccDNA生成和转录的小分子调控剂研究进展

徐祥瑞[#], 金昱[#], 徐淑静, 王硕, 何勇, 刘新泳^{*}, 展鹏^{*}

(山东大学药学院, 药物化学研究所, 山东 济南 250012)

摘要: 乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 对人类生命健康造成严重危害。虽然目前已有多种治疗乙肝的上市药物, 但由于共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA) 的持续存在, 导致出现停药后容易复发的问題, 这也是乙肝难以治愈的根源。本文对 cccDNA 生成、转录和复制的调控机制进行综述, 并从药物化学的视角对相关小分子调控剂的研究进展进行了总结。

关键词: 乙型肝炎病毒; 共价闭合环状DNA; 小分子化合物; 药物化学; 药物设计

中图分类号: R914 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)10-2979-16

Advances in research on small molecule regulators targeting HBV cccDNA generation and transcription

XU Xiang-rui[#], JIN Yu[#], XU Shu-jing, WANG Shuo, HE Yong, LIU Xin-yong^{*}, ZHAN Peng^{*}

(Department of Medicinal Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China)

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) represents a significant global public health challenge. Despite the availability of several approved drugs for hepatitis B treatment, the persistence of covalently closed circular DNA (cccDNA) renders HBV eradication elusive, thereby leading to disease relapse after drug withdrawal. This paper reviews the regulatory mechanisms of cccDNA formation, transcription and replication, and summarizes the research progress of related small molecule regulators from the perspective of medicinal chemistry.

Key words: hepatitis B virus; covalently closed circular DNA; small molecule; medicinal chemistry; drug design

乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 是一种具有包膜的逆转录双链 DNA 病毒, 主要通过血液、母婴、破损皮肤和无保护性行为等途径传播。世界卫生组织估计, 截止至 2019 年全球范围内约有 2.96 亿人患有慢性乙型肝炎 (chronic hepatitis B, CHB), 部分慢性乙型肝炎患者会逐渐发展为肝硬化、肝功能衰竭和肝癌等。乙型肝炎由于高感染率和它所造成的严重并发症, 目前已成为世界范围内严重的公共卫生问题^[1-3]。现有批准

上市的抗 HBV 药物主要是干扰素类药物和核苷 (酸) 类似物 (nucleos(t)ide analogues, NAs)^[4,5]。然而, 上述两种药物都无法完全清除患者体内的 HBV 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 从而导致无法完全治愈乙肝。因此, 基于新靶标、新机制的抗 HBV 药物的研发具有重要意义。

近期, 本课题组对 HBV 衣壳蛋白、HBV 核糖核酸酶 H、乙肝表面抗原等新靶标抑制剂的研究进展进行了综述^[6,7]。在此基础上, 本文着重综述了靶向 HBV 相关蛋白和宿主因子的 cccDNA 小分子调控剂, 同时围绕目前 HBV cccDNA 研究领域中所面临的问题进行讨论。

1 HBV 的生命周期

HBV 完整的生命周期包括吸附、侵入、脱壳、入核、cccDNA 的生成、转录、翻译、衣壳装配和分泌等,

收稿日期: 2023-02-01; 修回日期: 2023-04-17.

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82173677); 山东省杰出青年基金 (ZR2020JQ31).

[#]共同第一作者.

^{*}通讯作者 E-mail: zhanpeng1982@sdu.edu.cn; xinyongl@sdu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0094

其具体过程如下: ① HBV 进入体内后, 经由血液循环系统富集于肝脏, 随后其表面蛋白特异性识别并结合肝细胞表面牛磺胆酸共转运多肽 (sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP) 进而侵入肝细胞内^[8]。NTCP 是一种多重跨膜转运蛋白, 主要在肝脏中表达, 是 HBV 感染肝脏的一个重要靶点; ② 病毒在细胞质中脱去外壳, 其基因组以自由环状 DNA (relaxed-circular DNA, rcDNA) 的形式进入细胞核; ③ 随后 rcDNA 转化为 cccDNA, 并与宿主和病毒蛋白组装形成一个微染色体结构; ④ 在 RNA 聚合酶作用下, 进一步转录生成前基因组 RNA (pregenomic RNA, pgRNA) 和 3 种信使 RNA (messenger RNA, mRNA)^[9]; ⑤ 病毒 RNA 翻译为 HBV 蛋白; ⑥ 随后 pgRNA 和病毒聚合酶与 HBV 衣壳蛋白组装形成初级病毒衣壳; ⑦ pgRNA 在逆转录酶作用下逆转录生成 rcDNA; ⑧~⑨ 至此, 一部分含有 HBV 基因组的衣壳经过高尔基体和内质网的修饰, 再通过多泡小体 (multivesicular body, MVB) 的分泌途径以病毒粒子的形式释放至细胞外; ⑩ 另一部分成熟的衣壳裂解为乙肝核心抗原 (hepatitis B core antigen, HBcAg), 并将 rcDNA 转移至细胞核中继续扩增 cccDNA^[10] (图 1)。

2 HBV cccDNA

HBV 的基因组是一种部分双链环状 DNA, 也称为 rcDNA^[11], 其包括 4 个重叠的开放阅读框 (open reading frame, ORF), 分别为 preC/C、preS/S、P 和 X (图 2)。其中, C 区编码乙肝 e 抗原 (hepatitis B envelope antigen,

HBeAg) 和 HBcAg; S 区编码乙肝表面抗原 (hepatitis B surface antigen, HBsAg); P 区编码 HBV DNA 聚合酶; X 区编码 HBV X 蛋白 (HBV X protein, HBx)^[12]。

HBV rcDNA 在宿主细胞内可以形成 HBV cccDNA。cccDNA 是病毒复制和转录的模板, 它以微染色体形式长期稳定存在于肝细胞中, 是一个持久的病毒库^[13,14]。cccDNA 具体形成机制如下: ① 在宿主因子的作用下去除负链 5'端连接的末端蛋白; ② 去除正链 5'端的 RNA 残段; ③ 在聚合酶作用下, 完成 rcDNA 不完整的正链合成; ④ 依赖宿主细胞的 DNA 聚合酶补齐两条链上的缺口, 并进一步折叠、扭曲形成超螺旋结构的 cccDNA^[15]; ⑤ HBV cccDNA 与组蛋白 (H2A、H2B、H3、H4 和 H1) 和非组蛋白 (HBc、HBx 和宿主因子) 结合, 形成称为 HBV cccDNA 微染色体的染色质样结构^[16] (图 3)。

由于 cccDNA 在非分裂的人肝细胞中非常稳定, 且不易被清除, 因此它在持续性 HBV 感染和乙肝复发中发挥重要作用。有效抑制或清除高稳定性遗传物质 cccDNA 是完全治愈乙肝的关键^[17]。

近 10 年来, cccDNA 转录机制、表观遗传调控和免疫降解等方面的突破性进展使人们对 cccDNA 有了更加全面而深刻的认识^[18]。研究 cccDNA 生成和转录等相关机制, 并基于此设计出调控 cccDNA 的抗病毒药物对于实现乙肝的完全治愈具有重要意义。

3 直接靶向 HBV 相关蛋白的 cccDNA 调控剂

3.1 靶向 HBx 蛋白 HBx 蛋白是非结构蛋白, 属于 HBV 编码的一种小的调节蛋白, 分子质量约为 17 kD。

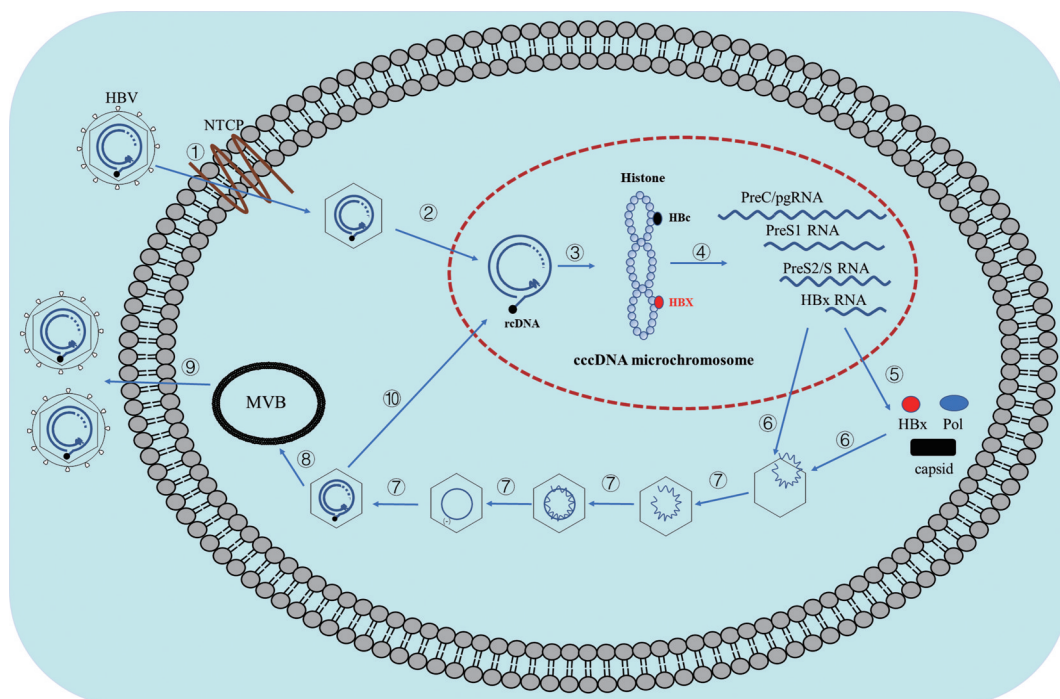


Figure 1 The life cycle of hepatitis B virus (HBV)

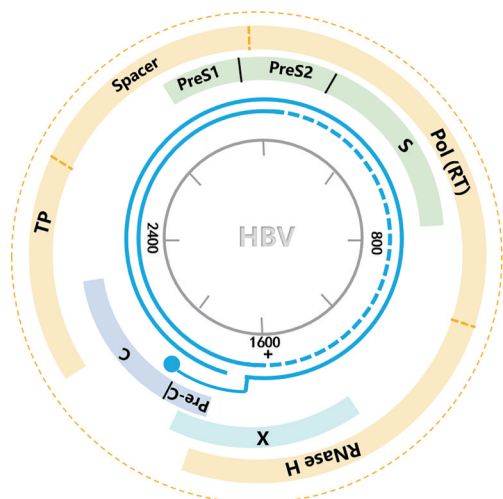


Figure 2 The structure of HBV genome

HBx 有 5 个重要的结构域: ① N 端的负调控区, 与该区域相结合的调控因子可以抑制 HBx 的活性; ② 负调控区附近的高变区; ③ 损伤 DNA 结合蛋白 1 (DNA damage-binding protein 1, DDB1) 结合区; ④ 核输出信号区; ⑤ C-末端的转录因子结合区^[19] (图 4)。

HBx 蛋白在细胞质和细胞核中均有分布, 并在 cccDNA 微染色体转录调控和肿瘤发生发展等方面发挥重要作用。HBx 蛋白可以与某些转录因子、染色质重塑因子相互作用, 并招募相关转录因子转移至 cccDNA 染色体上, 促进 cccDNA 转录。真核细胞内的染色体结构维持复合物 5/6 (structural maintenance of chromosomes 5/6, SMC5/6) 可以与链状 DNA 结合, 降低 DNA 的转录活性, 由于 cccDNA 与宿主双链 DNA 结构相似, SMC5/6 也能够抑制 cccDNA 的转录。HBx 可以通过与宿主因子 DDB1 相互作用, 泛素化降解 SMC5/6 复合物, 从而解除 SMC5/6 对 cccDNA 转录的抑制作用^[20,21]。此外, HBx 通过激活 RAS、C-MYC 等多种原癌基因的表达, 诱发细胞癌变, 并通过调节 JAK-STAT 等信号通路, 促进肿瘤细胞的增殖^[22,23]。鉴于 HBx 在 cccDNA 转录和肝癌发生发展中的重要作

用, 寻找 HBx 小分子抑制剂成为抗 HBV 药物研究的热点。

He 等^[24]构建出四环素诱导的表达 HiBiT-HBx 的细胞系 SBHX21, 筛选由 1 403 种上市药物组成的分子库, 发现苯甲酸雌二醇 (**1**, 图 5) 能够在 35、55、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下以剂量依赖性方式抑制 HBx 表达, 并且可以降低 HBV 感染的 HepG2 细胞中 cccDNA 的水平。通过 Autodock 程序对接发现, 苯甲酸雌二醇可以与 HBx 蛋白的 Trp87 的吡咯基团和 Trp107 的羰基分别形成氢键, 占据 HBx 与 DDB1 结合的位点, 从而阻止 HBx-DDB1 复合物的形成。

HBx 的 H-box 结构是与 DDB1 结合的位点。Ghosh 等^[25]使用 I-TASSER 网络服务器, 对 HBx 蛋白的 3D 结构进行建模, 并选取具有 H-box 结构的模型进行动力学模拟优化。通过 AutoDock Vina 软件虚拟筛选 Maybridge 库中的 14 400 种化合物, 发现 100 种具有高结合力 (结合自由能小于 $-8.8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) 的化合物。作者随后构建含绿色荧光蛋白的 HepG2 细胞模型, 该模型可以通过报告基因沉默的逆转显示荧光, 抑制 HBx 蛋白可以抑制报告基因沉默的逆转, 减弱荧光强度。基于该细胞模型, 作者对 100 种化合物进行筛选, 发现 IR415 (**2**, 图 5) 可以有效阻断 HBx 介导的绿色荧光蛋白表达。随后作者通过表面等离子体共振技术 (surface plasmon resonance, SPR) 发现 IR415 和 HBx 之间存在较强的相互作用 ($K_D = 2 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。表明 IR415 可以与 HBx 相互作用并干扰其功能。

Sekiba 等^[26]建立 NanoLuc 萤光素酶系统 (NanoLuc binary technology, NanoBiT), 用于评价 HBx 与 DDB1 的结合程度。作者分离 NanoBiT 亚基, 得到 LgBit 和 SmBit 两部分肽段, 并分别与 HBx 的 C 端和 DDB1 的 N 端结合, 构建出一种荧光高通量筛选体系。随后对 817 种上市药物进行活性筛选, 发现硝唑尼特 (**3**, 图 5) 可以剂量依赖性地干扰 HBx 与 DDB1 结合 (HepG2 细胞系, $EC_{50} < 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 并且可

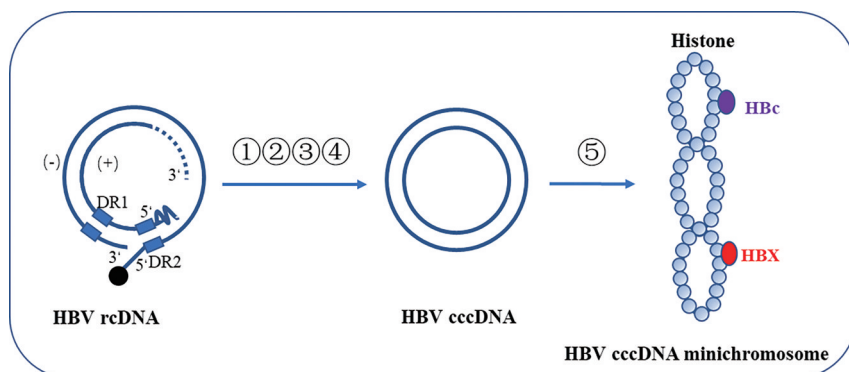


Figure 3 The process of HBV rcDNA transforming into HBV cccDNA microchromosome

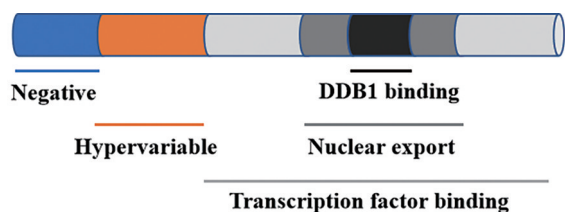


Figure 4 The structure and distribution of HBx protein

以抑制 HBx 蛋白诱导的 SMC5/6 降解, 从而抑制 HBV cccDNA 的转录。

Ma 等^[27]表达出 B 基因型和 D 基因型的 GST-HBx 融合蛋白, 随后使用表面等离子体共振成像技术 (surface plasmon resonance imaging, SPRi) 测定 1 018 种 FDA 药物与 GST-HBx 融合蛋白的结合能力, 发现曲尼司特 (4, 图 5) 对两种基因型的 HBx 蛋白均有很强的结合力 (B 基因型: $K_D = 0.184 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$; D 基因型: $K_D = 1.35 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。对其进行细胞水平抗病毒活性评价, 发现曲尼司特可以在 10、50、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下剂量依赖性降低 HBV 感染的人肝细胞中 cccDNA 水平。

Ren 等^[28]采用 MTT 法和 ELISA 法对 971 个天然化合物进行抗 HBV 活性筛选, 发现 sphondin (5, 图 5) 可以以剂量依赖性方式抑制 HBsAg 水平 (HepG2-NTCP 细胞系: $EC_{50} = 13.17 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; PHH 细胞系: $EC_{50} = 20.81 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 进一步实验发现, sphondin 可以通过抑制 HBx 活性进而抑制 HBV cccDNA 转录, 并在微摩尔范围内降低细胞内 HBV RNA 水平 ($EC_{50} = 6.68 \sim 22.48 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在人肝嵌合免疫缺陷的 uPA 小鼠模型中进行抗 HBV 活性评价, 发现 sphondin 可以在 2.5 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药剂量下显著降低小鼠体内 HBV RNA、HBsAg 和 HBx 水平, 并发现 sphondin 与恩替卡韦具有协同作用。对其进行机制探究, 发现 sphondin 可以与 HBx 结合, 促进 26S 蛋白酶体介导的 HBx 降解, 从而减少 HBx 与 cccDNA 的结合, 进而抑制 cccDNA 的转录。

3.2 靶向 DNA 聚合酶逆转录酶区 HBV DNA 聚合酶在 HBV 复制过程中发挥重要作用, 它是合成新的 DNA 链以及对 DNA 进行修复所必需的酶。在病毒复制过程中, DNA 聚合酶主要负责以 pgRNA 为模板逆转录合成双链 DNA。HBV DNA 聚合酶一共可以分为 4 个功能结构区, 包括末端蛋白区 (terminal protein, TP)、间隔区 (spacer, Sp)、逆转录酶区 (reverse transcriptase, RT) 和核糖核酸酶区 (ribonuclease H, RNase H) (图 6)^[29,30]。其中, RT 结构域是 DNA 聚合酶的主要功能区, 同时具有 DNA 聚合酶和逆转录酶的活性。目前, 临床用于治疗慢性 HBV 感染的 NAs 药物均是靶向 HBV 聚合酶 RT 结构域^[31], 通过抑制 HBV DNA 的合

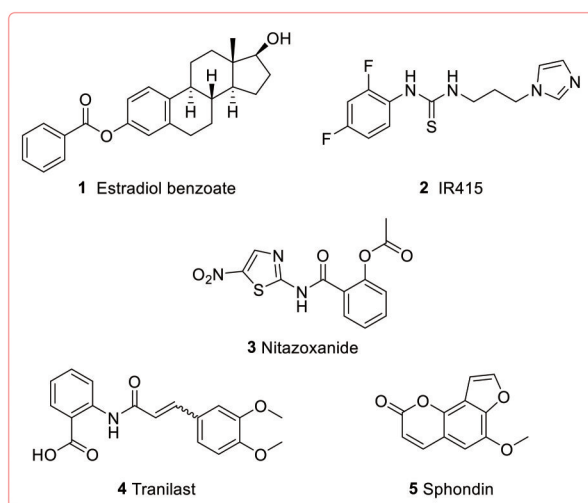


Figure 5 The chemical structures of compounds 1–5

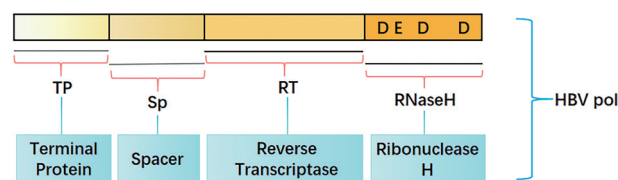


Figure 6 The structural pattern diagram of HBV polymerase

成, 进而阻断 HBV 的复制过程。靶向 DNA 聚合酶 RT 结构域的小分子调控剂依然是目前抗 HBV 药物研发的重要方向。

目前, NAs 是临床治疗慢性 HBV 感染的标准疗法, 包括拉米夫定 (lamivudine, 3TC, 6, 图 7)、替比夫定 (telbivudine, TBV, 7)、恩替卡韦 (entecavir, ETV, 8)、阿德福韦酯 (adefovir dipivoxil, ADF, 9) 和替诺福韦酯 (tenofovir disoproxil, TDF, 10)^[32,33]。NAs 类药物具有高效可口服, 且耐受性较好的优点, 但也具有疗程长、停药后复发率高且耐药性严重等缺陷, 严重限制了其应用。其中, 耐药性相关的主要突变与 HBV DNA 聚合酶 RT 结构域中的氨基酸取代有关, 逆转录酶缺乏校对机制, 因而其复制错误率较高, 因此以 RNA 为模板形成 DNA 的过程很容易发生突变。例如 3TC 的耐药突变为 M204I/M204V+L180M, 并且以 YVDD 变异株 (M204V) 最为严重^[34,35]。目前临床使用的 NAs 尚无法实现乙肝的功能性治愈和完全治愈, 原因在于上述药物都无法有效清除肝细胞中的 cccDNA^[36,37]。因此, 研发高效、安全的小分子药物对于清除 HBV cccDNA 进而完全治愈乙肝至关重要。

Autios Therapeutics 公司的科研人员通过前药修饰策略, 对第一代活性位点聚合酶抑制剂核苷酸 (ASPIN) 类药物克拉夫定 (clevudine, 化合物 11, 图 7) 进行结构优化, 最终得到了氨基磷酸酯前药 ATI-2173

(化合物 12), 该化合物可通过酶促和非酶促反应产生与克拉夫定相同的 5'-三磷酸酯。作为一种新型的靶向 HBV DNA 聚合酶的小分子调控剂, ATI-2173 可以有效降低肝内 cccDNA 水平, 并且在体外具有较强的抗 HBV 活性, 它在 HepG2.2.15 细胞系中所测得的 EC_{50} 值为 $0.26 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 在原代人肝细胞 (PHH) 中 EC_{50} 值为 $1.31 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 与克拉夫定具有相似的抗病毒活性 (克拉夫定: HepG2.2.15 细胞系: $EC_{50} = 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外, ATI-2173 的药代动力学性质和安全性明显优于克拉夫定, 它通过降低药物在全身的暴露水平, 消除了克拉夫定所引发的骨骼肌病等不良反应^[38,39]。ATI-2173 的临床 Ib 期试验在摩尔多瓦共和国和乌克兰进行, 属于一项随机、双盲、安慰剂对照试验 (NCT04248426)^[40]。

此外, 研究发现 ATI-2173 与富马酸替诺福韦二吡啶酯 (TDF) 联用可以有效抑制病毒复制并降低 HBV cccDNA 水平, 此外, IIa 期临床试验 (NCT04847440) 中

没有出现病毒反弹和患者 ALT 骤然升高的情况^[41]。

3.3 靶向 HBV 核糖核酸酶 H 结构域 HBV RNase H 对于病毒复制具有至关重要的作用。在 HBV 生命周期中, pgRNA 在逆转录酶的作用下产生负链 DNA 并形成 RNA: DNA 双链杂合体, RNase H 主要负责降解双链杂合体中的 RNA 部分, 从而形成单链负链 DNA 并以此作为模板合成正链 DNA, 最终形成 HBV rcDNA^[7]。研究发现, RNase H 水解 RNA 时需要两个 Mg^{2+} 的参与, 以及与之螯合的“DEDD”氨基酸残基^[42]。抑制 HBV RNase H 的功能可以阻止 RNA 的降解, 进而阻止正链 DNA 的合成, 最终抑制 HBV rcDNA 的合成及 cccDNA 的扩增。同时使用 NAs 及 RNase H 抑制剂来阻断酶的聚合与水解功能, 有望最大限度地抑制 HBV 的复制。此外, RNase H 抑制剂还能调控 HBV cccDNA 的水平^[43]。

HBV 与 HIV 均存在 RNase H 功能域, 其氨基酸序列有 23% 的同源性, 都具有两个金属离子和“DEDD”

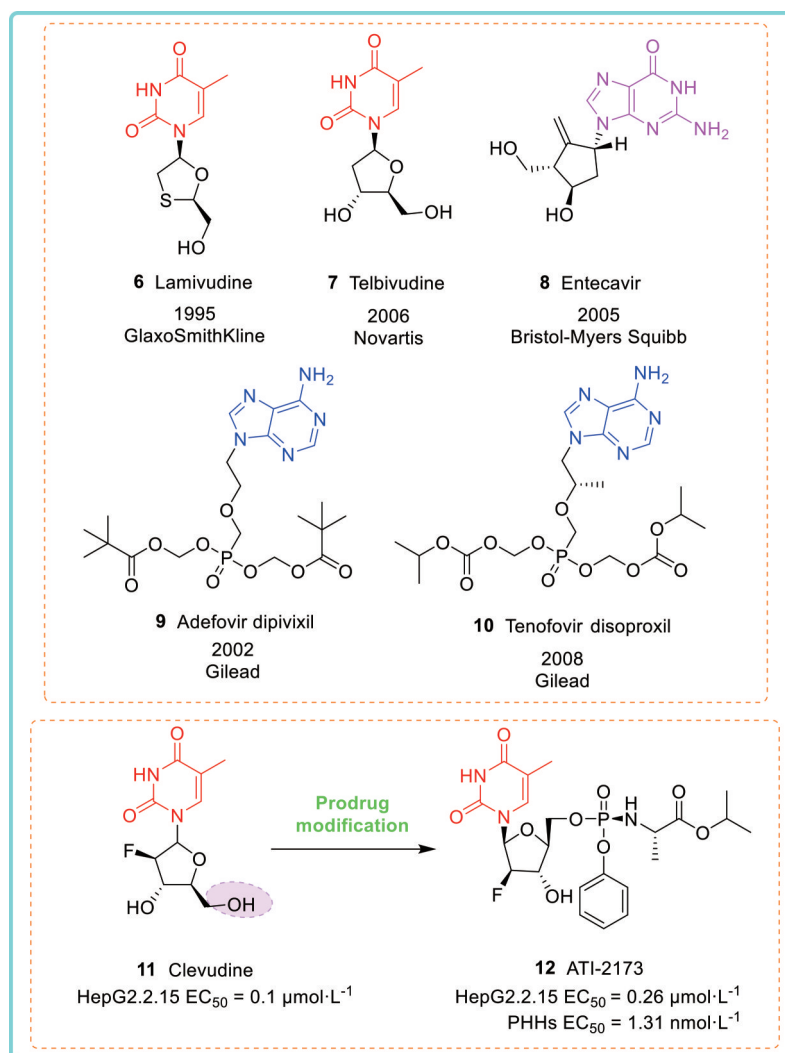


Figure 7 The chemical structures of compounds 6–12

催化基序^[42], 因此部分 HIV RNase H 抑制剂也有可能抑制 HBV RNase H 功能。但是由于 HBV RNase H 重组蛋白表达困难, 阻碍了该类抑制剂的高通量筛选。

2017年, Huber等^[44]发现具有抗 HBV 活性的 3-羟基嘧啶-2,4-二酮类 HBV RNase H 抑制剂。其中, 代表化合物 **13** 和 **14** (图 8) 可以有效抑制 HBV DNA 复制和 cccDNA 池的扩增, EC_{50} 值分别为 5.5 ± 0.6 和 $8.0 \pm 0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 且细胞毒性较低 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

Edwards等^[45-47]开发了一种 HBV RNase H 抑制剂筛选体系。他们发现的 100 多种 RNase H 抑制剂主要分为以下 3 种类型: α -羟基托酚酮 (α -HT)、*N*-羟基异喹啉 (HID) 和 *N*-羟基吡啶二酮 (HPD), 上述化合物均可以通过抑制 HBV RNase H 活性进而阻断细胞内病毒复制。为了进一步提高 RNase H 抑制剂的活性, 该课题组通过结构优化发现了 3 种 HID 类 HBV 抑制剂 ($EC_{50} = 2.4 \sim 3.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 9 种 HPD 类 HBV 抑制剂 ($EC_{50} = 0.11 \sim 4.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。其中, HPD 化合物 A23 (化合物 **15**) 最为突出 (HepDES19 细胞系: $EC_{50} = 0.11 \pm 0.01 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 33 \pm 8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。其次是 HPD 化合物 A22 (化合物 **16**) 和 A24 (化合物 **17**, 图 8), EC_{50} 值分别为 0.32 ± 0.2 和 $0.29 \pm 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步研究发现上述 3 种化合物均可以阻断正链 DNA 的合成, 进而阻止 cccDNA 池的扩增。

2021年, Chauhan等^[48]在 HBV 感染的 HepDES19 细胞中测试了 α -HT 化合物 110 (化合物 **18**, 图 8) 对于 cccDNA 的抑制作用。首先, 该课题组通过 Hirt 法提取分离染色体外 DNA, 随后用 T5 外切酶处理分离的 DNA 并用苯酚-氯仿提取, 最后通过荧光定量聚合酶

链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 测定 cccDNA 的含量。结果表明, 化合物 **18** 可以抑制 cccDNA 的积累 ($EC_{50} = 0.29 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外, 与对照组相比, 化合物 **18** 在 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对 cccDNA 的抑制率为 99%, 在 $0.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时的抑制率为 98%。但是, 它具有一定的细胞毒性 (HepG2-NTCP-12 细胞系: $CC_{50} = 42.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

3.4 靶向 HBV 核心蛋白 根据 HBV 基因型不同, HBV 核心蛋白 (HBV core protein, HBc) 由 183 至 185 个氨基酸组成, 通常以二聚体的形式存在, 90 或 120 个二聚体可以通过疏水作用形成 HBV 衣壳蛋白。HBc 不仅是一种结构蛋白, 而且在 HBV 生命周期中的多个关键环节发挥重要作用, 包括 rcDNA 的入核、cccDNA 染色体的形成以及病毒粒子组装和 DNA 复制等^[49]。由于 HBc 的多功能性, 逐渐成为研发抗 HBV 药物的重要靶标。

以 HBc 为靶标的小分子主要通过靶向衣壳组装过程发挥作用, 因此被称为 HBV 衣壳组装调控剂 (capsid assembly modulator, CAM) 或核心蛋白变构调节剂, 根据其作用机制的不同, CAM 可分为两类: CAM-I 类和 CAM-II 类。CAM-I 类可以干扰病毒衣壳的正常装配, 诱导核心蛋白错误组装成为非衣壳结构聚合物, 并且可以促进核心蛋白的降解; CAM-II 类可以加速衣壳组装, 并诱导核心蛋白组装形成不含有 pgRNA 和 DNA 聚合酶的空衣壳^[6]。由于衣壳组装调控剂可以破坏或干扰 HBV 衣壳组装的过程, 从而抑制 HBV 复制。因此, 衣壳组装调控剂是一种有前途的抗 HBV 药物。

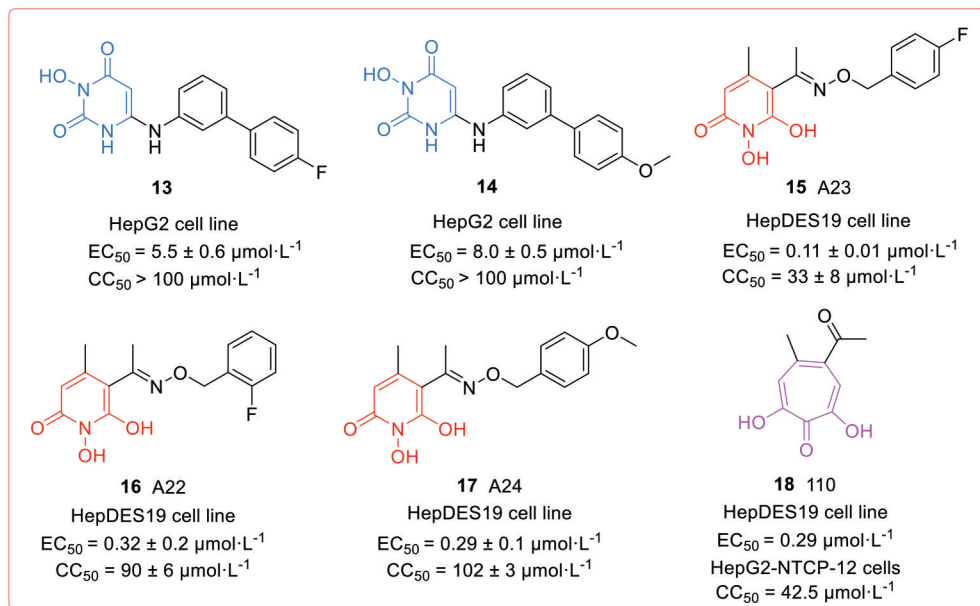


Figure 8 The chemical structures of compounds 13–18

根据化合物母核结构的不同,衣壳组装调控剂可分为丙烯酰胺类、磺酰苯甲酰胺类和二氢嘧啶类等,前期本课题组针对HBV组装调控剂也进行了部分总结^[6]。

2015年,Wang等^[50]报道一个吡嗪酮类新型HBV衣壳组装调控剂**19**(图9),在体内外均具有良好的抗病毒活性($EC_{50} = 1.90 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。通过研究其作用机制,发现化合物**19**通过干扰衣壳的组装,并诱导不包含基因组的空衣壳产生,发挥抑制HBV复制的作用。2020年,该课题组在前期研究的基础上,通过引入苯环和氰基封闭代谢位点,设计一系列吡嗪酮类衣壳抑制剂,其中化合物**20**具有更强的活性及更低的毒性($EC_{50} = 0.014 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),此外化合物**20**通过在侧链末端引入羟基,改善了该类化合物的口服生物利用度($F = 60.40\%$)。该课题组还在重组AAV-HBV病毒转导的小鼠模型上验证了化合物**20**的抗HBV作用,在50和150 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药剂量下均可以下调血浆中HBV DNA水平^[51]。

2020年,Na等^[52]研究NVR 3-778(**21**,图9)的共晶结果,分析其作用力,通过分子杂交的策略设计合成一系列磺酰苯甲酰胺类化合物,其中引入氨基得到的化合物**22**,表现出良好的抗HBV活性($EC_{50} = 0.04 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),优于先导化合物NVR 3-778($EC_{50} = 0.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在大鼠体内药代动力学实验中,**22**具有良好的口服生物利用度以及较长的半衰期(*p.o.*: $F = 80.19\%$, $T_{1/2} = 3.44 \text{ h}$)。化合物**22**的发现为磺酰苯甲酰胺类化合物的设计提供新的思路。

2020年,Wang等^[53]在磺酰苯甲酰胺类HBV衣壳组装调控剂的基础上,利用构象限制策略,设计并合成一系列吡啶并吡啶基磺酰胺类化合物,其中化合物**23**(图9)具有良好的抗HBV活性以及较低的细胞毒性(HepG2.2.15细胞系: $EC_{50} = 3.50 \pm 1.20 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HepG2细胞系: $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),体外机制研究表明,该系列化合物可以加速衣壳组装,形成不含有pgRNA的空衣壳。但是该化合物由于其刚性结构,导致溶解度差(水中溶解度低于检测限)。随后,该课题组针对化合物**23**进行修饰,通过引入氨基酸和成盐的方式合成前药**24**(图9),提升了化合物的溶解度($\text{pH} = 7$: $8.13 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),以及小鼠体内的生物利用度(*p.o.* $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: $F = 87.60\%$; *p.o.* $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$: $F = 132\%$)。

2021年,Amblard等^[54]在对磺酰苯甲酰胺类化合物进行结构修饰时,发现一个具有吡咯草酰胺骨架的衣壳组装调控剂GLP-26(**25**,图9),表现出较强的抗病毒活性(HepAD38细胞系: $EC_{50} = 3.0 \pm 2.0 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HepG2细胞系: $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。抗HBV作用机

制研究发现GLP-26可以通过诱导衣壳蛋白组装成小而畸形的颗粒,影响衣壳组装,从而下调HBeAg水平。

2021年, Kim等^[55]通过衣壳组装测定法对其In-house化合物库进行筛选,得到一个有潜在抑制活性的化合物**26**($EC_{50} > 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,图9)。在保留嘧啶母环的基础上,对其多个位点进行修饰,得到32个化合物,其中化合物**27**的活性显著提高($EC_{50} = 0.18 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),但是存在一定的细胞毒性($CC_{50} = 19.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在小鼠体内联合使用**27**与TDF,可以加速血清中HBV DNA的清除。机制实验表明,**27**可以通过抑制HBV衣壳组装来抑制含有HBV DNA颗粒的分泌。

2021年,Yamasaki等^[56]为了寻找全新结构的HBV抑制剂,使用HBV103-AdV系统筛选了一个含有37 603种小分子的化合物库,得到苯乙酮4-硝基苯胺类HBV抑制剂**28**(ANPH,图10),其 EC_{50} 值为 $0.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (HepG2.2.15细胞系)。机制研究表明,ANPH是一类促进衣壳快速组装的CAM,可以诱导HBV空衣壳的形成。但是由于ANPH溶解度差,且在体内产生毒性代谢产物,影响了其进一步研发。

2022年,Li等^[57]在对磺酰胺类衣壳组装调控剂研究的基础上,通过官能团替换、骨架跃迁等策略,设计合成一系列稠合杂环酰胺类化合物,其中哌嗪并咪唑化合物SHR5133(**29**,图10)表现出很强的抑制HBV DNA复制的活性(HepG2.2.15细胞系: $EC_{50} = 0.026 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)及较低的细胞毒性(HepG2细胞系: $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2022年,Liu等^[58]以NVR 3-778和BA-38017(**30**,图10)为先导化合物,采用药效团融合策略设计并合成了一系列二氢苯并二噁英类化合物,其中化合物**31**表现出良好的抗病毒活性和中等的细胞毒性($EC_{50} = 0.50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 48.16 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),活性优于先导化合物BA-38017($EC_{50} = 1.94 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),值得进一步研究。

2022年,Yang等^[59]通过细胞水平的抗病毒活性测试,发现*N*-磺酰基哌啶-3-甲酰胺类化合物**32**(图10)可以有效抑制HBV DNA的复制($EC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),并且在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下抑制HBV衣壳的形成,但是其毒性较强($CC_{50} = 14.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。经进一步结构修饰得到化合物**33**和**34**,具有更好的抗病毒活性以及较低的细胞毒性(**33**: HepAD38细胞系: $EC_{50} = 0.056 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; **34**: HepAD38细胞系: $EC_{50} = 0.11 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} = 85.27 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。此外,化合物**34**对A~D型HBV表现出良好的广谱抗病毒活性($EC_{50} = 0.12 \sim 0.24 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。机制研究表明,该系列化合物属于CAM-II类化合物,可以通过加速衣壳组

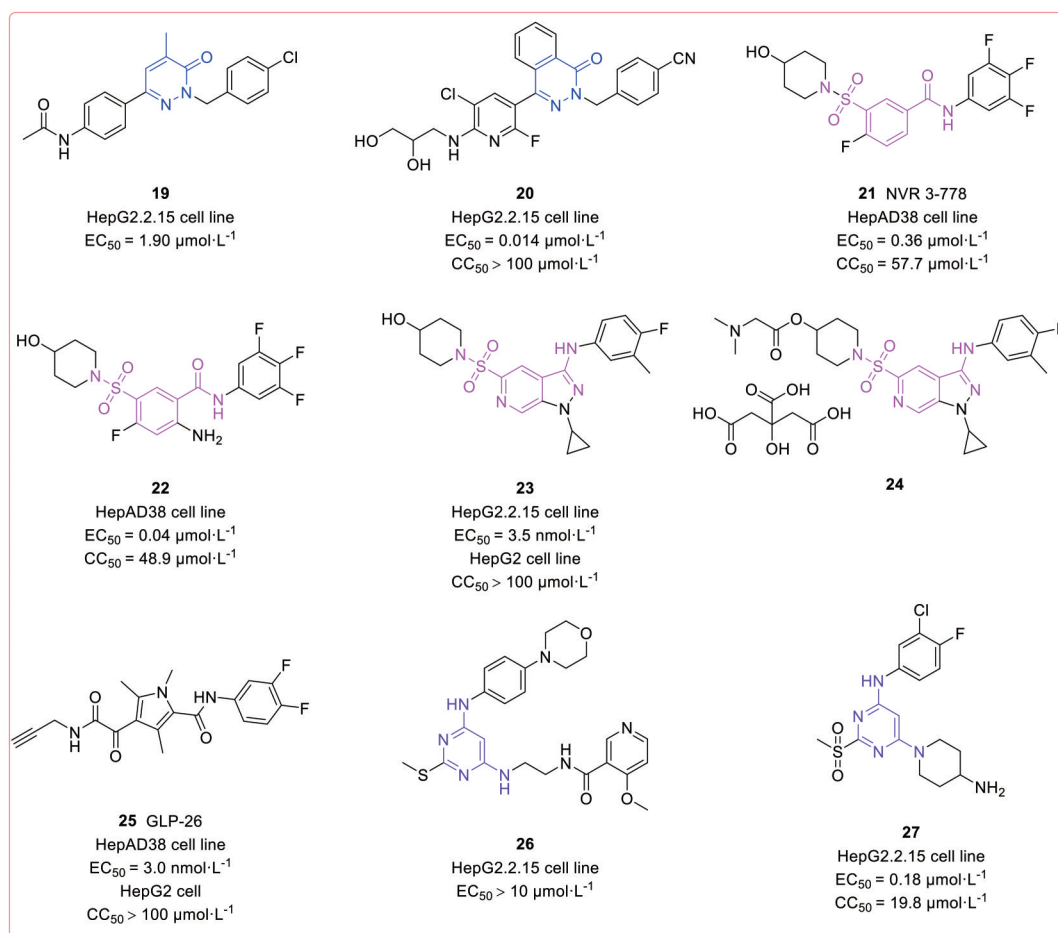


Figure 9 The chemical structures of compounds 19–27

装, 形成不含有 pgRNA 的空衣壳^[60]。

GLS4 (**35**, 图 10) 具有较强的 HBV 抑制活性 ($EC_{50} = 0.012 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 但是其水溶性和药代动力学性质较差, 临床试验中将其以甲磺酸盐的形式使用^[61]。2021 年, 本课题组为了改善 GLS4 的成药性, 以 GLS4 为先导化合物, 使用骨架跃迁的策略, 通过在溶剂开口区引入螺环片段, 设计一系列二氢嘧啶类螺环系列化合物。其中发现化合物 **36** (图 10) 在 HepDES19 细胞系中表现出良好的抗 HBV 活性以及较低的细胞毒性 ($EC_{50} = 0.20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, $CC_{50} > 87.03 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 表明 GLS4 在溶剂开口区具有一定的改造空间^[62]。2022 年, 本课题组以 NVR 3-778 为先导化合物, 采用基于结构的修饰策略, 通过引入硼酸基团, 得到一个与 NVR 3-778 活性相当的化合物 **37** (HepDES19 细胞系: NVR 3-778: $EC_{50} = 0.73 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 化合物 **37**: $EC_{50} = 0.83 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 其水溶性与 NVR 3-778 相比有显著提升: (pH = 7: NVR 3-778: $35.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 化合物 **37**: $328.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。机制研究表明, 化合物 **37** 与 NVR 3-778 类似, 通过加速衣壳组装, 导致空衣壳的产生, 从而抑制 HBV 复制^[63]。

已有研究表明, 大多数衣壳组装调控剂可以有效降低 HBV DNA 的水平, 但是对 HBeAg 和 HBsAg 影响不大。有实验报道, 在衣壳组装调控剂与 NAs 联用时, 多数治疗方案显示出优于单独使用 NAs 的效果, 这表明衣壳组装调控剂与 NAs 联合使用有利于加快下体内 HBV DNA 水平^[55]。

3.5 其他类型的 cccDNA 小分子调控剂 目前, 除了上述几种靶向 HBV 相关蛋白的 cccDNA 调控剂, 还存在一些其他类型的 cccDNA 小分子调控剂。这些调控剂也是 cccDNA 研究领域的热点, 同时它们为抗 HBV 药物的研发提供了新的方向。

2012 年, Cai 等^[64]通过使用新型 cccDNA 检测方法, 将 HBeAg 作为 cccDNA 的替代性标志物, 筛选了一个由 85 000 种化合物组成的 in-house 化合物库, 最终发现了两种二取代磺酰胺类化合物, 分别命名为 CCC-0975 (化合物 **38**, 图 11) 和 CCC-0346 (化合物 **39**), 它们均可以显著降低细胞中 HBV cccDNA 的水平, EC_{50} 值分别为 10 和 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。机制研究表明, 这两种化合物不是直接抑制 rcDNA 的产生, 而是通过抑制

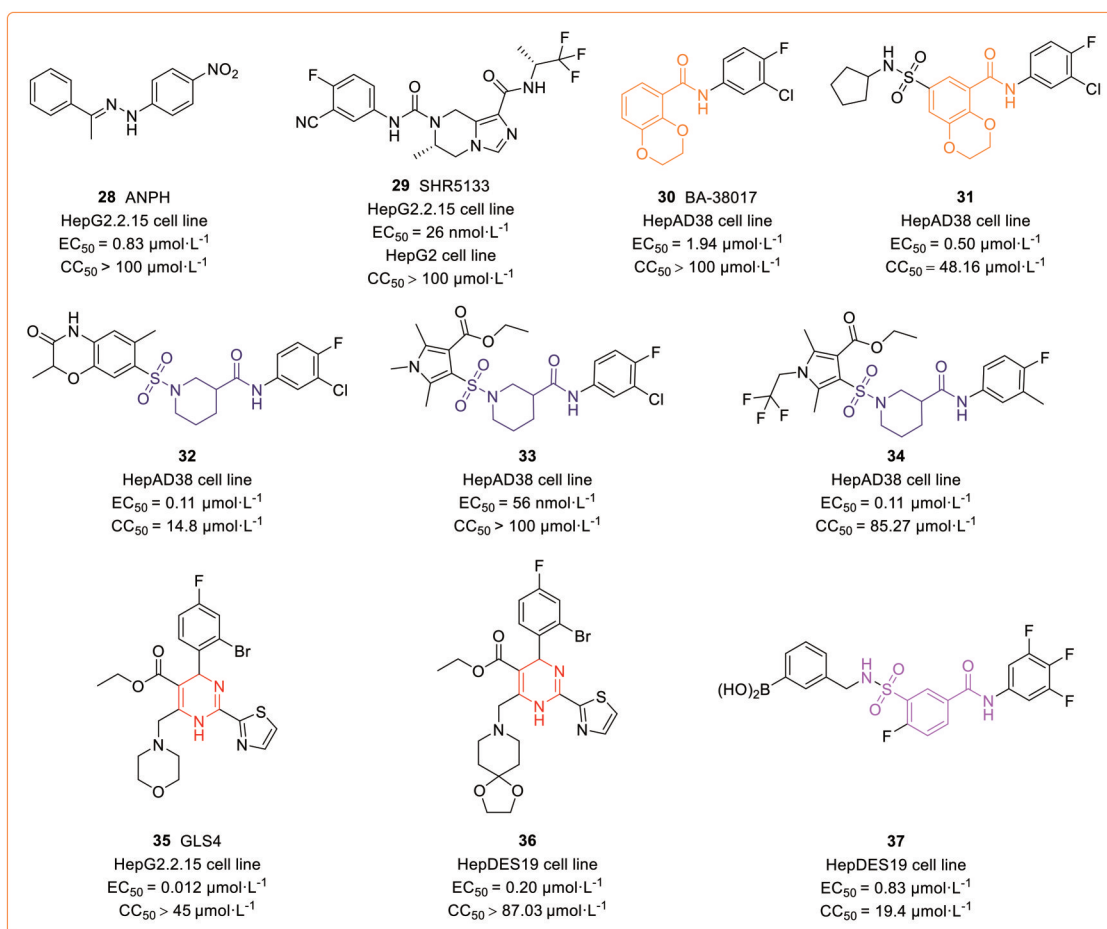


Figure 10 The chemical structures of compounds 28–37

rcDNA 去蛋白化, 进而抑制 rcDNA 形成 cccDNA, 最终降低细胞中 cccDNA 的水平。然而, 鉴于 cccDNA 形成和代谢过程中的许多细节尚不清楚, 该类化合物的确切作用靶点尚未阐明。此外, 细胞生长实验表明 CCC-0975 的细胞毒性较低 ($CC_{50} > 50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 而 CCC-0346 的细胞毒性较强 ($CC_{50} = 2.57 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2022年, Wang等^[65]利用感染HBV的PHHs细胞系对846000个小分子化合物进行高通量筛选, 得到4107个苗头化合物, 随后科研人员依次评估了这些化合物对cccDNA水平的影响, 最终得到一种cccDNA降解剂ccc_R08(化合物40, 图11)。研究表明, ccc_R08对细胞外HBsAg和HBeAg、细胞内外病毒DNA和细胞外RNA均具有一定的抑制作用($EC_{50} = 0.2\sim 5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 同时它能够以剂量依赖性方式显著降低细胞中cccDNA水平, 而对线粒体DNA没有明显影响, 且ccc_R08在PHHs及多个增殖细胞系中无严重的细胞毒性。此外, Chen等^[66]通过高通量筛选发现氧杂蒽酮类HBV抑制剂, 对该母核的结构修饰得到一个具有较好活性及溶解性的化合物41(HepDes19细胞系: $EC_{50} = 0.58 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 冻干溶解度 (lyophilization

solubility assay, LYSA) $> 425 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。细胞水平抗HBV活性结果表明, 化合物41可以在 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下有效降低cccDNA水平。在HBV circle小鼠模型中, 化合物41在 $300 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药浓度下可以显著下调血清中HBsAg、HBeAg以及肝内cccDNA的水平。

2016年, Liu等^[67]通过筛选来自中草药的化合物库, 发现了3种单宁能够抑制HBeAg的产生, 分别为安石榴甙(punicalagin, 化合物42, 图11)、安石榴磷(punicalin, 化合物43)和老鹳草素(geraniin, 化合物44)。这3种化合物均以剂量依赖性方式显著下调HBeAg和cccDNA水平, 然而, 病毒DNA的复制水平并没有发生显著改变。随后, 该课题组通过细胞水平cccDNA的积累和稳定性试验, 发现这3种化合物不仅可以抑制cccDNA的产生, 还可以促进已存在cccDNA的降解。综上所述, 3种单宁通过防止cccDNA形成和促进cccDNA降解的双重机制来下调cccDNA的水平。

4 靶向宿主相关因子的cccDNA调控剂

4.1 靶向cccDNA生成的宿主相关因子

由于仅依靠病毒自身无法表达其生命周期所需的所有蛋白, 在HBV cccDNA形成过程中需要多种宿主因子的参与, 比如:

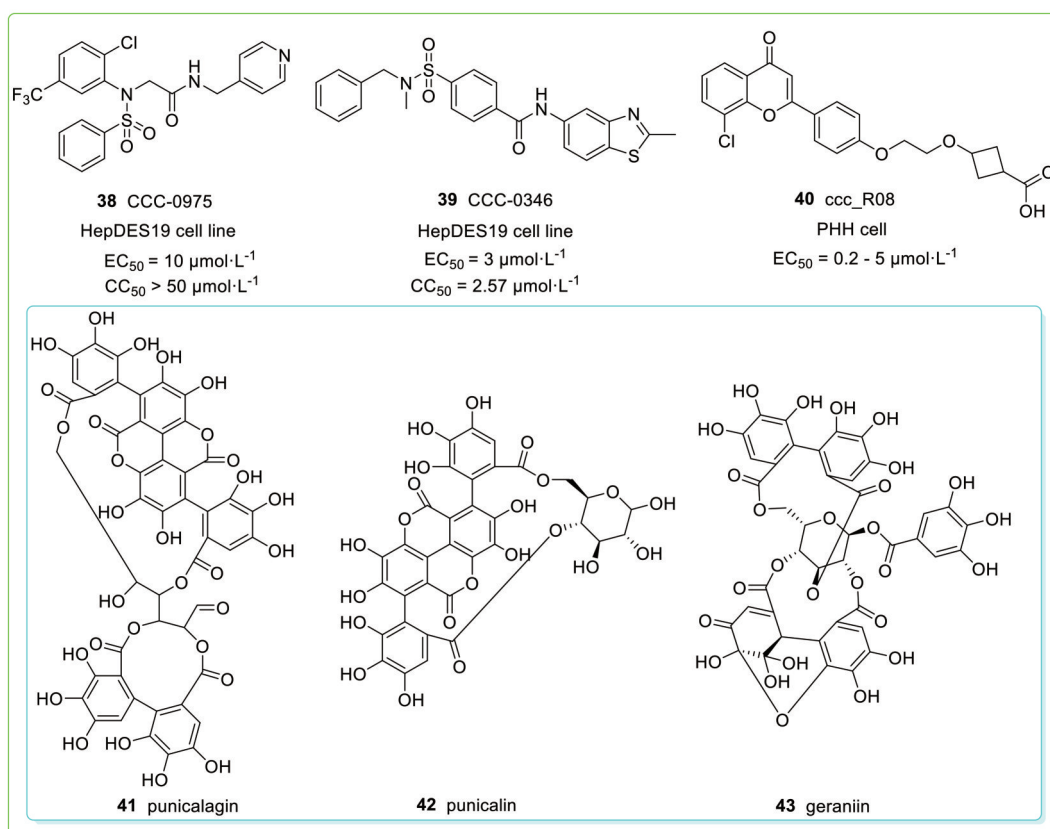


Figure 11 The chemical structures of compounds 38–43

DNA 聚合酶 K (DNA polymerase K, POLK)、DNA 聚合酶 L (POLL)、DNA 聚合酶 H (POLH) 和 DNA 连接酶 (DNA ligase, LIG) 1/3 等^[68]。因此, 抑制相关宿主因子理论上可以阻止 rcDNA 生成 cccDNA。

宿主因子——瓣状核酸内切酶 1 (flapendonuclease 1, FEN1) 是一种金属核酸酶, 主要参与 DNA 复制过程中冈崎片段的成熟和 5'瓣状 (5'-flap) 的切除。2019 年, Kitamura 等^[69]发现 FEN1 可以促进 HBV DNA 复制, 具体机制可能是作用于 HBV rcDNA 到 cccDNA 的结构修复及转化阶段。在形成 cccDNA 过程中, FEN1 发挥间隔依赖核酸内切酶活性, 将 HBV rcDNA 结构中两端各约 9 nt 的冗余序列所形成的发夹结构 (即假“Y”结构) 进行剪切修复, 并在聚合酶和连接酶作用下形成完整的闭合环状结构, 最终形成 cccDNA。2022 年, 北京英飞智药科技有限公司报道了一类环状 *N*-羟基酰亚胺类 FEN1 抑制剂。其中, 化合物 **44** (图 12) 的 FEN1 抑制活性较强, IC_{50} 值为 $0.087 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。同时, 它能够在细胞水平抑制 HBeAg、HBsAg 和 HBV 总 DNA 的产生, EC_{50} 值分别为 37.89 、 38.77 和 $21.08 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 化合物 **44** 还能显著抑制 cccDNA 的形成且细胞毒性较小 ($CC_{50} > 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[70]。总之, 此类环状 *N*-羟基酰亚胺类化合物值得进一步研究。

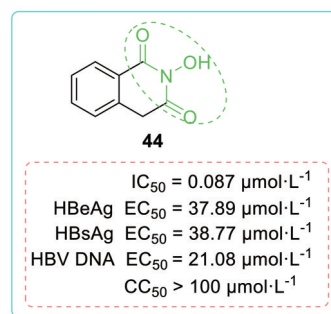


Figure 12 The chemical structure of compound 44

2016 年, Qi 等^[71]通过靶向遗传筛选 (targeted genetic screening) 来探索与 HBV cccDNA 形成相关的 DNA 聚合酶 (POL), 结果表明 POLK、POLL 和 POLH 在 HBV 感染肝细胞过程中均可促进 cccDNA 的生成, 虽然具体作用机制尚未完全明确, 但发现 POLK 在促进 cccDNA 生成过程中发挥着更为关键的作用。

2017 年, Long 等^[72]筛选了 107 个细胞 DNA 修复基因, 并发现 LIG1/3 在 cccDNA 形成过程中发挥着关键作用。该课题组通过机制实验验证 DNA 连接酶抑制剂或 LIG1/3 的功能性敲除都将显著减少 cccDNA 的产生。此外, 该课题组发现 LIG4 在双链线性 DNA (double stranded linear DNA, dsL DNA) 形成 cccDNA 过程中发

挥至关重要的作用。

综上所述, 目前报道的研究成果揭示了 HBV 利用 FEN1、宿主 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶来促进 cccDNA 形成的相关途径, 为新型抗 HBV 药物的研究提供了信息。

4.2 靶向 cccDNA 转录的宿主相关因子 HBV cccDNA 的转录水平受微染色体表观修饰影响, 并且与宿主转录因子密切相关。cccDNA 上结合着许多组蛋白和非组蛋白成分, 通过对组蛋白进行乙酰化修饰和甲基化修饰都可能会激活或抑制 cccDNA 的转录 (图 13)。组蛋白 H3 和 H4 的甲基化或去乙酰化可以抑制 HBV 的复制, 相反, cccDNA 结合乙酰化的组蛋白 H4 可以维持 HBV 的复制^[73,74]。但目前缺乏相关药物在 HBV 动物模型上的研究。

HBV 基因组上的转录调节元件包括 4 个启动子和 2 个增强子: preC 启动子起始 3.5 kb 的 pgRNA 转录; preS1 启动子起始 2.4 kb 的 preS1 RNA 转录; preS2/S 启动子起始 2.1 kb 的 preS2/S RNA 的转录; X 启动子起始 0.7 kb 的 HBx RNA 的转录; 增强子 I (enhancer I, Enh I) 位于 X 启动子上游, 调控 X 启动子活性; 增强子 II (EnhII) 位于 preC 启动子上游部分, 调节 preS1 和 core 启动子的活性。在 cccDNA 的转录过程中需要多种宿主转录因子的参与, 通过转录因子与启动子或增强子的结合可以调控转录的发生 (图 13)^[75,76]。因此, 可以通过调控宿主转录因子活性抑制 cccDNA 的转录, 从而抑制 HBV 的复制。

维甲酸 X 受体 (retinoid X receptor, RXR) 通常以异源二聚体的形式结合在 DNA 的增强子 EnhI 和 EnhII 上。该类复合物被证明可增强 HepG2-NTCP 细胞和其

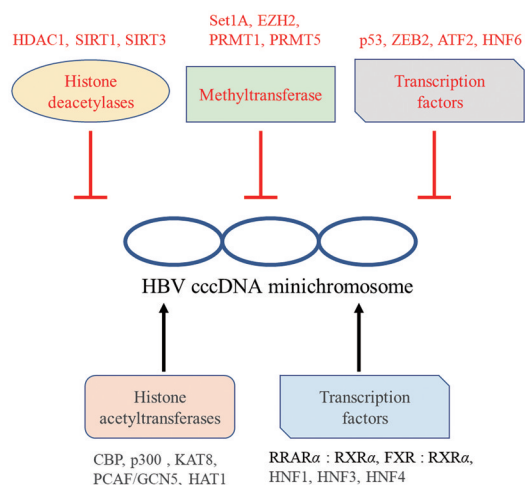


Figure 13 HBV cccDNA transcriptional regulation related host factors. (Red color indicates inhibition of HBV transcription, black color indicates promotion of HBV transcription)

他模型 (如原代 Tupaia 肝细胞) 中 HBV 复制。通过定量 PCR 测定, 敲除 RXR α 基因或下调 RXR α 的表达可降低 HBV 感染并下调 cccDNA 水平, 表明可以通过调控 RXR 活性来抑制 HBV cccDNA 转录^[77]。

视黄酸受体 (retinoic acid receptor, RAR) 在细胞核内通常与 RXR 结合, 形成 RAR: RXR 异源二聚体。该异源二聚体通过与 preS1 和 core 启动子结合, 调控 cccDNA 的转录。Nkongolo 等^[78]发现 Am80 (tamibarotene, 化合物 45, 图 14) 在 PHH 细胞和 HepaRG-NTCP 细胞中均可以下调 HBeAg 水平 (PHH 细胞系: $EC_{50} = 4.4 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HepaRG-NTCP 细胞系: $EC_{50} = 0.8 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。机制研究表明, Am80 可以通过激活 RAR, 特异性地抑制 cccDNA 转录。

法尼醇 X 受体 (farnesoid X receptor, FXR) 是一种由胆汁酸激活的受体, 在肝脏组织中高表达, 可以与 RXR α 结合形成异源二聚体, 识别并结合在 HBV 增强子 EnhII 和核心启动子上, 从而调控 HBV 转录^[79]。东阳光药业有限公司研发的 FXR 激动剂 HEC96719 (化合物 46, 图 14) 在体内外均表现出抗 HBV 活性, 在 PHH 细胞系中显著降低 HBeAg 和 HBV RNA 的水平 (HBeAg: $EC_{50} = 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; HBV RNA: $EC_{50} < 1 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在 AAV/HBV 小鼠上, HEC96719 在 0.5 和 2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药浓度下可以剂量依赖性地抑制 HBV 的复制^[80]。

肝脏 X 受体 (liver X receptors, LXR) 在肝脏内参与调节脂质和胆固醇的代谢。2020 年, Zeng 等^[81]发现 LXR 激动剂 T0901317 (化合物 47) 和 GW3965 (化合物 48, 图 14) 均可以在 0.3、3、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下剂量依赖性地抑制 PHH 细胞系中 HBV 基因的转录, 以及下调 HBV 相关抗原和 DNA 的水平, 但是 cccDNA 含量没有明显降低, 表明 LXR 激动剂通过抑制乙肝病毒基因转录而不是下调 cccDNA 水平来抑制 HBV 复制。

目前多种核受体因子激动剂以其他适应症进入临床批准或正在进行临床试验, 表明该类化合物具有良好的安全性。FXR 激动剂 vonafexor (化合物 49, 图 14) 与干扰素 Peg-IFN 联合治疗乙肝已进入 IIa 期临床试验阶段 (NCT04365933), 表现出良好的协同作用, 说明宿主转录相关因子是治疗 HBV 的潜在靶点, 该联合用药为乙肝治疗提供了新思路^[82]。

5 HBV cccDNA 研究目前面临的问题

目前, HBV cccDNA 的研究领域仍面临很多挑战, 具体主要包括以下几方面: ① 虽然现在已有多种 HBV 动物模型, 包括灵长类动物感染人乙肝 (HHBV) 模型^[83]、鸭乙肝病毒 (DHBV) 模型^[84-86]、土拨鼠肝炎病毒 (WHV) 模型^[87] 和小鼠模型^[88] 等。但是由于 HBV 感染具有严格的宿主特异性^[89], 导致目前仍然缺乏理想的

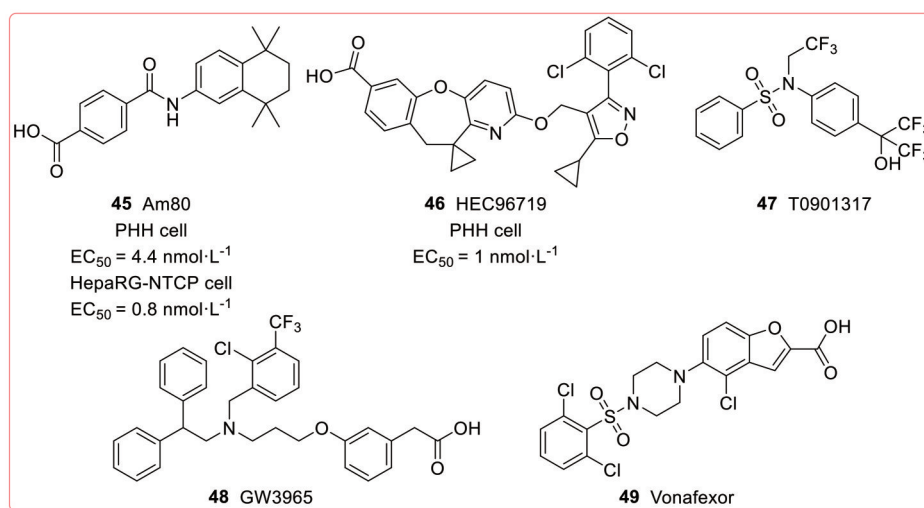


Figure 14 The chemical structures of compounds 45–49

动物模型。比如,在建立HBV感染的小鼠模型中遇到的病毒无法侵入肝细胞以及无法生成cccDNA等诸多障碍,这些障碍的主要原因在于HBV侵入肝细胞需要人源NTCP,而HBV无法与鼠源NTCP进行结合。此外,小鼠肝细胞内可能缺乏cccDNA形成所需要的宿主因子。②目前缺乏可靠的cccDNA细胞模型。理想的HBV感染的细胞模型不仅需要具有与HBV自然感染相似的复制机制,而且需要维持较长的感染时间,并且可以稳定地进行连续传代。目前发现PHH与HepaRG等特定细胞对HBV敏感,但由于PHH分化过程很长,较难获取,而HepaRG细胞可能缺少稳定敏感性,导致缺乏良好的细胞模型,这不利于深入研究HBV生命周期。③HBV DNA的修复途径仍不完全明确。如rcDNA生成cccDNA时经过的中间体途径以及参与这些生化过程所需要的宿主因子目前尚未完全阐明。研究显示,当部分宿主因子被敲除或抑制时,cccDNA仍可以继续生成,只是在细胞内的水平有所下降^[90]。这些结果似乎表明,cccDNA的生成存在多种途径,并且在宿主细胞内可能存在可以替代的宿主因子。此外,目前对于cccDNA的研究大多数是在人肝癌细胞中的HepG2和Huh7细胞系中进行,但是肿瘤细胞的基因复制与正常细胞相比有显著差别。例如,肿瘤细胞可以进行无限增殖,原因在于肿瘤细胞的端粒酶会在复制过程中不断修复磨损的端粒;然而正常细胞进行DNA复制时,端粒酶却不会发挥作用,这给研究cccDNA在正常细胞内的生成造成了影响^[91]。④现阶段由于缺乏高敏感性的cccDNA检测方法,因此无法准确识别rcDNA池并且无法对cccDNA进行定量分析^[18],目前多以HBeAg的水平替代cccDNA转录水平。此外,临床上也不具备能够准确指示肝细胞内cccDNA活性的

血清标志物。⑤表观遗传治疗药物可以沉默cccDNA的转录过程,因此有望成为一种有效的抗HBV新策略。但目前尚未完全阐明如何筛选得到低毒性、高选择性的表观遗传药物。此外,基因编辑技术可以有效清除细胞内cccDNA,但目前迫切需要克服脱靶效应并发现安全可靠的体内给药途径。

6 总结与展望

HBV严重威胁人类生命健康,是导致肝硬化和肝癌的主要因素,已成为世界范围内严重的公共卫生问题^[1,2]。目前的临床药物只能控制HBsAg转为阴性,但停药后仍有复阳的可能。研究证明,cccDNA在肝细胞中持久存在是导致HBV无法根治的主要原因。因此,研究可以抑制或清除cccDNA的药物对于实现乙肝的完全治愈具有至关重要的作用。

随着对于cccDNA生成、转录和复制机制研究的不断深入,陆续有多个抗HBV药物靶标及其抑制剂被报道。本文着重总结了已报道的靶向HBVcccDNA生成、转录和复制的小分子调控剂。按照作用靶点不同,可分为靶向病毒相关蛋白和靶向宿主相关蛋白的小分子化合物。

靶向病毒相关蛋白的小分子调控剂分为HBx调控剂、DNA聚合酶抑制剂、衣壳组装调控剂等。其中,HBV衣壳组装调控剂研究较多。随着高通量筛选技术的发展,多种新母核的衣壳组装调控剂从化合物库中被相继筛选出来,并表现出潜在的抗HBV活性^[50,55,56]。针对已报道的CAM,科研人员通过采用分子杂合、药效团融合、生物电子等排和骨架跃迁等经典药物设计策略对其进行结构修饰,丰富了同类型骨架的构效关系,并发现一系列具有更高活性或更好成药性的化合物^[51-54,57-63]。此外,鉴于HBx和RNase H在

DNA转录和复制中的关键作用,这两类新靶点抑制剂的开发可能是清除cccDNA的新思路。科研人员通过虚拟筛选和SPR技术对化合物库进行筛选,报道了多种可以抑制HBx活性的小分子,为药物开发提供了苗头化合物^[24-28]。但是,HBx结构生物学信息的缺失严重限制了HBx调控剂的合理设计。此外,相关课题组采取“药物再利用”策略,评价HIV RNase H抑制剂的抗HBV活性,并发现了一系列具有显著抗HBV活性的*N*-羟基异喹啉和*N*-羟基吡啶二酮化合物^[45,46]。

由于病毒自身无法表达生命周期中所需的全部蛋白,导致HBV cccDNA在形成和转录过程中需要依赖多种宿主因子。因此,通过调控HBV复制所需要的相关宿主因子活性,可以干扰cccDNA微染色体的形成或转录过程。目前FXR激动剂vonafexor已进入IIa期临床试验阶段,并表现出抗HBV活性。但由于这些因子在宿主细胞的正常生理过程中也发挥作用,平衡相应因子调控剂的抗病毒效应和不良反应是该类化合物研究中需要重点关注的问题。

前已述及,单一用药存在易产生耐药性或临床药效弱等问题。与治疗艾滋病的鸡尾酒疗法类似,随着多种不同机制药物的研发,联合用药会成为临床上功能性治愈乙肝的重要途径。

作者贡献:展鹏对论文进行整体的构思和修改;徐祥瑞和金昱负责全文的撰写;徐淑静、王硕和何勇对论文进行修改;刘新泳对论文进行整体的指导。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

References

- [1] Ward JW, Hinman AR. What is needed to eliminate hepatitis B virus and hepatitis C virus as global health threats [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156: 297-310.
- [2] Stanaway JD, Flaxman AD, Naghavi M, et al. The global burden of viral hepatitis from 1990 to 2013: findings from the Global Burden of Disease Study 2013 [J]. *Lancet*, 2016, 388: 1081-1088.
- [3] WHO. HBV fact sheet. 2020.07.27; Available from: <https://www.who.int/zh/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>.
- [4] Fanning GC, Zoulim F, Hou J, et al. Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, 18: 827-844.
- [5] Nguyen MH, Wong G, Gane E, et al. Hepatitis B virus: advances in prevention, diagnosis, and therapy [J]. *Clin Microbiol Rev*, 2020, 33: e00046-19.
- [6] Ma Y, Wei FJ, Yu J, et al. Advances in research on HBV inhibitors based on new targets (1): capsid protein inhibitors [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 554-565.
- [7] Wei FJ, Ma Y, Yu J, et al. Advances in research on HBV inhibitors based on new targets (2): RNase H and others [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 566-574.
- [8] Eller C, Heydmann L, Colpitts CC, et al. The functional role of sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP in the life cycle of hepatitis B, C and D viruses [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2018, 75: 3895-3905.
- [9] Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: S4-S16.
- [10] Blondot ML, Bruss V, Kann M. Intracellular transport and egress of hepatitis B virus [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: S49-S59.
- [11] Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? [J]. *Liver Int*, 2011, 31: 111-116.
- [12] Feitelson MA, Lee J. Hepatitis B virus integration, fragile sites, and hepatocarcinogenesis [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252: 157-170.
- [13] Chen J, Huang AL. Functional cure of hepatitis B from the perspective of hepatitis B virus covalently closeocircular DNA [J]. *J Clin Hepatol (临床肝胆病杂志)*, 2022, 38: 1716-1720.
- [14] Allweiss L, Dandri M. The role of cccDNA in HBV maintenance [J]. *Viruses*, 2017, 9: 156.
- [15] Lucifora J, Protzer U. Attacking hepatitis B virus cccDNA--the holy grail to hepatitis B cure [J]. *J Hepatol*, 2016, 64: S41-S48.
- [16] Bock C, Schwinn S, Locarnini S, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome [J]. *J Mol Biol*, 2001, 307: 183-196.
- [17] Yuen MF, Chen DS, Dusheiko GM, et al. Hepatitis B virus infection [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18035.
- [18] Bhat SA, Kazim SN. HBV cccDNA--a culprit and stumbling block for the hepatitis B virus infection: its presence in hepatocytes perplexed the possible mission for a functional cure [J]. *ACS Omega*, 2022, 7: 24066-24081.
- [19] Slagle B, Andrisani O, Bouchard M, et al. Technical standards for hepatitis B virus X protein (HBX) research [J]. *Hepatology*, 2015, 61: 1416-1424.
- [20] Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106: 19975-19979.
- [21] Murphy CM, Xu Y, Li F, et al. Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication [J]. *Cell Rep*, 2016, 16: 2846-2854.
- [22] Cai P, Huang J, Su C, et al. Relationship between hepatitis B virus X protein and hepatic cellular cancer [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 165-173.
- [23] Marcus G, Florian W, Garron T, et al. Obesity drives STAT-1-dependent NASH and STAT-3-dependent HCC [J]. *Cell*, 2018, 175: 1289-1306.
- [24] He J, Wu J, Chen J, et al. Identification of estradiol benzoate as an inhibitor of HBx using inducible stably transfected HepG2 cells expressing HiBiT tagged HBx [J]. *Molecules*, 2022, 27:

- 5000.
- [25] Ghosh S, Kaushik A, Khurana S, et al. An RNAi-based high-throughput screening assay to identify small molecule inhibitors of hepatitis B virus replication [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292: 12577-12588.
- [26] Sekiba K, Otsuka M, Ohno M, et al. Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx-DDB1 interaction [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2019, 7: 297-312.
- [27] Ma Y, Nakamoto S, Ao J, et al. Antiviral compounds screening targeting HBx protein of the hepatitis B virus [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23: 12015.
- [28] Ren F, Hu J, Dang Y, et al. Sphondin efficiently blocks HBsAg production and cccDNA transcription through promoting HBx degradation [J]. *J Med Virol*, 2023, 95: e28578.
- [29] Lin X, Yuan ZH, Wu L, et al. A single amino acid in the reverse transcriptase domain of hepatitis B virus affects virus replication efficiency [J]. *J Virol*, 2001, 75: 11827-11833.
- [30] Pley C, Lourenço J, McNaughton AL, et al. Spacer domain in hepatitis B virus polymerase: plugging a hole or performing a role? [J]. *J Virol*, 2022, 96: e0005122.
- [31] Michailidis E, Kirby KA, Hachiya A, et al. Antiviral therapies: focus on hepatitis B reverse transcriptase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44: 1060-1071.
- [32] Ghany MG. Current treatment guidelines of chronic hepatitis B: the role of nucleos(t)ide analogues and peginterferon [J]. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 2017, 31: 299-309.
- [33] Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues [J]. *Gastroenterology*, 2009, 137: 1593-1608.
- [34] Locarnini S. Primary resistance, multidrug resistance, and cross-resistance pathways in HBV as a consequence of treatment failure [J]. *Hepatology*, 2008, 47: 147-151.
- [35] Menéndez-Arias L, Sebastián-Martín A, Álvarez M. Viral reverse transcriptases [J]. *Virus Res*, 2017, 234: 153-176.
- [36] Schinazi RF, Ehteshami M, Bassit L, et al. Towards HBV curative therapies [J]. *Liver Int*, 2018, 38 Suppl 1: 102-114.
- [37] Cox N, Tillmann H. Emerging pipeline drugs for hepatitis B infection [J]. *Expert Opin Emerg Drugs*, 2011, 16: 713-729.
- [38] Gish RG, Asselah T, Squires K, et al. Active site polymerase inhibitor nucleotides (ASPINs): potential agents for chronic HBV cure regimens [J]. *Antivir Chem Chemother*, 2022, 30: 20402066221138705.
- [39] 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.
- [40] Squires KE, Ogilvie L, Jucov A, 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*, 2023, 30: 19-28.
- [41] Tomas M, Jucov A, Anastasiy I, et al. In sustained 12 week off treatment antiviral efficacy of ATI-2173, a novel active site polymerase inhibitor nucleotide, combined with tenofovir disoproxil fumarate in chronic hepatitis B patients, a phase 2a clinical trial [J]. *J Hepatol*, 2022, 77: S73.
- [42] Tavis JE, Zoidis G, Meyers MJ, et al. Chemical approaches to inhibiting the hepatitis B virus ribonuclease H [J]. *ACS Infect Dis*, 2019, 5: 655-658.
- [43] Tavis JE, Lomonosova E. The hepatitis B virus ribonuclease H as a drug target [J]. *Antivir Res*, 2015, 118: 132-138.
- [44] Huber AD, Michailidis E, Tang J, et al. 3-Hydroxypyrimidine-2,4-diones as novel hepatitis B virus antivirals targeting the viral ribonuclease H [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61: e00245-17.
- [45] Edwards TC, Mani N, Dorsey B, et al. Inhibition of HBV replication by *N*-hydroxyisoquinolinedione and *N*-hydroxypyridinedione ribonuclease H inhibitors [J]. *Antivir Res*, 2019, 164: 70-80.
- [46] Edwards TC, Lomonosova E, Patel JA, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by *N*-hydroxyisoquinolinediones and related polyoxygenated heterocycles [J]. *Antivir Res*, 2017, 143: 205-217.
- [47] Lomonosova E, Daw J, Garimallaprabhakaran AK, et al. Efficacy and cytotoxicity in cell culture of novel α -hydroxytropolone inhibitors of hepatitis B virus ribonuclease H [J]. *Antivir Res*, 2017, 144: 164-172.
- [48] Chauhan R, Li Q, Woodson ME, et al. Efficient inhibition of hepatitis B virus (HBV) replication and cccDNA formation by HBV ribonuclease H inhibitors during infection [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2021, 65: e0146021.
- [49] Venkatakrishnan B, Zlotnick A. The structural biology of hepatitis B virus: form and function [J]. *Annu Rev Virol*, 2016, 3: 429-451.
- [50] Wang YJ, Lu D, Xu YB, et al. A novel pyridazinone derivative inhibits hepatitis B virus replication by inducing genome-free capsid formation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59: 7061-7072.
- [51] Chen W, Liu F, Zhao Q, et al. Discovery of phthalazinone derivatives as novel hepatitis B virus capsid inhibitors [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 8134-8145.
- [52] Na HG, Imran A, Kim K, et al. Discovery of a new sulfonamide hepatitis B capsid assembly modulator [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11: 166-171.
- [53] Wang C, Pei Y, Wang L, et al. Discovery of (1*H*-pyrazolo[3,4-*c*]pyridin-5-yl)sulfonamide analogues as hepatitis B virus capsid assembly modulators by conformation constraint [J]. *J Med Chem*, 2020, 63: 6066-6089.
- [54] Amblard F, Boucle S, Bassit L, et al. Novel hepatitis B virus capsid assembly modulator induces potent antiviral responses *in vitro* and in humanized mice [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2020, 64: e01701-19.

- [55] Kim W, Kang JA, Park M, et al. Discovery of novel pyrimidine-based capsid assembly modulators as potent anti-HBV agents [J]. *J Med Chem*, 2021, 64: 5500-5518.
- [56] Yamasaki M, Matsuda N, Matoba K, et al. Acetophenone 4-nitrophenylhydrazone inhibits hepatitis B virus replication by modulating capsid assembly [J]. *Virus Res*, 2021, 306: 198565.
- [57] Li X, Zhang Z, Chen Y, et al. Discovery of SHR5133, a highly potent and novel HBV capsid assembly modulator [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2022, 13: 507-512.
- [58] Liu L, Wang M, Li C, et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel dihydrobenzodioxine derivatives as HBV capsid protein inhibitors [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 128: 106052.
- [59] Yang Y, Yan Y, Yin J, et al. Structure-based discovery of *N*-sulfonylpiperidine-3-carboxamides as novel capsid assembly modulators for potent inhibition of HBV replication [J]. *Viruses*, 2022, 14: 348.
- [60] Yin J, Feng Z, Li Z, et al. Synthesis and evaluation of *N*-sulfonylpiperidine-3-carboxamide derivatives as capsid assembly modulators inhibiting HBV *in vitro* and in HBV-transgenic mice [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 249: 115141.
- [61] Zhang H, Wang F, Zhu X, et al. Antiviral activity and pharmacokinetics of the hepatitis B virus (HBV) capsid assembly modulator GLS4 in patients with chronic HBV infection [J]. *Clin Infect Dis*, 2021, 73: 175-182.
- [62] Ma Y, Zhao S, Ren Y, et al. Design, synthesis and evaluation of heteroaryldihydropyrimidine analogues bearing spiro ring as hepatitis B virus capsid protein inhibitors [J]. *Eur J Med Chem*, 2021, 225: 113780.
- [63] Wang S, Ren Y, Li Q, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of novel sulfamoylbenzamide derivatives as HBV capsid assembly modulators [J]. *Bioorg Chem*, 2022, 129: 106192.
- [64] Cai D, Mills C, Yu W, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56: 4277-4288.
- [65] Wang L, Zhu Q, Zhang JD, et al. Discovery of a first-in-class orally available HBV cccDNA inhibitor [J]. *J Hepatol*, 2022, 78: 742-753.
- [66] Chen D, Tan X, Chen W, et al. Discovery of novel cccDNA reducers toward the cure of hepatitis B virus infection [J]. *J Med Chem*, 2022, 65: 10938-10955.
- [67] Liu C, Cai D, Zhang L, et al. Identification of hydrolyzable tannins (punicalagin, punicalin and geraniin) as novel inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA [J]. *Antivir Res*, 2016, 134: 97-107.
- [68] Mohd-Ismail NK, Lim Z, Gunaratne J, et al. Mapping the interactions of HBV cccDNA with host factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 4276.
- [69] Kitamura K, Que L, Shimadu M, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus [J]. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1007124.
- [70] Pei JF, Hao TL, Gong CJ, et al. A cyclic *N*-hydroxyimide compound and its uses: CN, 202210089210 [P]. 2022-01-25.
- [71] Qi Y, Gao Z, Xu G, et al. DNA polymerase κ is a key cellular factor for the formation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus [J]. *PLoS Pathog*, 2016, 12: e1005893.
- [72] Long Q, Yan R, Hu J, et al. The role of host DNA ligases in hepadnavirus covalently closed circular DNA formation [J]. *PLoS Pathog*, 2017, 13: e1006784.
- [73] Pollicino T, Belloni L, Raffa G, et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130: 823-837.
- [74] Chong CK, Cheng CYS, Tsoi SYJ, et al. Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome [J]. *Antivir Res*, 2017, 144: 1-7.
- [75] Guo YH, Li YN, Zhao JR, et al. HBC binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state [J]. *Epigenetics*, 2011, 6: 720-726.
- [76] Hensel K, Rendon J, Navas M, et al. Virus-host interplay in hepatitis B virus infection and epigenetic treatment strategies [J]. *FEBS J*, 2017, 284: 3550-3572.
- [77] Song M, Sun Y, Tian J, et al. Silencing retinoid X receptor alpha expression enhances early-stage hepatitis B virus infection in cell cultures [J]. *J Virol*, 2018, 92: e01771-17.
- [78] Nkongolo S, Nussbaum L, Lempp FA, et al. The retinoic acid receptor (RAR) alpha-specific agonist Am80 (tamibarotene) and other RAR agonists potently inhibit hepatitis B virus transcription from cccDNA [J]. *Antivir Res*, 2019, 168: 146-155.
- [79] Ramiere C, Scholtes C, Diaz O, et al. Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXRalpha [J]. *J Virol*, 2008, 82: 10832-10840.
- [80] Wang P, Lai Q, Yang X, et al. HEC96719, a novel FXR agonist, inhibits HBV infection *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Hepatol*, 2022, 77: S254.
- [81] Zeng J, Wu D, Hu H, et al. Activation of the liver X receptor pathway inhibits HBV replication in primary human hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2020, 72: 1935-1948.
- [82] Scalfaro P, Heo J, Liu CJ, et al. A phase 2 study testing FXR agonist vonafexor in treatment naive patients with chronic hepatitis B (CHB): preliminary week 16 results [J]. *J Hepatol*, 2021, 75: S761-S762.
- [83] Bukh J, Lanford RE, Purcell RH. Persistent human hepatitis B virus infection in cynomolgus monkeys: a novel animal model in the search for a cure? [J]. *Hepatology*, 2013, 58: 1533-1536.
- [84] Schultz U, Grgacic E, Nassal M. Duck hepatitis B virus: an invaluable model system for HBV infection [J]. *Adv Virus Res*, 2004, 63: 1-70.

- [85] Noordeen F, Scougall CA, Grosse A, et al. Therapeutic antiviral effect of the nucleic acid polymer REP 2055 against persistent duck hepatitis B virus infection [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0140909.
- [86] Zhang YY. Duck hepatitis B virus cccDNA amplification efficiency in natural infection is regulated by virus secretion efficiency [J]. *PLoS One*, 2015, 10: e0145465.
- [87] Menne S, Cote PJ. The woodchuck as an animal model for pathogenesis and therapy of chronic hepatitis B virus infection [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13: 104-124.
- [88] Xu Z, Zhao L, Zhong Y, et al. A novel mouse model harboring hepatitis B virus covalently closed circular DNA [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2022, 13: 1001-1017.
- [89] Xu R, Hu P, Li Y, et al. Advances in HBV infection and replication systems *in vitro* [J]. *Virology*, 2021, 18: 105.
- [90] Marchetti AL, Guo H. New insights on molecular mechanism of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation [J]. *Cells*, 2020, 9: 2430.
- [91] Mizukoshi E, Kaneko S. Telomerase-targeted cancer immunotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 1823.