

乙型肝炎病毒中国流行株 B2、C2 基因型模型的人工构建与 siRNA 化合物评估*

邹珂珂¹ 张静¹ 臧超¹ 明新² 黄浩喜¹

(1. 成都倍特药业股份有限公司核酸药物研发平台, 四川 成都 610000; 2. 成都医学院药学院, 四川 成都 610500)

【摘要】 目的 为评估对中国乙型肝炎病毒(HBV)感染人群具有潜在疗效的 siRNA 化合物, 构建一种针对中国流行株代表性 HBV 的细胞模型。方法 选择中国大范围流行的 1 416 条 B2 HBV 基因组序列和 1 636 条 C2 HBV 基因组序列整合构建中国 HBV 参考基因组。在此基础上构建中国参考 HBV 体外细胞评价模型, 通过考察细胞中 HBV DNA 和细胞上清液中 HBsAg、HBeAg 的表达用来评估系统是否构建成功。通过该细胞模型评估得到最优 siRNA 化合物, 进一步在 HBV 转基因小鼠体内中进行评估。结果 中国 HBV 参考基因组构建的两个细胞模型的 HBV DNA 和乙肝表面抗原(HBsAg)、乙肝 e 抗原(HBeAg)均能正常表达, B2 型表达值分别为 50 585 copies/ μ L、0.55 PEIU/mL、55.88 IU/mL, C2 型表达值分别为 45 302 copies/ μ L、35.31 PEIU/mL、56.9 IU/mL。通过该体外细胞模型评估得到的化合物 BPR2030 以 3 mg/kg 单次皮下注射到 HBV 转基因小鼠体内, 小鼠血清中 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的最大抑制活性相比自身基线分别下调 1.82(log₁₀ IU/mL)、2.55(log₁₀ IU/mL)、0.95(log₁₀ PEIU/mL), 给药后 7~35 d 对 HBV 的抑制活性均显著优于阳性参照物($P < 0.05$)。结论 成功构建了中国 HBV 流行株代表基因型表达的细胞模型, 基于该细胞模型评估后得到的 siRNA 化合物在转基因小鼠体内表现出对 HBV 病毒高效的抑制活性, 表明该细胞模型稳定可靠, 有利于有针对性地开发更适合中国 HBV 患者的基因类药物。

【关键词】 siRNA; 中国 HBV 参考基因组; 细胞模型; B2; C2; 转基因小鼠; HBV DNA; HBsAg; HBeAg

【中图分类号】 R512.6⁺2 **【文献标志码】** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1672-3511.2025.02.010

Establishment of B2 and C2 genotype models of hepatitis B virus epidemic strain in China and evaluating of siRNA compounds

ZOU Keke¹, ZHANG Jing¹, ZANG Chao¹, MING Xin², HUANG Haoxi¹

(1. Nucleic Acid Drug R&D Platform, Chengdu Brilliant Pharmaceutical Co., LTD., Chengdu 610000, China;

2. School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, China)

【Abstract】 Objective In order to evaluate the potential efficacy of siRNA compounds for hepatitis B virus (HBV) infected population in China, a representative cell model for HBV in China was constructed. **Methods** The Chinese HBV reference genome was constructed by selected 1 416 B2 HBV genome sequences and 1 636 C2 HBV genome sequences that were epidemic in China. And on this basis, the cell model of the representative HBV in China was constructed. The expression of cellular HBV DNA and cellular supernatants hepatitis B surface antigen (HBsAg) and Hepatitis e antigen (HBeAg) was used to evaluate whether the system was successfully constructed. The siRNA compounds evaluated by this system were further tested in HBV transgenic mice. **Results** HBV DNA, HBsAg and HBeAg were all expressed normally in the two cell models, and the expression values of B2 type were 50 585 copies/ μ L, 0.55 PEIU/mL and 55.88 IU/mL. And the expression values of type C2 were 45 302 copies/ μ L, 35.31 PEIU/mL and 56.9 IU/mL, respectively. Compound BPR2030, which was evaluated by the B2 and C2 cell model, was injected subcutaneously into HBV transgenic mice with a single dose of 3mg/kg. The maximum expression of HBV DNA, HBsAg and HBeAg in mice serum was

基金项目: 四川省科技计划资助项目(2022JDRC0050); 四川省科技创新苗子工程项目(2021037)

通信作者: 黄浩喜, E-mail: haoxi.huang@btyy.com

引用本文: 邹珂珂, 张静, 臧超, 等. 乙型肝炎病毒中国流行株 B2、C2 基因型模型的人工构建与 siRNA 化合物评估[J]. 西部医学, 2024, 37(2): 212-219. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2025.02.010

decreased by 1.82 (log₁₀ IU/mL), 2.55 (log₁₀ IU/mL) and 0.95 (log₁₀ PEIU/mL) compared with the baseline, and the activity was significantly better than the positive control 7-35 days after dosing ($P < 0.05$). **Conclusion** The Chinese representative HBV expressing cells are successfully constructed, and the siRNA evaluated by the cell model shown high activity against HBV virus in HBV transgenic mice, indicating that the cell model is stable and reliable, and favors more targeted development of gene-based drugs suitable for HBV patients in China.

【Key words】 siRNA; The Chinese HBV reference genome; Screening model in vitro; B2; C2; Transgenic mice; HBV DNA; HBsAg; HBeAg

乙型肝炎病毒(Hepatitis B Virus, HBV)感染可造成慢性肝病和慢性感染,患者继而发生肝硬化和肝癌的风险很高。HBV 病毒聚合酶的自发错误率和缺乏校对活性使得 HBV 病毒有众多亚型和子亚型^[1-4],不同地区流行的主要病毒的亚型和子亚型存在很大差异,自然感染史、临床表现和对抗病毒药物的反应都有差异。B 型和 C 型是中国最主要的 HBV 流行株,其子亚型 B2 和 C2 在中国人群 HBV 相关疾病中的占比>95%^[2,5-6]。

目前大部分体外和体内的 HBV 评估模型都是基于单一 HBV 临床分离株进行构建^[7-10],而已知的 B、C 细胞模型,均为单一病毒株构建,不具有中国患者典型的病毒基因型特征,而且难以在细胞和小鼠体内稳定高表达 HBV。故开发一种针对中国 HBV 患者用于药物临床前系统评估的可靠评估模型,具有重要的意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 构建中国 HBV 流行株

参考 HBV 体外评价模型。

1.1.1 中国 HBV 流行株 B2 和 C2 HBV 参考基因组的构建 从 HBVdb^[11] 序列数据集中分离出 B 型和 C 型基因组序列,按照子亚型基因组间差异>4%^[12-13],用 CD-HIT^[14] 进行基因组 96% 相似性聚类,获取 B2 和 C2 HBV 序列集合。mafft^[15] 软件分别对 1 416 条 B2 HBV 基因组序列集合和 1 636 条 C2 HBV 基因组序列集合分别进行多重比对分析,统计集合中每个基因组座上的碱基分布,将群体中最大概率碱基作为参考碱基。定义一个 R^2 值,表征群体中两个突变点同时发生的概率大于随机组合。 R^2 值定义如下:

$$R^2 = \frac{[P(AB) - P(A)P(B)]^2}{[P(A)(1 - P(A))P(B)[1 - P(B)]}$$

公式中的 P(A)、P(B) 分别表示某个坐标上的碱基 A、B 在群体中出现的频率;P(AB) 代表基因座上两个碱基 AB 同时在一个基因组上连锁共遗传的频率。分母为 0 时不参与讨论,代表 P(A) 或 P(B) 在群体中出现的概率为 100%。当 R^2 等于 0 时,代表两个碱基位点的碱基组合形式完全符合随机组合的模式;当 R^2 等于 1 时代表两个基因座位的碱基组合形式是连锁反

生的。计算基因座上最大概率碱基群体频率≤80% 的点中两两位点之间的 R^2 值。考虑连锁距离(AB 两点碱基坐标距离,Dist)≤100, $R^2 >= 0.3$ 的单点突变位点,按照 AB 连锁遗传出现的整体最优频率组合认定为中国流行 HBV 参考基因组组成。

1.1.2 中国流行株 B2 和 C2 HBV 参考基因组的表达质粒构建 采用 1.3 拷贝的 HBV 基因组插入 pcDNA3.1(+) 对应酶切位点 HindIII/XhoI 中。将环状 HBV DNA 起始坐标位置 EcoR1 酶切位点定义为起始坐标 1,1.3 拷贝 HBV 的起始坐标为 1 031,终止坐标为 1 993 坐标。质粒 B2-pcDNA3.1 和 C2-pcDNA3.1 分别转入大肠杆菌中进行扩增和保存,通过一代测序的方式对插入片段进行测序,质粒的抽提进行了去内毒素处理,涉及到的测序引物为,18T-seq-F: GATGTGCTGCAAGGCGATTAAG,18T-seq-R: CT TTATGCTTCCGCTCGTATG。HBV 参考序列的合成、质粒的插入、测序验证均在六合华大完成;质粒的抽提和去内毒素处理均在南京擎科生物完成。

1.1.3 中国 HBV 流行株参考基因组表达细胞的验证 通过检测质粒转染的 HepG2 细胞表达的 HBV DNA 和 HBsAg、HBeAg 的表达来确认中国参考 HBV 体外评估系统的可用性。阳性参考质粒为插入了 1.3 倍 U95551.1 基因组的 pcDNA3.1(+) 质粒(来自药明康德),待测质粒为 B2-pcDNA3.1 和 C2-pcDNA3.1。主要试剂包括:Lipofectamine™ RNAiMAX 转染试剂(INVITROGEN-13778150)、FastStart Universal Probe Mast (Roche-04914058001)、HBsAg ELISA 试剂盒(安图生物-CL0310)、HBeAg ELISA 试剂盒(安图生物-CL0312)和 96 孔板(Costar-3599)。第 0 天,将质粒分别转染入 HepG2(ATCC number: HB-8065),每个质粒设置 6 复孔,同时设置不转染细胞为空白对照。第 3 天,收集细胞和细胞上清液。细胞 HBV DNA 检测采用 qPCR 方法,HBV 质粒 DNA 作为标准品,检测范围 10~1.0×10⁷ copies/μL。引物序列为,正向引物序列 5-CGTCTGTGCCTTCTCAT CT-3,反向引物序列 5-GTTCACGGTGGTCTCCAT-3,探针序列 5-ACTTCGCTTACCTCTGCACGTC-3,qPCR 特异性引物和探针由上海生工和金维智合

成。HBeAg 及 HBsAg 检测采用 ELISA, 检测范围分别为 0.1~200 PEIU/mL 和 0.05~250 IU/mL。

1.2 待测 siRNA 序列设计 根据 B2、C2 参考基因组序列, 采用步移法设计 siRNA。综合以下阈值挑选入后期细胞实验评估的序列, siRNA 序列信息参考表 6, 序列挑选标准为: ①在全 HBV 基因组保守性中, AS 2-19 区域错配碱基数目 ≤ 1 (错配阈值为 15%)。② AS 2-19 区域与 U95551.1(HepG2.2.15) 和自建 B2、C2 完全反向互补。

1.3 待测 siRNA 在中国 HBV 流行株参考基因组细胞和 HepG2.2.15 细胞中的评价

1.3.1 待测 siRNA 的合成 使用通用型固相合成载体 NittoPhase HL UnyLinker 按照标准固相合成法合成正义链和反义链, 二者按照等摩尔比进行退火, 退火完成的双链样品经冷冻干燥得到 4 个待评估化合物, 和 1 个阳性对照化合物。对应 4 个化合物序列信息参考表 6, 化合物 AS 链 2、6、8、9、14、16 位(5'端第一个碱基坐标为 1)为 2-氟核苷-3-磷酸酯, 其余位置均为 2-O-甲基核苷-磷酸酯; SS 链 5、7、8、9 位为 2-氟核苷-3-磷酸酯, 其余位置均为 2-O-甲基核苷-磷酸酯。

1.3.2 待测 siRNA 在 HepG2.2.15 细胞中的活性评价 将待测 siRNA 与 HepG2.2.15 细胞共转染, 通过检测细胞表达的总 HBV RNA 和 HBsAg、HBeAg, 评估得到高活性的抗 HBV siRNA 化合物。主要试剂和 1.1.3 中所使用的一致, 此外还包括 RNA 提取试剂盒(QIAGEN-74182), FastKing cDNA 第一链合成试剂盒(TianGen-KR116)。第 0 天将 siRNA 转染入 HepG2.2.15 细胞中, 受试化合物和阳性对照 3 个浓度检测点为 1、0.5、0.1 nM, 平行测定 3 复孔, 同时设置 6 孔阴性对照。细胞第 3 天换液。第 6 天取细胞上清液进行 HBsAg、HBeAg 检测, 取细胞进行 HBVRNA 检测。HBV RNA 检测采用 RT-qPCR, 对应引物和探针和 1.1.3 中描述一致, HBV RNA 相对表达量使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, 计算公式如下: $\Delta CT = \text{目的基因平均 Ct 值} - \text{内参基因平均 Ct 值}$; $\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{加药组}) - \Delta CT(\text{control 组})$; mRNA 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta CT}$; % HBV RNA 抑制率 = $(1 - \text{检测样本 HBV RNA 水平} / \text{对照 PBS 的 HBV RNA 水平}) \times 100\%$ 。HBeAg 及 HBsAg 检测采用 ELISA, 检测范围分别为 0.1~200 PEIU/mL 和 0.05~250 IU/mL。

1.3.3 待测 siRNA 在中国 HBV 流行株参考基因组细胞中的活性评价 将待测 siRNA 与 HBV 表达细胞共转染, 通过检测细胞表达的总 HBV RNA 和 HBsAg、HBeAg, 得到对参考基因组有高活性的 siRNA 化合物。主要试剂和 1.3.2 中一致。第 -1 天分别将

B2-pcDNA3.1 和 C2-pcDNA3.1 转染入 HepG2 细胞中构建中国参考 HBV 表达细胞。第 0 天将 siRNA 转染入 HepG2 细胞中, 受试化合物和阳性对照 3 个浓度检测点为 1、0.5、0.1 nM, 平行测定 3 复孔, 同时设置 6 孔阴性对照。细胞第 3 天换液, 第 6 天取细胞上清液进行 HBsAg 检测, 取细胞进行 HBV RNA 检测。HBsAg 和 HBV RNA 的检测方法以及 HBV RNA 的相对表达量计算方法和 1.3.2 中一致。

1.4 HBV 转基因小鼠实验评估

1.4.1 L96-siRNA 化合物合成 合成 1 个受试化合物和 1 个 PC。为实现体内的靶向递送, 受试化合物结构在原来 siRNA 序列的基础上参照文献缀合了肝靶向的 GalNAc 配体 L96^[16]。合成方法如下, 将 L96 与可控微孔玻璃制成预先加载 L96 的固相合成载体。按照标准寡核苷酸固相合成法合成缀合 L96 的寡核苷酸序列(SS 链)。使用通用型固相合成载体 NittoPhase HL UnyLinker 按照标准固相合成法合成反义链(AS 链)。二者按照等摩尔比进行退火, 退火完成的双链样品经冷冻干燥得到 2 个待测化合物。

1.4.2 L96-siRNA 在动物体内的活性评价 合成的 2 个 L96-siRNA 化合物, 经皮下注射到 HBV 转基因小鼠中, 通过检测给药后小鼠血清中 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 含量来评估化合物在体内的活性。HBV 转基因小鼠模型, 来自北京维通达生物技术有限公司的 C57B/6N-Tg(1.28HBV)/Vst 雄性小鼠。主要试剂盒包括圣湘-乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒、迈克-乙型肝炎病毒表面抗原测定试剂盒、迈克-乙型肝炎病毒 e 抗原测定试剂盒。实验方法见下, 所有小鼠根据给药前 14 d 和 7 d 血清中的 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 水平及体重进行分组, 其中对照和样本组各 4 只, 生理盐水组 3 只, 并保证每组 HBsAg 及体重没有统计学差异($P > 0.5$)。第 0 天将化合物溶于生理盐水中以 3 mg/kg 通过皮下注射的方式给药, 阴性对照组注射同等体积的生理盐水。分别在给药后 7、14、21、28、35 d 采集小鼠血清, 进行 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 的检测, 检测方法参考各试剂盒说明书。动物实验在北京维通达生物技术有限公司完成。

1.5 统计学分析 采用 R3.2.2 版本进行统计学分析。表达值均做 log₁₀ 处理后分析。数值表示为均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用配对 Student *t* 单端检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 中国 HBV 流行株参考基因型集合 从 HBVdb 数据库中分离出 B、C 型 HBV 基因组数据, 基因型的

分布情况(见表 1)。通过无监督聚类的方法分离出的 B2/C2 型序列集合, C2 型集合的参考序列来自中国台湾 GenBank 编号为 AY167091^[17], 其它已知的 C2 型如 GenBank 编号为 GQ377617(来自中国)也聚集在此类中^[18]。B2 型集合的参考序列是来自中国上海 GenBank 编号为 KU964282, 其它已知 B2 型如 GenBank 编号为 GU815637(来自中国)也聚集在此类中^[19-20]。B2 型中 1 369 条序列有地域注释信息, 其中 1 227(90%)条序列来自中国。C2 型中 1 388 条序列有注释信息, 其中 1 271(92%)条序列来自中国。获取到有来源注释的 B2、C2 基因组序列集合中来自中国的序列占比 >90%(其中 B2 型集合至少 90%, C2 型集合至少 92%)。

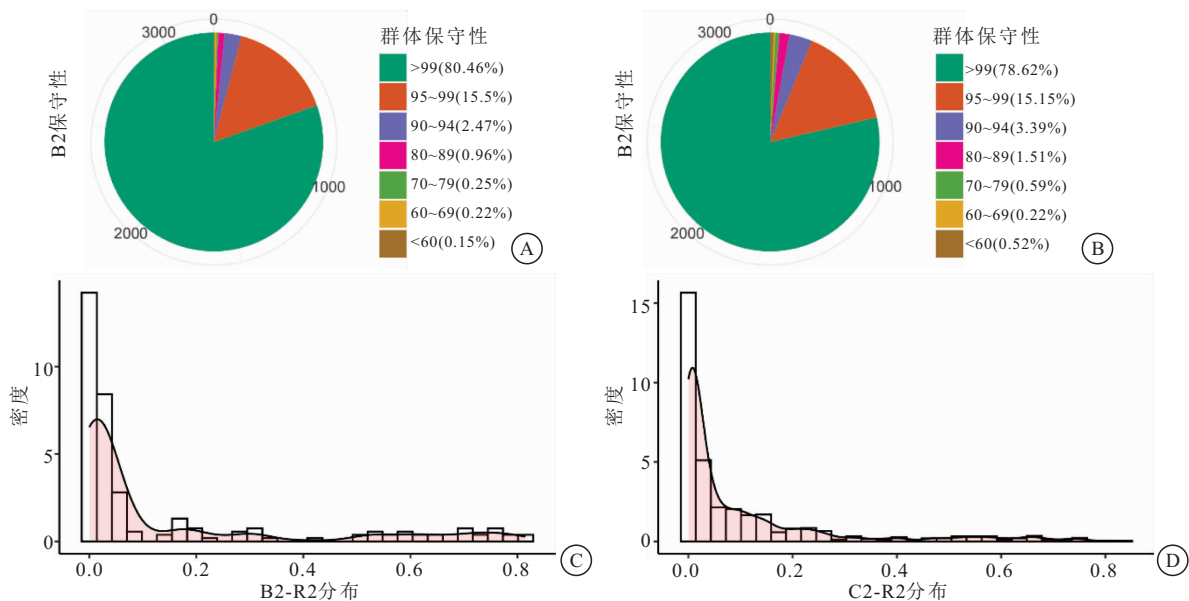
2.2 中国 HBV 流行株 B2、C2 参考基因组的构建分析 B2 和 C2 序列集合多重比对结果, 其每个位点最大概率碱基的群体频率在基因组座上的分布(见图 1A~B)。C2 序列集中对应的基因座上 97.16% 的最大概率碱基位点在群体中的保守性 >90%, 只有 0.52%(17 个)的基因坐标位点保守性低于 60%。B2 序列集中对应的基因座上 98.43% 的主要等位基因位点在群体中的保守性 >90%, 只有 0.15%(5 个)的基因坐标位点保守性低于 60%。连锁遗传的结果表明大部分位点都符合随机遗传的模式(见图 1C~D)。但有个别位点间存在连锁遗传的情况(见表 2、表 3)。考虑到该情况, 根据结果对 C2 最大概率组装序列对应

表 1 HBV 基因型数据分布

Table 1 Distribution of HBV genotype

HBV 基因型	序列数目	序列占比(%)
C	3 070	32.98
B	2 069	22.23
D	1 261	13.55
A	982	10.55
CB 重组型	390	4.19
E	375	4.03
F	303	3.25
DC 重组型	285	3.06
DE 重组型	265	2.85
其它重组型	118	1.23
BC 重组型	114	1.22
G	49	0.53
H	28	0.30

坐标的 6 个点的碱基进行了修改(见表 2), 坐标点以 0 为起始坐标, 对应坐标碱基修改为 1234:C、1781:T、997:G、2220:C、53:T、2724:G。B2 群体虽然存在连锁不平衡的位点, 但 B2 最大概率组装基因型已经符合大概率连锁遗传的模式(见表 3)。两个组装序列去除 Gap 区后, 得到了中国流行株 B2 和 C2 参考 HBV 基因组序列。比较 HBV 常见突变点在中国慢性乙肝患者体内 HBV^[21-23] 中和本研究构建的 B2 和 C2 参考基因组上的一致性, 结果发现本研究构建的参考位点和文献报道的一致, 见表 4。

图 1 B2、C2 基因型集合位点保守性和 R² 分布Figure 1 Distribution of conserved locus of B2 and C2 genotypes and R² value

注: A. HBV B2 基因组序列数据集基因座的最大概率碱基保守性分布结果; B. HBV C2 基因组序列数据集基因座的最大概率碱基保守性分布结果; C. HBV B2 序列集合变异位点 R² 密度图; D. HBV C2 序列集合变异位点 R² 密度图。

表 2 C2 群体连锁遗传位点

Table 2 C2 population linked genetic loci

碱基替换	PA	PB	assembleSite	HPS	PAB	R ²	Dist	HPS_freq(>0.01)
1234:C	0.498	0.533	1222, 1234	TG	0.037	0.837	13	CG: 0.4811, TC: 0.4578, TG: 0.037, AG: 0.0134
1781:T	0.502	0.531	1781, 1783	AA	0.043	0.800	3	TA: 0.4853, AG: 0.4572, AA: 0.0434
1234:C	0.514	0.533	1225, 1234	TG	0.061	0.733	10	AG: 0.4517, TC: 0.4499, TG: 0.0605, GG: 0.0134
-	0.498	0.514	1222, 1225	TT	0.468	0.720	4	CA: 0.4285, TT: 0.4682, CT: 0.0391, TA: 0.0159
997:G	0.507	0.538	919, 997	AA	0.077	0.616	79	GA: 0.4603, AG: 0.4297, GG: 0.0324, AA: 0.077, CA: 0.0006
2220:C	0.515	0.529	2220, 2309	TT	0.081	0.589	90	AC: 0.0018, CT: 0.4468, TC: 0.4181, TT: 0.0813, CC: 0.0257, TA: 0.0134
53:T	0.54	0.494	32, 53	TC	0.076	0.588	22	TT: 0.4615, TC: 0.0758, CC: 0.4181, CT: 0.0281, NN: 0.0116
997:G	0.538	0.564	997, 1057	AA	0.146	0.407	61	AG: 0.3912, GA: 0.4181, AA: 0.1455, GG: 0.044
2724:G	0.386	0.781	2724, 2793	AT	0.178	0.377	70	TT: 0.2304, CT: 0.107, AT: 0.1779, GT: 0.2647, AG: 0.205
-	0.732	0.543	1738, 1746	TG	0.520	0.306	9	TA: 0.2109, TG: 0.5196, GA: 0.2433, GG: 0.0232
1234:C	0.713	0.533	1233, 1234	GG	0.256	0.302	2	GG: 0.2561, GC: 0.456, AG: 0.2726

注: assembleSite 组装型序列 A、B 对应的坐标位点; PA、PB 代表 assembleSite 坐标上的碱基在群体中出现的频率; PAB 代表基因坐上两个碱基 AB 同时在一个基因组上的频率; HPS 代表两位点最大概率碱基组合; Dist 代表 A、B 位点间的距离; HPS-freq 代表所有 A 和 B 坐标上的碱基组合出现的频率; 红色代表修正过后 AB 位点碱基组合; R² 参考材料与方法中的定义; 碱基替换代表最大概率组装基因型改动的位点。

表 3 B2 群体连锁遗传位点

Table 3 B2 population linked genetic loci

碱基替换	PA	PB	assembleSite	HPS	PAB	R ²	Dist	HPS_freq(>0.01)
-	0.629	0.631	2753, 2785	CG	0.605	0.799	33	CG: 0.6052, AT: 0.3418, CA: 0.0113, AG: 0.024
-	0.619	0.629	2713, 2753	GC	0.592	0.748	41	GC: 0.5918, TA: 0.3411, GA: 0.024, TC: 0.0127, AC: 0.0198
-	0.619	0.631	2713, 2785	GG	0.593	0.748	73	GG: 0.5932, TT: 0.3355, GA: 0.0106, AG: 0.0184, GT: 0.0127, TG: 0.0162
-	0.554	0.631	2726, 2785	TG	0.54	0.632	60	TG: 0.5403, CT: 0.346, YG: 0.0014, CG: 0.0763, AG: 0.0113
-	0.554	0.629	2726, 2753	TC	0.537	0.622	28	TC: 0.5374, CA: 0.3538, CC: 0.0763, TA: 0.0148, AC: 0.0113
-	0.619	0.554	2713, 2726	GT	0.525	0.569	14	GT: 0.5247, TC: 0.3404, GY: 0.0014, GC: 0.0791, AC: 0.0085, GA: 0.0113, CC: 0.0035, TT: 0.0134, AT: 0.012
-	0.723	0.659	1848, 1898	AG	0.598	0.329	51	AG: 0.5982, TA: 0.2062, TG: 0.0593, AA: 0.1236
-	0.723	0.792	1848, 1915	AC	0.673	0.306	68	AC: 0.673, TA: 0.1497, TC: 0.1116, AA: 0.048

注: assembleSite 组装型序列 A、B 对应的坐标位点; PA、PB 代表 assembleSite 坐标上的碱基在群体中出现的频率; PAB 代表基因坐上两个碱基 AB 同时在一个基因组上的频率; HPS 代表两位点最大概率碱基组合; Dist 代表 A、B 位点间的距离; HPS-freq 代表所有 A 和 B 坐标上的碱基组合出现的频率; R² 参考材料与方法中的定义; 碱基替换代表最大概率组装基因型改动的位点。

表 4 HBV 常见突变和中国人群 HBV 突变频率及参考序列的比较

Table 4 Information on common HBV mutations and frequency of HBV mutation in Chinese population and reference sequence

HBV 常见突变位点	中国人群 HBV 数据 B C 型群体突变频率	B2	C2
T1753/C/A/G	<50%	T	T
T1754G	<50%	T	T
T1758C	<50%	T	T
A1762T	<50% >50%	A	T
G1764A	<50% >50%	G	A
C1766T	<50%	C	C
T1768A	<50%	T	T
G1862T	<50%	G	G
G1899A	<50%	G	G
A1762T+G1764A	<50% >50%	AG	TA

2.3 B2 和 C2 基因型参考质粒表达 验证本研究将构建的 1.3 个拷贝的 B2 和 C2 基因型质粒系统 B2-pcDNA3.1 和 C2-pcDNA3.1 分别转染进入 HepG2 细胞后,发现转染后的细胞均能检测到 HBV 的重要组分 HBsAg、HBV HBeAg 和 HBV DNA, B2 和 C2

基因型质粒转染的细胞 HBsAg 的表达量显著高于对照组(D-pcDNA3.1)(见表 5)。说明通过我们构建的 B2、C2 基因型质粒不但能成功地转染 HepG2 细胞,并能实现 HBV DNA 的转录和表达。

表 5 对应质粒下 HepG2 中 HBV 相关组分的表达水平

Table 5 Expression levels of HBV-related components of corresponding plasmids in HepG2

质粒	HBV DNA (copies/ μ L)	HBeAg (PEIU/mL)	HBsAg (IU/mL)
B2-pcDNA3.1	50 585	0.55	55.88
C2-pcDNA3.1	45 302	35.31	56.9
D-pcDNA3.1	141 705	38.31	9.71

2.4 待测 siRNA 的序列信息 进行 siRNA 设计的参考序列是来自构建的中国 HBV 参考基因组 B2、C2,根据 siRNA 序列设计规则,选择了 4 条序列进入接下来的实验研究。其中 BPR2030 和 BPR3001 理论靶向 HBV 2.1kb、2.4kb、3.5kb 转录本; BPR3007 和 BPR5001 理论靶向 HBV 2.1kb、2.4kb、3.5kb、

0.7kb。待测序列信息情况,见表 6。

表 6 siRNA 的序列信息

Table 6 Sequence information of siRNA

序列 ID	SS 5->3	AS 5->3
BPR2030	CUUUCUCGCCAGCUUA CAA	UUGUAAGCUGGCGAG AAAGUA
BPR3001	CCUCCUGUUGCUGUAC AAA	UUUGUACAGCAACA AGAGGGA
BPR3007	CCUUGAGGCAUACUUC AAA	UUUGAAGUAUGCCU CAAGGUU
BPR5001	CUGUAGGCAUAAAUUG GUA	UACCAAUUUAUGCC UACAGCG

2.5 待测 siRNA 在 HepG2. 2. 15 细胞的活性评价

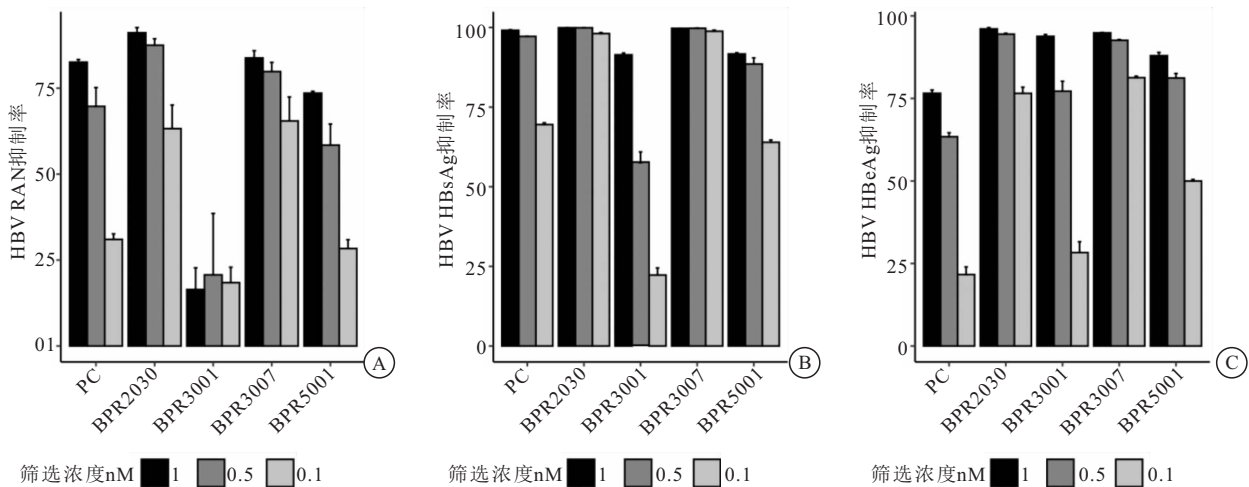


图 2 siRNA 在 HepG2. 2. 15 评价模型中的活性

Figure 2 Inhibition rate of siRNA in HepG2. 2. 15

2.6 待测 siRNA 在中国 HBV 流行株参考 B2、C2 基因组的细胞模型评价 为了进一步获取能抑制中国 HBV 感染人群体内病毒的 siRNA 化合物,本研究利用自建的中国 HBV 流行株参考 B2、C2 基因组的细胞模型进行评估,共合成了 3 对 siRNA 化合物以及一个阳性 siRNA 参照物,阳性参照物同上。本研究评估了 4 对 siRNA 化合物对 B2、C2 HBV 表达细胞中总 HBV RNA 和 HBsAg 的抑制效果。BPR2030 和 BPR3007 在 1/0.5/0.1nM 浓度下对两种细胞中的 HBsAg 和 HBV RNA 的平均抑制水平高于 PC 组(见图 3),而在 B2 型细胞中,BPR2030 在低浓度下表现出比 BPR3007 更高的对总 HBV RNA 和 HBsAg 的抑制活性(31% vs -3%,77% vs 71%)(见图 3A~B)。故认为 BPR2030 对中国流行 HBV 预期会产生更好的抑制效果,后续选择 BPR2030 进行动物体内验证。

2.7 待测 L96-siRNA 在 HBV 转基因小鼠体内活性验证 HBV 转基因小鼠(A 型)动物实验结果显示,给药后 7~35 d 候选化合物 BPR2030 和阳性对照化合物对小鼠血液中 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 均有

明显的抑制活性(对应 P 值分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), (见图 4)。以自身基线数据作为参考,BPR2030 化合物对 HBV DNA 的最大抑制活性出现在给药后第 14 天,为 1.82(log₁₀ IU/mL);对 HBsAg 的最大抑制活性出现在给药后第 14 天,为 2.55(log₁₀ IU/mL);对 HBeAg 的最大抑制活性出现在给药后第 7 天,为 0.95(log₁₀ PEIU/mL)。PC 组 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的最大抑制活性分别出现在第 14 天、第 14 天和第 7 天,为 1.21(log₁₀ IU/mL)、2.34(log₁₀ IU/mL)、0.69(log₁₀ PEIU/mL)。

本研究利用该领域较成熟的 D 型(U95551.1)细胞评价模型 HepG2. 2. 15 对候选序列的活性进行了初步的评估,合成了 4 对待测 siRNA 化合物以及一个阳性 siRNA 参照物(PC),阳性参照物是已在 US11492623B2 中公开的 siRNA 化合物(vir-2218),该阳性参照物已经在中国大陆地区进行治疗慢性乙肝的临床二期试验。BPR2030、BPR3007 候选序列在 1/0.5/0.1 nM 的浓度下对总 HBV RNA、HBsAg、HBeAg 均有 >50% 的抑制效果,BPR5001 在最低浓度 0.1 nM 下对总 HBV RNA 和 HBsAg、HBeAg 的抑制效果均 >25%。见图 2。

明显的抑制活性(对应 P 值分别为 $P < 0.01$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$), (见图 4)。以自身基线数据作为参考,BPR2030 化合物对 HBV DNA 的最大抑制活性出现在给药后第 14 天,为 1.82(log₁₀ IU/mL);对 HBsAg 的最大抑制活性出现在给药后第 14 天,为 2.55(log₁₀ IU/mL);对 HBeAg 的最大抑制活性出现在给药后第 7 天,为 0.95(log₁₀ PEIU/mL)。PC 组 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 的最大抑制活性分别出现在第 14 天、第 14 天和第 7 天,为 1.21(log₁₀ IU/mL)、2.34(log₁₀ IU/mL)、0.69(log₁₀ PEIU/mL)。

3 讨论

本研究采用一种新的方法构建的中国流行性 HBV 表达细胞能有效降低单一临床分离株模型引入的 HBV 罕见变异和测序错误造成 siRNA 药效结果的偏差。该细胞的 HBV DNA、HBsAg、HBeAg 均能正常表达,HBsAg(重点关注指标)表达值甚至高出一个数量级,证明本研究构建的中国 HBV 流行株参考 B2、C2 基因组质粒在细胞中能正常转录、翻译及复制。

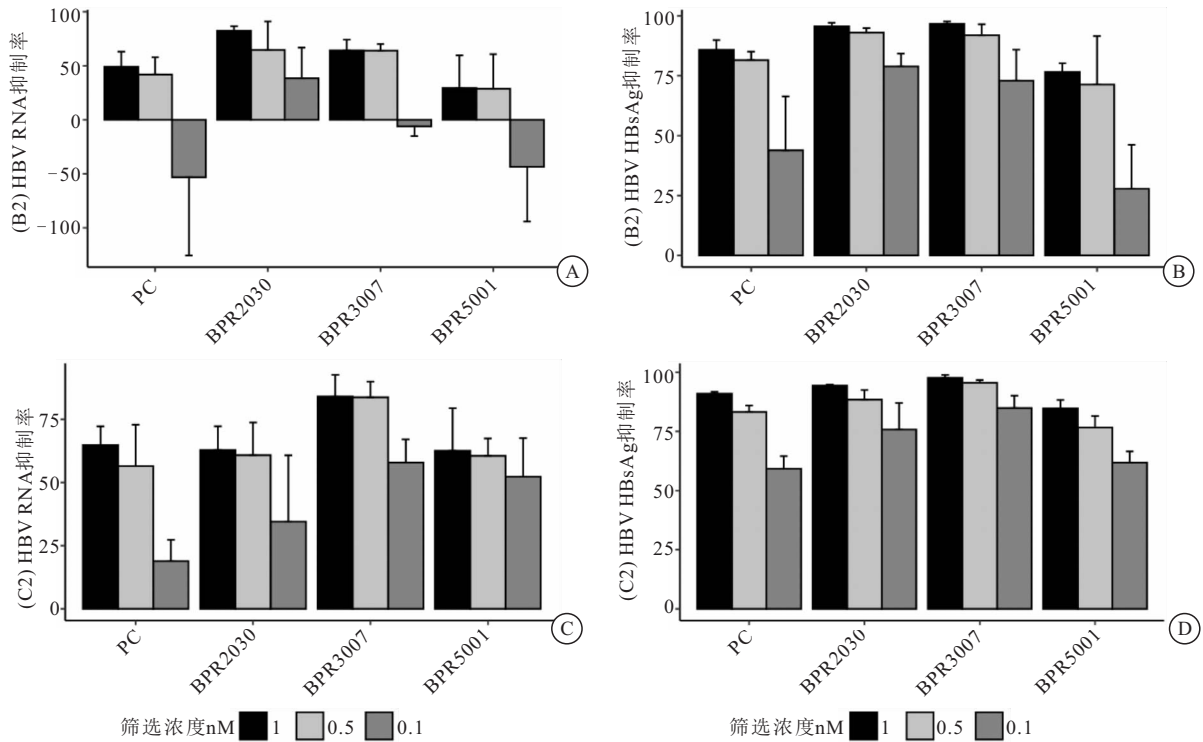


图 3 待测 siRNA 在中国 HBV 流行株参考基因组细胞模型的活性评价

Figure 3 Inhibition rate of siRNA in vitro evaluating model of reference genome of HBV epidemic strains in China

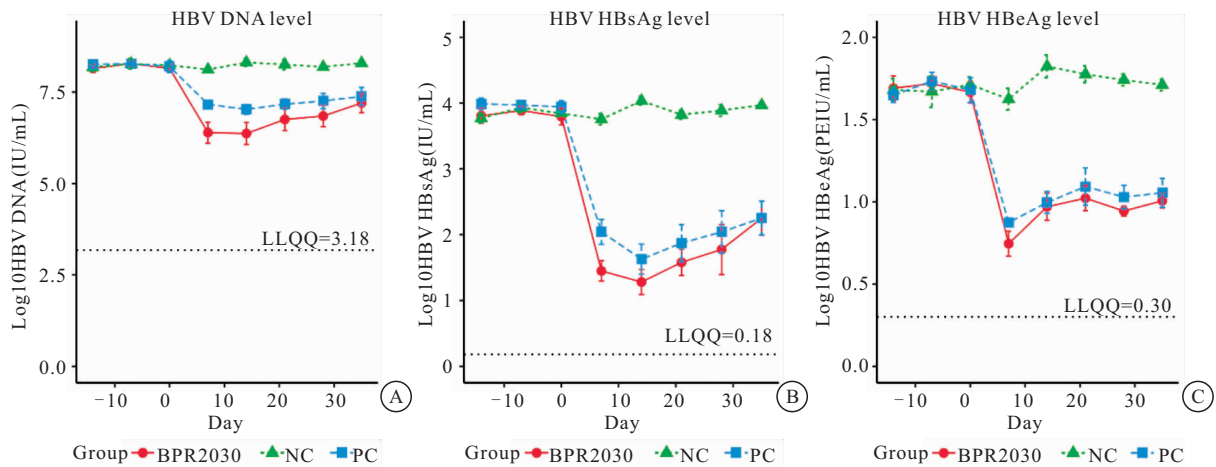


图 4 单次给药的 L96-siRNA 化合物对 HBV 转基因小鼠血清表达病毒相关组分的影响

Figure. 4 Effect of compound administered subcutaneously on serum expression of virus-related components in HBV transgenic mice

注: Log10HBV DNA (IU/mL): 血清中 HBV DNA 的表达水平 (IU/mL) 取 Log10 的值; Log10HBV HBsAg (IU/mL): 血清中 HBsAg 表达水平 (IU/mL) 取 Log10 的值; Log10HBV HBeAg (PEIU/mL): 血清中 HBeAg 表达水平 (PEIU/mL) 取 Log10 的值; Day 代表给药后采血检测的时间, Day ≤ 0 代表给药前检测, 给药时间在第 0 天; A. 化合物对 HBV DNA 表达水平的影响; B. 化合物对 HBV HBsAg 表达的影响; C. 化合物对 HBV HBeAg 表达的影响; PC. 阳性对照组; NC. 阴性对照组; LLOQ. 最低检测下限。

通过中国流行性 HBV 表达细胞的评估, 本团队得到了一条高抑制活性的 siRNA 化合物 BPR2030, 并在 HBV 转基因小鼠动物得到了进一步的体内活性验证。结果表明, 该化合物药效在给药后 35 d 仍保持 1.58(log10 IU/mL) 的 HBsAg 抑制水平。综上, 本团队开发的针对中国 HBV 流行株构建的细胞模型, 能够用于 siRNA 药物的临床前药效评估, 对开发更适合

中国患者的 siRNA 药物, 使更多的中国乙肝患者实现功能性治愈, 具有重要的意义和临床价值。

后续本团队将尝试构建中国 HBV 流行株 B2、C2 基因型的 AAV-HBV 小鼠模型, 进一步丰富 HBV 临床前研究的动物模型, 并增加更多中国 HBV 流行株独立保守的区域设计 siRNA, 提高抗 HBV 药物的开发效率和临床成功率。

4 结论

本研究构建了中国 HBV 流行株 B2、C2 基因型参考序列和相应的 HBV 表达细胞,利用该细胞评估了候选 siRNA 在中国流行 HBV 中的抗病毒预期疗效,选择了活性最佳的化合物进行动物体内抗病毒评价,发现化合物在体内依然能发挥抗病毒功效,且所表现的抗 HBV 活性显著优于正在中国大陆地区进行临床 2 期试验的阳性参考化合物。

【参考文献】

- [1] KRAMVIS A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus[J]. *Intervirology*, 2014, 57(3-4): 141-150.
- [2] LI X, WANG L, ZHONG Y, *et al.* Hepatitis B Virus (HBV) Subgenotypes C2 and B2 Differ in Lamivudine- and Adefovir-Resistance-Associated Mutational Patterns in HBV-Infected Chinese Patients[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2010, 48(12): 4363-4369.
- [3] OGURA N, OGAWA K, WATASHI K, *et al.* Novel stable HBV producing cell line systems for expression and screening antiviral inhibitor of hepatitis B virus in human hepatoma cell line[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 498(1): 64-71.
- [4] KRAMVIS A, KEW M C. Epidemiology of hepatitis B virus in Africa, its genotypes and clinical associations of genotypes[J]. *Hepatol Res*, 2007, 37(s1): S9-S19.
- [5] WANG H Y, LI D, LIU W, *et al.* Hepatitis B virus subgenotype C2 is the most prevalent subgenotype in northeast China [J]. *Clinical Microbiology and Infection*, 2010, 16(5): 477-481.
- [6] CHEN Y M, WU S H, QIU C N, *et al.* Hepatitis B virus subgenotype C2- and B2-associated mutation patterns may be responsible for liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, respectively[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46(7): 614-622.
- [7] SUREAU C, ROMET-LEMONNE J L, MULLINS J I, *et al.* Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA [J]. *Cell*, 1986, 47(1): 37-47.
- [8] SUN S, LI Y, LIU B, *et al.* Establishment of stable cell lines in which the HBV genome replicates episomally for evaluation of antivirals[J]. *Arch Med Sci*, 2018, 16(2): 407-413.
- [9] JIANG S, WANG X, CHEN K, *et al.* Establishment of an inducible cell line for Hepatitis B virus genotype C2 and its pharmacological responses to interferons[J]. *Pharmacological Research*, 2022, 178: 106142.
- [10] LU Y P, WANG B J, DONG J H, *et al.* Construction and Characterization of a Hepatitis B Virus Replicon[J]. *Virologica Sinica*, 2007, 22(1): 8-13.
- [11] HAYER J, JADEAU F, DELÉAGE G, *et al.* HBVdb: a knowledge database for Hepatitis B Virus[J]. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41(Database issue): 566-570.
- [12] 张振华,张玲,陆蒙吉,等. 中国乙型肝炎病毒 B、C 基因型参照序列的建立[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(12): 891-895.
- [13] KRAMVIS A, KEW M, FRANÇOIS G. Hepatitis B virus genotypes[J]. *Vaccine*, 2005, 23(19): 2409-2423.
- [14] FU L, NIU B, ZHU Z, *et al.* CD-HIT: accelerated for clustering the next-generation sequencing data [J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(23): 3150-3152.
- [15] KATOH K, MISAWA K, KUMA K, *et al.* MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform[J]. *Nucleic Acids Research*, 2002, 30(14): 3059-3066.
- [16] RAJEEV K G, NAIR J K, JAYARAMAN M, *et al.* Hepatocyte-specific delivery of siRNAs conjugated to novel non-nucleosidic trivalent N-acetylgalactosamine elicits robust gene silencing in vivo[J]. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 2015, 16(6): 903-908.
- [17] YIN Y, HE K, WU B, *et al.* A systematic genotype and subgenotype re-ranking of hepatitis B virus under a novel classification standard[J]. *Heliyon*, 2019, 5(10): e02556.
- [18] BERTOLETTI A, FERRARI C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection[J]. *Gut*, 2012, 61(12): 1754-1764.
- [19] MCNAUGHTON A L, DARIENZO V, ANSARI M A, *et al.* Insights From Deep Sequencing of the HBV Genome—Unique, Tiny, and Misunderstood[J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2): 384-399.
- [20] MCNAUGHTON A L, REVILL P A, LITTLEJOHN M, *et al.* Analysis of genomic-length HBV sequences to determine genotype and subgenotype reference sequences[J]. *The Journal of General Virology*, 2020, 101(3): 271-283.
- [21] LI X, WANG L, LIU Y, *et al.* Characterization of hepatitis B virus genotypes/subgenotypes in 1301 patients with chronic hepatitis B in North China[J]. *Chin Med J*, 2011, 124(24): 4178-4183.
- [22] XU Z, REN X, LIU Y, *et al.* Association of hepatitis B virus mutations in basal core promoter and precore regions with severity of liver disease: an investigation of 793 Chinese patients with mild and severe chronic hepatitis B and acute-on-chronic liver failure[J]. *Journal of Gastroenterology*, 2011, 46(3): 391-400.
- [23] CHEN Y, YU D, ZHANG W, *et al.* HBV Subgenotype C2 Infection, A1762T/G1764A Mutations May Contribute To Hepatocellular Carcinoma with Cirrhosis in Southeast China[J]. *Iranian Journal of Public Health*, 2012, 41(11): 10-18.

(收稿日期: 2023-11-08; 修回日期: 2024-11-20; 编辑: 王小菊)