点 评

2016 年拉斯克-德贝基临床医学研究奖: 丙型肝炎病毒复制子模型推动新型治疗药物发展

赵勤俭^{①*}, 夏宁邵^{①②*}^① 厦门大学公共卫生学院分子病毒学和分子诊断学国家重点实验室, 361102 厦门;^② 厦门大学生命科学学院国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 361102 厦门

* 联系人, Email: zhaoqinjian@xmu.edu.cn; nsxia@xmu.edu.cn

收稿日期: 2016-10-08; 接受日期: 2016-10-18; 网络版发表日期: 2016-12-07

2016 年的拉斯克-德贝基临床医学研究奖授予了三位杰出的科学家 Charles Rice, Ralf Bartenschlager 和 Michael Sofia, 以表彰他们在不同阶段做出的突出贡献, 使高效治疗丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)感染变成了现实. 2013 年 Sofia 和他带领的研究团队研制的抗病毒药物 PSI-7977(商品名 Sofosbuvir, 索非布韦)被证明可高效治疗慢性 HCV 感染, 并被批准上市, 此时距离 HCV 的发现不到 28 年. 这一重大突破的基石则是 Bartenschlager 和 Rice 在 1999 年成功建立的 HCV 亚基因组复制子模型. 索非布韦在临床试验中显示出突出的安全性和有效性, 可高效进入肝细胞并在细胞内代谢为一种三磷酸衍生物, 成为完全被活化的高亲和力的 HCV RNA 聚合酶(NS5B)抑制剂.

世界卫生组织(World Health Organization, WHO)的报告指出, 肝炎疾病作为一个整体仍然是世界重大卫生问题(WHO 文献号: WHO/HIV/2016.06, Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016-2021(<http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>)). HCV 与乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是两类在全世界导致肝硬化或肝癌的肝

炎病毒. 在最近几年, 丙型病毒性肝炎治疗取得了令人激动的突破. 最近的代表性事件显然就是 Rice, Bartenschlager 和 Sofia 获得了 2016 年拉斯克-德贝基临床医学研究奖. 其中, Rice 和 Bartenschlager 成功建立并发展了高效的 HCV 复制子模型, Sofia 则将这种被称为“实验室中的活 HCV”的新型工具用于筛选并改进抗病毒药物, 并最终成功获得了目前最有效的药物分子.

图 1 展示了在 HCV 病毒学研究和抗病毒药物发展中重要的里程碑事件. 2016 年的拉斯克奖是该奖项第二次对 HCV 领域的研究成就进行表彰, 2000 年的拉斯克奖曾授予在 HCV 发现与降低病毒传播风险方法发展上作出突出贡献的研究者.

1 高效的病毒体外复制模型: 功能性 HCV 复制子

HCV 在 1989 年通过分子克隆技术获得明确鉴定, 此前它被归为非甲非乙型肝炎病毒. 2016 年的拉斯克奖表彰了 Rice 和 Bartenschlager 在 HCV 复制子模型方面的重大贡献. 这种高效的体外复制模型为

引用格式: 赵勤俭, 夏宁邵. 2016 年拉斯克-德贝基临床医学研究奖: 丙型肝炎病毒复制子模型推动新型治疗药物发展. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 1437-1440, doi: 10.1360/N052016-00328

英文版见: Zhao Q J, Xia N S. The 2016 Lasker-DeBakey Clinical Medical Research Award: Innovative hepatitis C virus (HCV) replicons leading to drug development for hepatitis C cure. Sci China Life Sci, 2016, 59: 1198-1201, doi: 10.1007/s11427-016-0313-9

图1 HCV 病毒学研究和抗病毒药物发展的重要事件时间表和里程碑

2016 年拉斯克-德贝基临床医学研究奖授予了 Bartenschlager, Rice 和 Sofia. 2000 年阿尔伯特-拉斯克临床医学研究奖授予了 1989 年在 HCV 发现上作出重要贡献的来自 Chiron 公司的 Michael Houghton 和 NIH 的 Harvey Alter

开展病毒复制、致病机制及病毒进化等研究提供了重要条件, 特别是为研制抗病毒药物提供了关键支持.

获奖者之一的 Rice 在研究 HCV 之前的主要方向是黄病毒的分子病毒学. 1993 年, Rice 在 *Journal of Virology* 发表了他的第一篇关于 HCV 的论文^[1]. 此后, 他的研究重点转向了 HCV. 在早期, 他主要分析 HCV 的基因表达与鉴定病毒抗原. 1996 年, Rice 确定了具有保守特征的 HCV 基因组 RNA 的 3'末端序列^[2]. 该研究首次发现了正确的病毒基因组末端序列, 对于此后成功构建 HCV cDNA 感染性克隆具有至关重要的作用. 此前所有的构建病毒复制子的尝试失败都与缺乏这一末端终止序列有关. 1997 年, Rice 证明了将 HCV 全长 cDNA 克隆的 RNA 转录产物输入大猩猩的肝脏可成功建立 HCV 感染并导致发病^[3]. 这项工作表明在实验室中设计和构建病毒的功能性复制模型是可行的. 1999 年, 同为获奖者之一的

Bartenschlager 成功构建了可在人肝癌细胞株 Huh7 中复制的 HCV 亚基因组复制子^[4]. 然而, 这种最初的病毒复制子模型的效率仍较为有限. 随后在 2000 年, Rice 实验室发现了位于 HCV 非结构蛋白 NS5A 的一些位点突变可显著提高 HCV 复制子模型的复制效率^[5]. 其他后续跟进研究, 在筛选可在体外高效复制的 HCV 分离株的工作中获得了著名的 HCV cDNA 克隆株 JFH-1 (属于 2a 基因型). 该毒株是 2001 年由日本东京都神经科学研究所的 Takaji Wakita 从一位暴发性肝炎患者体内分离获得^[6], 其无需适应性突变即具有高效的复制能力^[7]. 2005 年, Rice 与 Wakita 几乎同时证明了由 JFH-1 克隆或以 JFH-1 为基础骨架的嵌合克隆构建的重组 HCV 对 Huh7 细胞具有感染性^[8,9]. 此后, 来自世界不同研究组的报告也均证实了以 JFH-1 为基础构建的复制子模型具有高效的体外复制效率, 可支持 HCV 在体外培养细胞中建立较完整的

生命周期。

2016 年拉斯克奖在 HCV 复制子模型方面的另一位获奖人是 Bartenschlager。他和他的团队 1999 年在 *Science* 上首次描述了构建选择性 HCV 亚基因组 RNA 复制子^[4]，这项工作被认为是 HCV 细胞模型发展的重要里程碑。Bartenschlager 当时在德国的美因茨大学(University of Mainz)，刚开始进入 HCV 研究领域不久，此前他在海德堡大学(Heidelberg University)分子生物学研究中心获得博士学位(研究方向为 HBV)后在罗氏公司开展博士后研究(研究 HCV 蛋白酶)。建立高效的 HCV 体外复制模型是 Bartenschlager 实验室和 Rice 实验室多年追求的目标。Bartenschlager 实验室创造性地将双顺反子和抗药性筛选应用于构建新型的 HCV 亚基因组复制子，成功地在 Huh7 细胞中实现了持续有效复制。该复制子的组成包括了作为选择性筛选标记的新霉素磷酸转移酶基因，其之前为 HCV 自身的内部核糖体进入位点序列，之后是来自于脑心肌炎病毒的内部核糖体进入位点序列，及可由其引导表达的 HCV 非结构蛋白(NS3-NS5B)的基因序列。

2 治愈 HCV 感染：索非布韦的研发

直到 2012 年，当时被认为最好的 HCV 临床治疗方案是联合使用聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN)和利巴韦林(Ribavirin)(称为 PR 疗法)。使用该疗法经过 24 或 48 周的治疗周期，总体治愈率为 40%~50%，其中对基因型 2 和 3 有更高(50%~80%)的治愈率或持续病毒学应答(Sustained Virologic Response, SVR)(图 1)，而对基因型 1 的效果较差。因此，需要探寻更为高效的可广谱抑制不同基因型且副作用更低的新型药物。2016 年拉斯克奖得主之一的 Sofia 领导团队成功研发了新型药物分子 PSI-7977(Sofosbuvir, Sovaldi[®], Gilead Sciences)^[10]，其与利巴韦林联合使用可以将治疗周期缩短至 12 周，而治愈率可提高到 80%~95%^[11]。

PSI-7977 的设计开发建立在 PSI-6130 分子的研究基础上，后者可通过竞争性结合 HCV 的 RNA 聚合酶 NS5B 抑制病毒 RNA 的复制，从而有效抑制病毒复制^[12]。然而，PSI-6130 的生物利用度不佳，导致了其在临床试验中效果不理想。Sofia 带领团队以 PSI-6130 为基础探索发展出新的药物分子 PSI-7977。

经过了前体药物设计，其可更为高效地进入肝细胞，能够迅速被肝细胞摄入，通过细胞内代谢途径生成单磷酸衍生物，并进一步通过细胞内的磷酸化反应生成三磷酸衍生物，从而成为一种高效的 HCV 复制抑制剂。在 HCV 复制子模型评估^[13]和临床试验中均成功验证了 PSI-7977 具有高效的抗病毒能力(图 1)。

PSI-7977 在随后的临床试验中表现出很好的有效性与安全性，2013 年被美国食品药品监督管理局(food and drug administration, FDA)批准上市，商品名为索非布韦(Sofosbuvir)。索非布韦可以单独使用且效果出色，因此与干扰素或利巴韦林联用不再是必须的。索非布韦对不同基因型 HCV 的感染患者均具有较高的治愈率，并且未显示出耐药性。至今，索非布韦已成功治愈了大约 80 万名丙肝患者。

3 降低 HCV 相关疾病死亡率的征程并未结束

自从索非布韦被批准上市后，已有众多患者受益于这项备受赞誉的成果。由于该药具有优异的有效性和安全性，显然所有慢性丙肝患者都应该接受治疗。然而由于高昂的价格，难于让所有需要的患者都能够获得药物。此外，尽管索非布韦能够高效清除患者体内的病毒，但从公共卫生的角度来看其可能并不能直接降低总的疾病负担。

首先，对晚期感染患者用药清除病毒可能并不能阻止肝硬化和肝癌的进程。此外，有研究也发现对共感染 HBV 和 HCV 的患者用药成功清除 HCV 后出现了 HBV 激活并且加重了肝炎症状。来自 WHO 的报告指出，至 2020 年“HBV+HCV”相关疾病的年死亡病例数不会有明显变化，报告也指出“全球只有不足 5% 的慢性病毒性肝炎患者能够认识到他们所处的状态”(WHO 文献号：WHO/HIV/2016.06, Global health sector strategy on viral hepatitis, 2016-2021 (<http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/>)). 因此，仍十分需要发展更为有效的筛查体系以提升对相关疾病的认知和治疗能力。疫苗免疫仍然是最有效的控制病毒感染的方法，目前已有甲肝、乙肝和戊肝疫苗上市，而丙肝疫苗研发到目前为止仍未成功。尽管药物治疗可以有效降低 HCV 的致死率，但从长远来看，理想的方式依然是通过疫苗免疫在健康人群中阻止 HCV 的感染。

4 结语

从 1989 年发现导致丙型肝炎的 HCV, 到 2013 年高效治疗药物索非布韦获得成功, 这一发展进程值得认真关注与研究. 一个重要的经验是, 多个学科之间的高效和及时的联合与交叉非常重要的, 例如分子病毒学基础研究、药物设计与开发、临床观察和临床试验等学科. 数以百万计的受益

患者将感谢今年拉斯克奖得主 Bartenschlager, Rice 与 Sofia 和他们取得的卓越成就. 研究其他人类病原体如 HBV 的科学家们也正在追求发展类似 HCV 复制子模型的新型工具. 索非布韦的成功研制也验证了高特异性药物分子可通过前体药物手段并利用胞内代谢机制实现靶向治疗的可行性, 这将鼓励研究人员设计出更多具有理想特异性和有效性的药物分子.

致谢 感谢张军、葛胜祥、程通、袁权、郑子峥和史维国教授参与讨论本文内容, 感谢俞海和欧明展提供编辑帮助.

参考文献

- 1 Grakoui A, Wychowski C, Lin C, et al. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol*, 1993, 67: 1385–1395
- 2 Kolykhalov A A, Feinstone S M, Rice C M. Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol*, 1996, 70: 3363–3371
- 3 Kolykhalov A A, Agapov E V, Blight K J, et al. Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, 1997, 277: 570–574
- 4 Lohmann V, Korner F, Koch J, et al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, 1999, 285: 110–113
- 5 Blight K J, Kolykhalov A A, Rice C M. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science*, 2000, 290: 1972–1974
- 6 Kato T, Furusaka A, Miyamoto M, et al. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol*, 2001, 64: 334–339
- 7 Kato T, Date T, Miyamoto M, et al. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology*, 2003, 125: 1808–1817
- 8 Lindenbach B D, Evans M J, Syder A J, et al. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 2005, 309: 623–626
- 9 Wakita T, Pietschmann T, Kato T, et al. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 2005, 11: 791–796
- 10 Sofia M J, Bao D, Chang W, et al. Discovery of a β -D-2'-deoxy-2'- α -fluoro-2'- β -C-methyluridine nucleotide prodrug (PSI-7977) for the treatment of hepatitis C virus. *J Med Chem*, 2010, 53: 7202–7218
- 11 Gane E J, Stedman C A, Hyland R H, et al. Nucleotide polymerase inhibitor sofosbuvir plus ribavirin for hepatitis C. *N Engl J Med*, 2013, 368: 34–44
- 12 Stuyver L J, McBrayer T R, Tharnish P M, et al. Inhibition of hepatitis C replicon RNA synthesis by β -D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-C-methylcytidine: A specific inhibitor of hepatitis C virus replication. *Antivir Chem Chemother*, 2006, 17: 79–87
- 13 Stuyver L J, McBrayer T R, Tharnish P M, et al. Dynamics of subgenomic hepatitis C virus replicon RNA levels in Huh-7 cells after exposure to nucleoside antimetabolites. *J Virol*, 2003, 77: 10689–10694