

综述

DOI: 10.3969/j.issn.0253-9802.2022.11.003

HBV 相关中和抗体在慢性乙型肝炎抗病毒治疗中的研究进展

赵宇迪 黄明星

【摘要】 HBV 感染不仅是一项重要的全球性公共卫生问题，也是我国正在面临的一项重要挑战。虽然现在已有针对 HBV 的疫苗并且其接种普及率也在逐年提高，但仍然有很多的乙型肝炎患者亟待治疗。中和抗体作为 HIV 一项重要的治疗方法同样在 HBV 的治疗研究领域被寄予厚望。目前针对 HBV 相关中和抗体的研究主要包括 G12、Bc1.187、H017、H019、BX-182、KR127 和 2H5-A14，其中 H017 和 H019 联合应用以及 2H5-A14 在动物实验中在免疫耐受性和中和活性研究中均取得相当不错的进展。该文就 HBV 相关中和抗体的研究进展进行综述，以探究其未来可能的发展方向及应用前景。

【关键词】 乙型肝炎；中和抗体；功能性治愈；乙型肝炎病毒表面抗原；乙型肝炎病毒表面抗体

Progress of hepatitis B virus-associated neutralizing antibody in antiviral therapy of chronic hepatitis B Zhao Yudi, Huang Mingxing. Center for Infectious Disease Control, the Fifth Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Zhuhai 519000, China
Corresponding author, Huang Mingxing, E-mail: huangmx5@mail.sysu.edu.cn

【Abstract】 Chronic hepatitis B virus infection is not only an important global public health problem but also an important challenge in our country. Although there are some vaccines for hepatitis B and its prevalence is increasing year by year, there are still many patients in need of treatment. Neutralizing antibody as an important treatment for HIV is also promising in the field of hepatitis B cure. Current studies on neutralizing antibodies related to hepatitis B virus mainly include G12, Bc1.187, H017, H019, BX-182, KR127 and 2H5-A14, among which H017 and H019 combined application and 2H5-A14 have achieved quite good results in immune tolerance and neutralization activity in animal experiments. This article reviews the research progress of neutralizing antibodies related to hepatitis B virus to explore the possible development direction and application prospect in the future.

【Key words】 Viral hepatitis B; Neutralizing antibody; Functional cure; HBsAg; Anti-HBs

乙型肝炎（乙肝）是全球主要的公共卫生威胁。WHO 在 2021 年发布的统计报告显示，截至 2019 年在全球范围内有超过 2.95 亿人患有慢性乙肝（慢乙肝），每年有超过 82.1 万人死于 HBV 感染或乙肝相关并发症^[1]。在未经过系统性治疗的情况下，8%~20% 的患者在 5 年内发展为肝硬化，其中 20% 的患者为失代偿期，两者的 5 年内病死率分别为 15% 和 > 60%，对患者的生命健康安全造成了严重威胁^[2]。现阶段乙肝抗病毒药物的治疗已经可以达到长期抑制 HBV DNA 复制水平的目标，但是对于大部分 HBeAg 阳性的患者，仍然无法实现 HBeAg 的完全清除^[3]。人体自身的免疫系统可以通过 Fc 介导细胞毒性作用和吞噬细胞的吞噬作用清除被感染的肝细胞，而通过体外合成特

异性中和活性强的中和抗体可以有效地模拟这一进程，从而有效降低病毒表面抗原载量^[4,5]。本文就中和抗体在慢乙肝中的治疗现状及新药物研发的进展进行一一综述，以探究中和抗体未来可能的发展方向及应用前景。

一、目前慢乙肝的主要治疗方法以及存在的挑战

目前慢乙肝的一线治疗用药包括聚乙二醇干扰素（Peg-IFN）和核苷类似物（NAs）。这两类药物虽然是针对 HBV 的一线用药，但是其对 HBV 持续复制的源泉——模板共价闭环环状 DNA（cccDNA）微小染色体库作用有限^[6]。尽管 IFN 可在一定程度上清除 cccDNA，但极少量的 cccDNA

也会导致乙肝复发^[7]。虽然现阶段已有研究机构针对cccDNA进行研究,例如直接靶向cccDNA的CRISPR或其他基因编辑方法在实验室研究中就已展现出潜力^[8]。此外近年研究表明,通过耗竭cccDNA池实现对患者的病毒学治愈也成为可能的方向^[9]。但就目前而言,针对cccDNA的药物依旧处于研究阶段,慢乙肝的“完全性治愈”依旧难以实现,在这种情况下,“功能性治愈”成为慢乙肝治疗的阶段性目标。

“功能性治愈”是指感染者体内的病毒被完全抑制,机体免疫功能正常,即使不接受治疗,用常规方法也难以在患者体内检出病毒^[10]。在美国肝病研究协会-欧洲肝病学会关于慢乙肝治疗终点的研讨会上,学者们将慢乙肝的“完全性治愈”定义为患者血清中检测不到HBsAg,并根除HBV DNA,包括肝内cccDNA和整合在宿主染色体上的HBV DNA^[11]。同时,研究表明在一部分病例中,几乎所有被HBV感染的肝细胞都被CD8⁺T淋巴细胞介导的免疫反应所杀灭,这表明HBV不需要完全根除,通过扩大和调控免疫反应可阻止病毒进一步扩散,实现功能性治愈,这成为慢乙肝免疫治疗的新方案^[12]。

目前新的治疗方法如中和抗体、小干扰RNA疗法、HBV核心抑制剂、HBV衣壳抑制剂、治疗性HBV疫苗等免疫疗法相继进入研究者视野^[13-14]。其中,中和抗体特异性结合HBsAg阻止HBV对机体的感染。有研究表明,使用中和抗体可减少肝脏和循环中的病毒抗原载量,恢复后天免疫系统功能^[15]。

二、HBV相关中和抗体

多克隆抗体如乙肝Ig(HBIG)因其成本高、比活性低、可能传播血源性疾病等原因,不宜长期应用于治疗。相对而言,单克隆抗体HBV相关中和抗体的价格更加低廉、特异性更高、中和活性更强,是当前更具价值的慢乙肝抗病毒免疫治疗方案。

1. 单克隆抗体的作用靶点

在HBV感染的进程中,功能性受体牛磺胆酸钠共转运蛋白(NTCP)和硫酸肝素蛋白聚糖(HPSG)在HBV感染侵袭细胞中起着相当重要的作用。而HBV和这两个作用靶点的结合又和HBV表面的S蛋白和L蛋白息息相关。S蛋白主要的抗原决定簇为S域内的aa99-169,其中一簇构象表位

的 α 决定簇(aa124-147)可被天然HBV感染或接种疫苗产生的抗体识别,介导抗体对病毒的中和作用。L蛋白(前S1区+前S2+S结构域)定位于传染性HBV颗粒,并与病毒的形成和传播息息相关。根据与病毒蛋白结合位点的不同可以进一步将单克隆抗体分为2类,一类是针对S蛋白上 α 结构域的抗体,而另一类是针对L蛋白上前S1区结构域的抗体。

2. 靶向 α 结构域的单克隆抗体

在接种疫苗或者感染HBV后,人体自身会产生抗体,这种抗体的靶点就是 α 结构域,经FDA认证的疫苗基本为靶向 α 结构域,在一项疫苗接种和自然转阴志愿者的研究中,HBV疫苗可以被S蛋白完全阻断,结果表明在这两类人群中,由机体免疫系统产生的抗体主要是靶向 α 结构域^[5]。

Cerino等^[16]和Wang等^[17]分别使用抗体提纯和噬菌体文库重组法提取出较强活性的ADRI-2F3和G12中和抗体,并在早期的动物实验中取得了相当不错的成绩,但是这2种抗体在抗原识别表位上都表现出单一性。随着研究的进展,二者在高水平病毒载量的小鼠中降低病毒表面抗原浓度的能力表现出明显的不足,甚至出现了免疫逃逸毒株。说明抗体识别表位的单一可能会与免疫逃逸有所关联,如何解决免疫逃逸的难题是这些单一表位识别的中和抗体必须克服的问题。

对于上述问题,Hehle等^[4]和Wang等^[15]各自提出了解决方案。Hehle等^[4]从疫苗接种者和高血清抗体病毒携带者的外周血B淋巴细胞中,通过单细胞流式细胞分选技术获得S-HBsAg结合的IgG⁺记忆性B淋巴细胞,再将其重组表达克隆制备和筛选获得了强有力的交叉中和抗体Bc1.187。大多数已知的“ α ”决定簇的表位包括一个主要区域,跨越半胱氨酸138~147,被Bc1.187识别,从而减少逃逸的发生。Wang等^[15]则是通过对159名志愿者的血清进行ELISA筛选出20种有高中和活性的抗体,再进一步通过竞争ELISA分成了3类相互排斥的克隆抗体,表明HBsAg上至少存在3个显性非重叠抗原位点。其后的研究通过对常见的44种免疫逃逸毒株的丙氨酸分析,得到了H017和H019这2种具有最大的广度和互补性的抗体,其联合应用相比于单一应用能有效避免免疫逃逸。结果表明,抗HBs bNAbs单一治疗确实会导致免疫逃逸突变的出现,而基于不同识别位点的H017和H019治疗的小鼠则没有出现免疫逃逸,这也说明

了识别不同位点的抗体联合治疗应用可以有效避免免疫逃逸的发生。

3. 靶向前 S1 区结构域的抗体

与人体中普遍存在的抗 HBsAg α 结构域不同,前 S1 区主要存在于成熟感染性 HBV 中,因此其水平远低于 HBsAg^[17]。此外,前 S1 结构域介导病毒与肝细胞进入细胞受体的相互作用,在 HBV 病毒颗粒的组装和释放中起重要作用。另有研究显示,慢乙肝患者表现出较少的 HBV 大面积抗原 preS1 结构域的免疫耐受,这说明抗 S1 蛋白的抗体可能在免疫耐受及避免诱导免疫逃逸方面有其优势之处,使其成为除抗 HBsAg 以外的 HBV 治疗潜在新靶点^[18]。

在一项关于前 S1 区结构域为治疗靶点的治疗性疫苗研究中,前 S1 多肽在 HBV 携带小鼠中诱导了强大的免疫应答^[18]。抗前 S1 蛋白在体内快速清除 HBV 颗粒,在体外阻断 HBV 感染肝细胞;接种前 S1 多肽的小鼠甚至 HBsAg 耐受性降低;随后连续予 HBV 携带小鼠注射抗原特异性前 S1 多肽和 HBsAg 疫苗,最终诱导 HBsAg 的血清学转化,清除慢性 HBV 感染。这些结果提示以前 S1 区结构域为作用靶点的治疗性疫苗可以用于慢乙肝的控制,并且在免疫耐受方面拥有其独到的优势之处。

而除治疗性疫苗之外,以前 S1 区结构域为作用靶点的抗体研究同样正在火热进行中,并且这种抗体表现出与前者同样的特性。Zhang 等^[19]采用组合方法筛选噬菌体随机肽库,在黑猩猩体内筛选出一个中和抗体表位,该抗体 BX-182 对黑猩猩具有亚型特异性保护作用。BX-182 呈亚型特异性,能够阻断 HBV adw 亚型的传染性,但不能阻断 ayw 亚型在黑猩猩中的传染性,这种亚型特异性可能和抗体识别的基因表位有关。虽然研究仅局限于动物本身,并且有亚型特异性,这种人工合成的、针对黑猩猩的抗体在人体内是否具有效果仍有待验证,但是基于前 S1 区的抗体已经初步显示了可行性。而在其后,Chi 等^[20]对小鼠源性的 HzKR127 Fab 中的所有互补性决定区残基进行了全面的丙氨酸扫描突变。进一步揭示了主要结合决定子在抗原结合中的特异性作用,有助于抗体最大限度进行人源化和亲和力成熟的合理设计。这种抗体有着较强的亲和力,但是改造尚未成熟,仍需进一步探讨结构和处理。

近年, Li 等^[21]利用一个大型的非免疫噬菌体展示人抗体库鉴定了一组特异性针对前 S1 区结

构域的中和性抗体,最终确定了 6 种中和性抗体。这些单克隆抗体的中和效力与其抗原决定簇的位置和前 S1 受体结合位点有关,其中一种主要的中和性抗体 2H5,对 HBV 和丁型肝炎病毒均表现出很强的中和能力。再通过进一步对 2H5 进行改造,筛选出中和活性强、热稳定性高的 2H5A-14。在后续的研究中,这种抗体表现出 200 倍强于 Kr127 的特性,并且对 HBV 的三大流行基因型 B、C、D 和 95% 的基因型有免疫作用,还可以通过自然杀伤细胞和巨噬细胞发挥抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用和抗体依赖性细胞介导的吞噬作用。在免疫逃逸方面,以 Phe23 为核心的保守序列作为靶点,不易产生免疫逃逸。

三、展望

目前有关 HBV 相关中和抗体的研究仍处于实验阶段,但是对于免疫活性的研究已经初具成效,但是,如何避免免疫耐受仍旧是一个抗体研发过程中需要克服的困难。在目前的抗体研究中,Hehle 等^[4]、Wang 等^[15]及 Li 等^[21]均提出了解决方案。另有研究表明,针对特异位点的抗体可以在一定程度上避免免疫逃逸突变^[22]。在关于前 S1 蛋白结构域的研究中,氨基酸位点 1 (aa8-16) 针对大多数亚型有较高的亲和力, N 端高度保守(除了 D)和位点 3 (aa35-41) 仅针对某一种亚型 C 端增强效力^[23]。基于抗原特异性存储器 B 细胞分选的方法可快速产生大量的功能单克隆抗体,这对针对特异靶点进行定向的抗体改造很有意义。此外,部分中和抗体可能会通过 Fc 介导的免疫反应进一步调节免疫反应^[21]。对于中和抗体的研究仍存在一些难题,例如部分中和抗体及其所介导的补体免疫反应尚不明确,目前的研究大部分还局限于动物中,一些人工合成的抗体在人体内的作用有待进一步验证。2021 年欧洲肝病学会年会报告,中和抗体治疗乙肝患者取得成功,为乙肝患者带来了“功能性治愈”的曙光^[23]。中和抗体与富马酸替诺福韦二吡啶酯联用的疗效在高病毒载量的 HBV 携带小鼠上也得到了肯定^[24]。HBsAg 的降低可以增强疫苗对病毒的抵抗能力。中和抗体可以明显地减少抗原高负荷以减低患者免疫系统的负荷,减缓患者 CD8⁺T 淋巴细胞的耗竭,有效延缓患者的进程,最终达到功能性治愈的终点——HBsAg 的完全清除^[25]。综上所述,HBV 相关中和抗体在功能性治愈的免疫疗法中表现出相当不错的潜力,

将会成为乙肝患者治疗的一项新选择。

参 考 文 献

- [1] World Health Organization. Global progress report on HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections, 2021. Geneva: World Health Organization, 2019.
- [2] European Association for the study of the liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, 2017, 67 (2): 370-398.
- [3] 张星鑫, 郭津生. 慢性乙型肝炎的现有认识及治疗进展. *肝脏*, 2021, 26 (3): 327-330.
- [4] Hehle V, Beretta M, Bourguin M, et al. Potent human broadly neutralizing antibodies to hepatitis B virus from natural controllers. *J Exp Med*, 2020, 217 (10): e20200840.
- [5] Zhang T Y, Chen H Y, Cao J L, et al. Structural and functional analyses of hepatitis B virus X protein BH3-like domain and Bel-xL interaction. *Nat Commun*, 2019, 10 : 3192.
- [6] Shi Y, Zheng M. Hepatitis B virus persistence and reactivation. *BMJ*, 2020, 370 : m2200.
- [7] Yang Y, Zhao X, Wang Z, et al. Nuclear sensor interferon-inducible protein 16 inhibits the function of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by integrating innate immune activation and epigenetic suppression. *Hepatology*, 2020, 71 (4): 1154-1169.
- [8] Ma Z, Zhang E, Gao S, et al. Toward a functional cure for hepatitis B: the rationale and challenges for therapeutic targeting of the B cell immune response. *Front Immunol*, 2019, 10 : 2308.
- [9] Huang Q, Zhou B, Cai D, et al. Rapid turnover of hepatitis B virus covalently closed circular DNA indicated by monitoring emergence and reversion of signature-mutation in treated chronic hepatitis B patients. *Hepatology*, 2021, 73 (1): 41-52.
- [10] Cornberg M, Lok A S F, Terrault N A, et al. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B: report from the 2019 EASL-AASLD HBV treatment endpoints conference. *J Hepatol*, 2020, 72 (3): 539-557.
- [11] Revill P A, Chisari F V, Block J M, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4 (7): 545-558.
- [12] Li M H, Yi W, Zhang L, et al. Predictors of sustained functional cure in hepatitis B envelope antigen-negative patients achieving hepatitis B surface antigen seroclearance with interferon-alpha-based therapy. *J Viral Hepat*, 2019, 26 (Suppl 1): 32-41.
- [13] Allweiss L, Giersch K, Piroso A, et al. Therapeutic shutdown of HBV transcripts promotes reappearance of the SMCS/6 complex and silencing of the viral genome *in vivo*. *Gut*, 2022, 71 (2): 372-381.
- [14] Maini M K, Burton A R. Restoring, releasing or replacing adaptive immunity in chronic hepatitis B. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16 (11): 662-675.
- [15] Wang Q, Michailidis E, Yu Y, et al. A combination of human broadly neutralizing antibodies against hepatitis B virus HBsAg with distinct epitopes suppresses escape mutations. *Cell Host Microbe*, 2020, 28 (2): 335-349.e6.
- [16] Cerino A, Bremer C M, Glebe D, et al. A human monoclonal antibody against hepatitis B surface antigen with potent neutralizing activity. *PLoS One*, 2015, 10 (4): e0125704.
- [17] Wang W, Sun L, Li T, et al. A human monoclonal antibody against small envelope protein of hepatitis B virus with potent neutralization effect. *mAbs*, 2016, 8 (3): 468-477.
- [18] Wang W, Zhou X, Bian Y, et al. Dual-targeting nanoparticle vaccine elicits a therapeutic antibody response against chronic hepatitis B. *Nat Nanotechnol*, 2020, 15 (5): 406-416.
- [19] Zhang P, Yu M Y W, Venable R, et al. Neutralization epitope responsible for the hepatitis B virus subtype-specific protection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (24): 9214-9219.
- [20] Chi S W, Maeng C Y, Kim S J, et al. Broadly neutralizing anti-hepatitis B virus antibody reveals a complementarity determining region H3 lid-opening mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (22): 9230-9235.
- [21] Li D, He W, Liu X, et al. A potent human neutralizing antibody Fc-dependently reduces established HBV infections. *eLife*, 2017, 6 : e26738.
- [22] Yato K, Onodera T, Matsuda M, et al. Identification of two critical neutralizing epitopes in the receptor binding domain of hepatitis B virus preS1. *J Virol*, 2020, 95 (5): e01680-e01620.
- [23] Vir Biotechnology, Inc. Initial data from ongoing phase 1 trial of VIR-3434 for chronic hepatitis B virus infection demonstrates significant and rapid reduction in hepatitis B surface antigen. (2021-01-26) [2022-01-20] <https://investors.vir.bio/news-releases/news-release-details/initial-data-ongoing-phase-1-trial-vir-3434-chronic-hepatitis-b>.
- [24] Michler T, Kosinska A D, Festag J, et al. Knockdown of virus antigen expression increases therapeutic vaccine efficacy in high-titer hepatitis B virus carrier mice. *Gastroenterology*, 2020, 158 (6): 1762-1775.e9.
- [25] Xu H, Locarnini S, Wong D, et al. Role of anti-HBs in functional cure of HBeAg⁺ chronic hepatitis B patients infected with HBV genotype A. *J Hepatol*, 2022, 76 (1): 34-45.

(收稿日期: 2022-02-21)

(本文编辑: 林燕薇)