JOURNAL OF HEPATOLOGY

Новые противовирусные мишени для инновационных методов лечения гепатитов B и D

David Durantel[1,2,3,†], Fabien Zoulim[1,2,3,4,5,*,†]

Реферат

Современные возможности лечения хронического гепатита B по-прежнему ограничиваются пегилированным интерфероном-α (PegIFN-α) и пятью одобренными нуклеоз(т)идными аналогами (НА). Подавления вируса можно достичь у большинства пациентов с помощью НА нового поколения с высоким барьером к развитию устойчивости, например энтекавира и тенофовира, тогда как элиминация HBsAg достигается назначением PegIFN-α и/или НА только у 10 % пациентов за 5 лет наблюдения. Попытки усилить ответ путем использования двух различных НА или сочетания НА и PegIFN-α не дали заметного повышения частоты функционального излечения. Это пробудило интерес к изучению различных этапов репликативного цикла вируса гепатита B (HBV), а также специфических взаимодействий между вирусом и клетками хозяина, чтобы выявить новые мишени и разработать новые противовирусные средства. К ним относятся прямое подавление репликации вируса ингибиторами проникновения в клетку, препараты, направленные против ковалентно замкнутой кольцевой ДНК, короткие интерферирующие РНК, направленные против вирусных транскриптов, модуляторы сборки капсида, секреции белков оболочки вируса. Дополнительным подходом служит восстановление иммунного ответа. Восстановление неспецифического иммунного ответа против HBV можно достичь с помощью агонистов TLR или введения специфических противовирусных цитокинов. Восстановление специфического иммунного ответа достигается ингибиторами негативных регуляторов контрольных точек, терапевтическими вакцинами или аутологичным переносом генно-инженерных HBV-специфичных Т-лимфоцитов. Новые мишени и препараты в ближайшее время будут оценены с использованием подходящих и новых моделей гепатита B *in vitro* и *in vivo*. Добавление одного или нескольких новых препаратов к современной терапии должно дать значительное улучшение ответа на лечение и повышение частоты функционального излечения. Это уменьшит риск устойчивости к противовирусным средствам и снизит заболеваемость циррозом и гепатоцеллюлярным раком.
© 2016 European Association for the Study of the Liver.

Ключевые слова: вирус гепатита B, вирусные мишени, противовирусные препараты прямого действия, противовирусные препараты непрямого действия, иммунотерапия.

Получено 17 декабря 2015 г.; получено с поправками 6 февраля 2016 г.; принято в печать 8 февраля 2016 г.

[1] *INSERM, U1052, Lyon 69003, France*
[2] *Cancer Research Center of Lyon (CRCL), Lyon 69008, France*
[3] *University of Lyon, UMR_S1052, UCBL, 69008 Lyon, France*
[4] *Hospices Civils de Lyon (HCL), 69002 Lyon, France*
[5] *Institut Universitaire de France (IUF), 75005 Paris, France*

[†] Вклад этих авторов равноценен.

[*] Автор, ответственный за переписку. Адрес: Centre de Recherche en Cancerologie de Lyon (CRCL), UMR INSERM U1052 – CNRS 5286, 151 cours Albert Thomas, 69424 Lyon Cedex 03, France. Tel.: +33 4 72 68 19 70; fax: +33 4 72 68 19 71. *E-mail:* fabien.zoulim@inserm.fr (F. Zoulim).

Сокращения: CpAM — аллостерические модуляторы HBc; HBc — ядерный белок HBV; HBeAg — e-антиген вируса гепатита B; HBpol — полимераза HBV; HBsAg — поверхностный антиген вируса гепатита B; HBV — вирус гепатита B; HDV — вирус гепатита D; hNTCP — человеческий натрий-таурохолат-котранспортный полипептид; IFN — интерферон; IL — интерлейкин; NAP — полимер нуклеиновой кислоты; PD-L1 — лиганд 1 программируемой гибели; PegIFN — пегилированный интерферон; PRR — рецептор, распознающий патоген; T-reg — регуляторные Т-лимфоциты; TAF — тенофовира алафенамида фумарат; TCR — рецептор Т-лимфоцитов; TDF — тенофовир; TGF — трансформирующий фактор роста; TLR — toll-подобный рецептор; TNF — фактор некроза опухолей; WHV — вирус гепатита лесных сурков; ГЦР — гепатоцеллюлярный рак; кзкДНК — ковалентно замкнутая кольцевая ДНК;

Введение

Хронический гепатит B (ХГВ) остается серьезной проблемой здравоохранения во всем мире. Несмотря на наличие эффективной вакцины, охват вакцинацией в эндемичных регионах по-прежнему неудовлетворителен. В настоящее время в мире насчитывается 250 млн хронических носителей вируса (по данным ВОЗ, информационный бюллетень № 204); у всех у них высокий риск развития гепатоцеллюлярного рака (ГЦР) [2, 3]. Действительно, ХГВ — основная причина ГЦР во всем мире, а ГЦР занимает 3-е место в структуре онкологической смертности. В настоящее время существует два основных класса противовирусных средств, одобренных для лечения ХГВ. Первый — пегилированный интерферон-α (PegIFN-α), назначаемый п/к в течение 48 нед. Он подавляет вирус примерно у 25 % пациентов, но дает при этом нежелательные явления [4, 5]. Второй — нуклеоз(т)идные аналоги (НА). Их назначение оказывает более сильное подавляющее действие на вирус у большинства пациентов при выборе препаратов с высокой противовирусной активностью и барьером к устойчивости, например тенофовира или энтекавира [4, 5]. Устойчивость к противовирусным средствам

киРНК — короткие интерферирующие РНК; НА — нуклеоз(т)идные аналоги; пгРНК — прегеномная РНК; ППВД — противовирусные препараты прямого действия; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ркДНК — рыхлая кольцевая ДНК; ХГВ — хронический гепатит В; ХГD — хронический гепатит D.

остается важным вопросом во многих высокоэндемичных странах из-за текущего или предшествующего применения менее дорогих препаратов с низким барьером к устойчивости, которые способствовали отбору устойчивых штаммов. Необходимость длительного назначения НА также является проблемой здравоохранения в этих странах. Профиль безопасности НА в целом отличный, что позволяет назначать их на длительный срок, предотвращая тем самым возобновление репродукции вируса и рецидив поражения печени. В нескольких когортных исследованиях показано, что противовирусная терапия на основе интерферона (IFN) или НА связана со снижением риска ГЦР, но не с полным его устранением. Из-за неоднородности когорт по длительности инфекции, тяжести заболевания и продолжительности лечения в этих исследованиях неясно, какая группа пациентов имеет наибольшие преимущества от такого лечения. Основной клинический признак благоприятного исхода — элиминация из сыворотки малого антигена оболочки вируса (поверхностного антигена вируса гепатита В — HBsAg), что позволяет прервать терапию и связано со снижением риска развития ГЦР, особенно у молодых людей. К сожалению, по данным длительного наблюдения пациентов, современная терапия позволяет достичь элиминации HBsAg всего в 10 % случаев [4, 5].

В целях улучшения лечения этой смертельной инфекции важно разрабатывать новые противовирусные стратегии, дающие больше, чем подавление вируса, т. е. функциональное излечение. Это будет способствовать проведению противовирусной терапии за конечный период времени, потенциальному снижению ее стоимости, повышению доступности препаратов для населения высокоэндемичных регионов и влиять на развитие ГЦР.

Вирус гепатита В (HBV) — нецитопатический ДНК-вирус, принадлежащий семейству *Hepadnaviridae* [7]. Персистенция вируса обеспечивается ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК), локализующейся в ядре пораженных гепатоцитов. кзкДНК связывается с гистонами, образуя вирусную мини-хромосому, и служит шаблоном для транскрипции всей РНК вируса, включая прегеномную РНК (пгРНК) [8]. пгРНК упаковывается и подвергается обратной транскрипции в нуклеокапсидах, которые впоследствии используются для формирования вирионов или возвращаются в ядро для пополнения запасов кзкДНК [7, 8]. Патобиология инфекции в основном задействует иммунные ответы хозяина, необходимые для контроля репродукции вируса. HBV выработал механизмы ускользания от специфического и неспецифического иммунного ответа для развития персистирующей инфекции [9]. Это важно учитывать при разработке более эффективного лечения, которое помешает иммунному ускользанию.

На основе имеющихся знаний научным сообществом сформулированы следующие определения для «излечения гепатита В» (рис. 1) [10].

1. *Функциональное излечение* (эквивалент выздоровления после острой инфекции): элиминация HBsAg с появлением антител к нему или без нее, неопределяемая вирусная ДНК в сыворотке, но персистенция кзкДНК, которая транскрипционно неактивна, что позволяет прекратить лечение. Это предполагает, что оставшиеся инфицированные клетки контролируются противовирусным иммунитетом хозяина. Достижение высокой частоты элиминации HBsAg стало основной целью в клинических исследованиях.
2. *Полное излечение* (то же, что и функциональное излечение, но с элиминацией кзкДНК).

Следует заметить, что даже при достижении функционального или полного излечения персистенция интегрированных в геном хозяина вирусных последовательностей и молекулярное повреждение инфицированных гепатоцитов могут представлять проблему для более полной профилактики вызванного HBV ГЦР, что потребует оценки в будущих трансляционных исследованиях.

В последние несколько лет сделаны большие успехи в изучении ключевых этапов вирусного цикла (рис. 2) и взаимодействия вируса с иммунной системой. Сюда относятся идентификация клеточного рецептора для проникновения вируса, определение ключевых ядерных ферментов, задействованных в синтезе кзкДНК, открытие частичного разрушения кзкДНК под действием интерферонового или NF-κB сигнальных путей, а также более глубокое понимание механизмов снижения числа HBV-специфичных Т-лимфоцитов. Для изучения репродукции HBV и патобиологии в соответствующих системах культур гепатоцитов *in vitro* и опытах на животных были разработаны усовершенствованные экспериментальные модели.

Важно, что около 15–20 млн HBV-позитивных пациентов во всем мире также инфицированы вирусом гепатита D (HDV) [11]. Хронический гепатит D (ХГD) как одна из самых тяжелых форм вирусного гепатита известен тем, что ускоряет прогрессирование ХГВ до цирроза и развитие его осложнений. Тем не менее гепатит D до сих пор считается орфанной болезнью. Единственный препарат, эффективный против ХГD — это PegIFN-α, но и он помогает только в 20–35 % случаев [12]. Поэтому необходимы усилия, направленные на разработку средств, которые облегчат лечение ХГD [13, 14]. Исследования и поиск

Ключевой момент

Хроническое течение гепатита В обеспечивается главным образом персистированием вирусной кзкДНК и дефектными иммунными ответами.

Ключевой момент

Новые противовирусные средства необходимы для увеличения частоты функционального излечения инфекции, допуская тем самым лечение с заранее предопределенными сроками и ожидаемое преимущество в плане предупреждения осложнений со стороны печени.

Ключевой момент

Противовирусные препараты прямого действия, направленные на различные этапы жизненного цикла вируса, т. е. его проникновение в клетку, кзкДНК, транскрипцию, HBx, сборку и выход из клетки, находятся в стадии разработки.

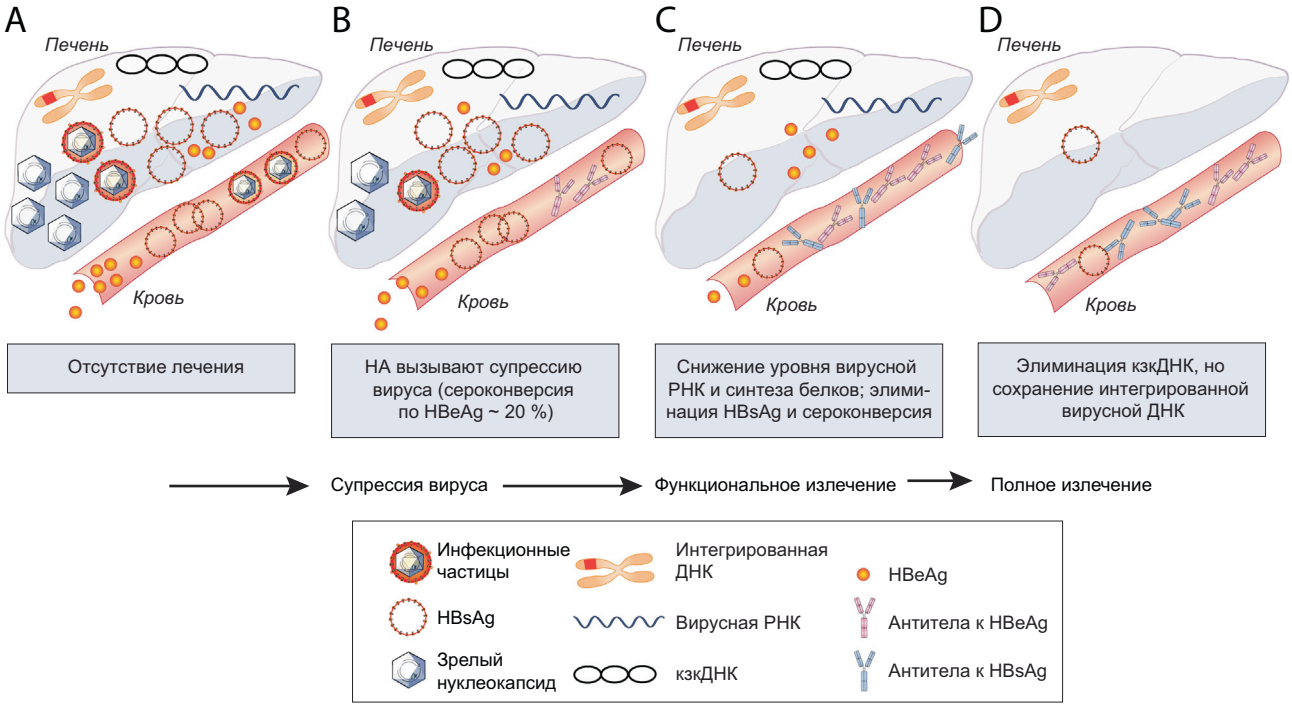

Рис. 1. Схематическое изображение разных видов излечения. В отсутствие лечения у HBeAg-позитивных пациентов все вирусологические показатели определяются в ткани печени и крови (*A*). При лечении НА все частицы, содержащие ДНК, почти полностью выводятся из кровотока, в печени их количество заметно уменьшается; это соответствует супрессии вируса. При этом сероконверсия от HBeAg к антителам к нему — редкое явление (*B*). Снижение уровня HBsAg специфическими средствами или снижение внутриклеточной вирусной РНК и синтеза белков могут приводить к функциональному излечению (*C*). О полном излечении речь идет, когда достигнута эрадикация кзкДНК (*D*).

средств излечения гепатита В могут также повысить эффективность лечения ХГD.

В настоящем обзоре мы рассматриваем исследовательские и первые клинические попытки изучения противовирусных мишеней, которые оцениваются для разработки инновационных методов лечения ХГВ и ХГD.

Противовирусные препараты прямого действия

Разработчики препаратов в целом более склонны к созданию противовирусных препаратов прямого действия (ППД), подавляющих активность вирусных ферментов и белков (см. рис. 2), т. к. эти препараты дают меньше побочных эффектов. И наоборот, препараты, направленные на функции клеток хозяина, задействованных в жизненном цикле вируса, могут дать больше неблагоприятных эффектов. В отношении HBV успех имела пока только разработка препарата против полимеразы HBV (HBpol). HBpol — мультидоменный белок, состоящий из субдоменов терминального белка, спейсера, обратной транскриптазы и РНКазы H [7]. На сегодня разработаны только препараты, влияющие на активность обратной транскриптазы (т. е. прайминг и полимеризацию) [15]. Особенность синтеза геномной ДНК HBV (рыхлой кольцевой ДНК [ркДНК]) из пгРНК — его прочная связь с процессом капсидирования [7]. Таким образом, подавление образования капсида может дополнить подавление полимеразы. Кроме того, ингибиторы РНКазы H могут также использоваться для разработки комбинированных подходов, направленных на этот этап жизненного цикла вируса [16].

Подавление обратной транскрипции в вирусном нуклеокапсиде

Предшественники ингибиторов полимеразы HBV и других полимераз

Тенофовира алафенамида фумарат (TAF) — нуклеотидный ингибитор обратной транскриптазы и новый предшественник тенофовира (TDF). В настоящее время он находится в стадии разработки для использования в лечении хронических инфекций, вызванных ВИЧ и HBV. Показано, что TAF обладает высокой биодоступностью, стабилен в плазме и подходит для эффективной доставки его активной формы (TDF-дифосфата) в гепатоциты и лимфоидную ткань, позволяя снизить используемые дозы TDF и уменьшить его системное воздействие. В клинических исследованиях IB фазы не наблюдалось различий в вирусной нагрузке после назначения 8–120 мг TAF, а уровень подавления вируса через 4 нед.

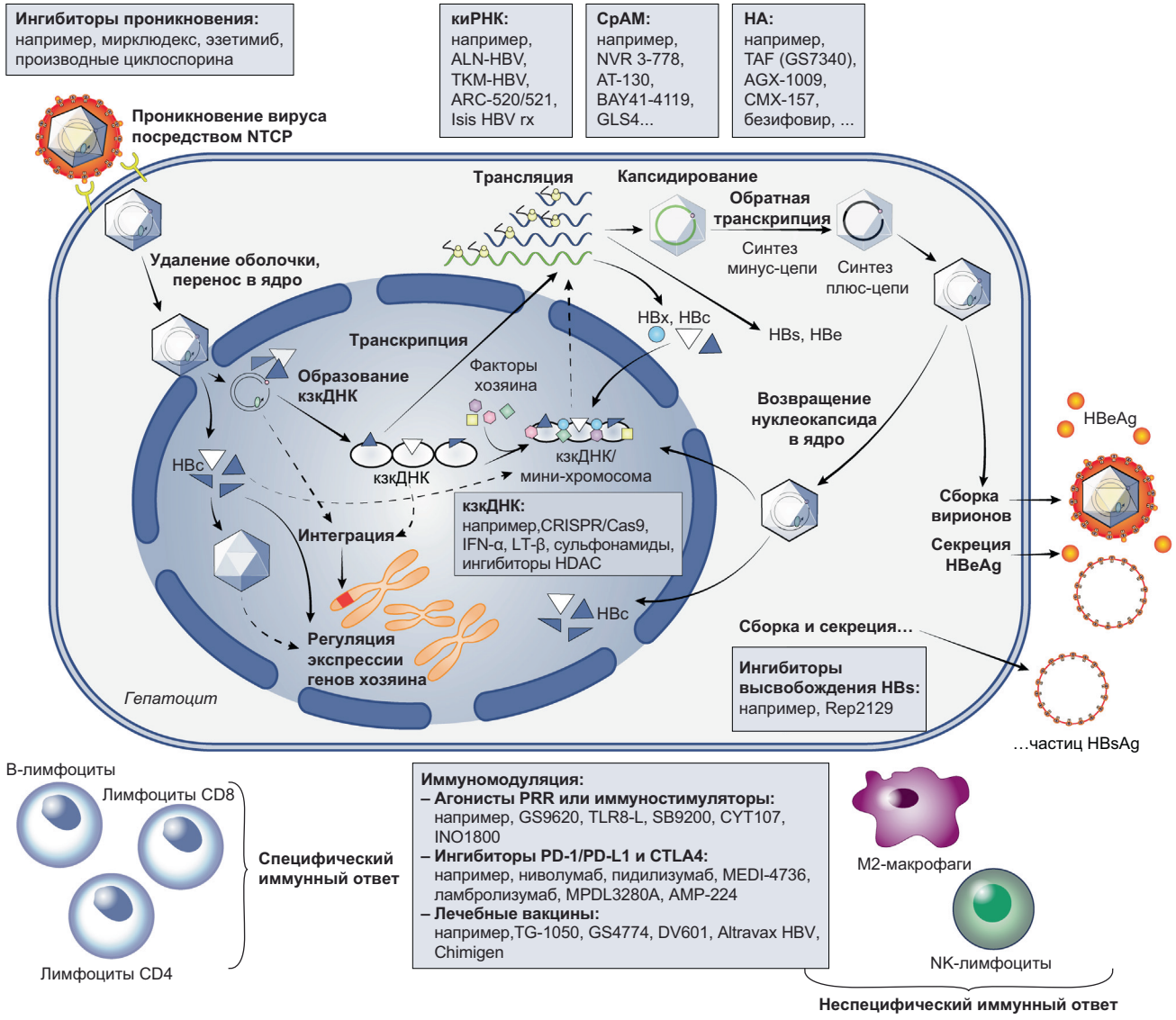

Рис. 2. Жизненный цикл HBV и основные классы противовирусных средств, находящихся в разработке
CTLA4 — белок 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами; HDAC — деацетилаза гистонов; LT — лимфотоксин; PD-L1 — лиганд 1 программируемой гибели.

был аналогичен таковому TDF (clinicaltrials.gov, исследование № NCT01671787). Кроме того, у этого препарата лучше профиль безопасности при длительном применении, в частности, в отношении нефротоксичности. В настоящее время он оценивается в клинических исследованиях III фазы (NCT01940471 и NCT01940341). В разработке также находятся и другие предшественники TDF (табл. 1).

Несмотря на доступность такого мощного НА, разработка препаратов может быть улучшена, если удастся создать ингибиторы полимеразы, которые действуют не только на РНК- и ДНК-зависимый синтез ДНК, но и на прайминг обратной транскрипции, чтобы максимально повысить влияние на пополнение запасов кзкДНК [15].

Найдется ли место для ингибиторов РНКазы H?

Активность РНКазы H необходима для репродукции вируса, но до сих пор она не рассматривалась в качестве мишени для препаратов [16]. Недавний анализ веществ с активностью против РНКазы H ВИЧ выявил относящиеся к трем разным химическим семействам ингибиторы РНКазы H HBV, блокирующие репродукцию HBV [18]. Таким образом, эти ингибиторы — интересные кандидаты для создания препаратов против HBV, которые смогут использоваться в сочетании с существующими или разрабатываемыми средствами. Профиль безопасности ингибиторов РНКазы H требует тщательной оценки, прежде чем их разработка будет продолжена.

Таблица 1. Обзор клинических исследований и их стратегий по лечению гепатита B

	Мишень	Препарат	Разработчик	Стадия разработки	ClinicalTrials.gov №
ПППД	HBpol	GS-7340; тенофовира алафенамида (предшественник тенофовира)	Gilead	III фаза	NCT01940471 и NCT01940341
	HBpol	AGX-1009 (препарат-предшественник)	Agenix	III фаза (?)	Не найден
	HBpol	Безифовир	IIDong Pharmaceutical	III фаза	NCT01937806
	HBpol	CMX-157 (липидный ациклический нуклеозидный фосфонат)	Contravir	I фаза	NCT02585440
	HBc	GLS-4 (морфотиадин мезилат)	HEC Pharm/SUnshine	II фаза	China-CFDA
	HBc	NVR 3-778	Novira Pharmaceuticals	I фаза	NCT02112799 и NCT02401737
	HBs	REP-2139 (полимер нуклеиновой кислоты)	Replicor	II фаза для HBV и HDV	NCT02565719 и NCT02233075
	Вирусные РНК	киРНК: ARC-520/ARC-521	Arrowhead	II фаза	NCT02604212 и NCT02604199
	Вирусные РНК	киРНК: ISIS-HBVRx	Ionis pharmaceuticals	I или II фаза (?)	Не найден
ППНД	NTCP	Мирклюдекс	Hepatera и MYR GmbH	II фаза для HBV и HDV	Разработка в России
	Индукция апоптоза инфицированных клеток	Биринапант	Tetralogic	I фаза	NCT02288208
	Пренилирование/фарнезилирование	Лорафарниб	Eiger BioPharmaceuticals	II фаза для HDV	NCT02430181, NCT02430194, NCT02511431
	Стимуляция иммунитета	Тимозин α	Больница Национального университета Сеула	IV фаза	NCT00291616
	Стимуляция клеток pDC	GS-9620 (агонист TLR7)	Gilead	II фаза	NCT02166047 и NCT02579382
	Стимуляция иммунитета	INO-1800	Inovio Pharmaceuticals	I фаза	NCT02431312
	Стимуляция иммунитета	Cyt-107 (IL-7)	Cythesis	I–II фаза (остановлено)	NCT0027065
	Стимуляция иммунитета	Интерферон-λ	BMS	II фаза (остановлено)	NCT01204762
	Специфический ответ	ABX-203	Abivax	II–III фаза	NCT02249988
	Специфический ответ	GS-4774 (терапевтическая вакцина)	Gilead	II фаза	NCT01943799 и NCT02174276
	Специфический ответ	TG-1050 (терапевтическая вакцина)	Transgene	I фаза	NCT02428400
	Специфический ответ	DV-601 (терапевтическая вакцина)	Dynavax	I фаза	NCT01023230
	Специфический ответ	HB-110	Genexine	I фаза	NCT01641536
	Специфический ответ	Ниволумаб (моноклональные антитела к PD-1)	Ono Pharmaceuticals/ BMS	I–II фаза для ГЦР	NCT01658878

ППНД — противовирусные препараты непрямого действия.

Ядерные аллостерические модуляторы

В последнее время в поле зрения исследователей вновь попал ядерный белок HBV (HBc, или Cp) в качестве перспективной прямой противовирусной мишени. Действительно, этот многофункциональный белок играет роль в процессе капсидирования в цитоплазме [7], а также регулирует экспрессию кзкДНК и генов хозяина в ядре инфицированных клеток [19–21]. Предыдущие исследования установили, что HBc может локализоваться в ядре инфицированных гепатоцитов в образцах ткани печени, полученных у пациентов с хронической инфекцией (см., например, [22]). Эти наблюдения были подтверждены *in vitro*, когда было показано, что HBc может связываться с кзкДНК [20, 23] и с генами хозяина, включая гены, задействованные в неспецифическом иммунном ответе [19]. Сообщается, что после связывания он модулирует экспрессию генов путем привлечения метилтрансфераз гистонов (например, EZH2), отвечающих за модуляцию репрессивных эпигенетических меток (например, H3K27me3) [19]. Поэтому ингибиторы капсида или аллостерические модуляторы HBc (CpAM) могут выполнять несколько функций, кроме классического подавления сборки нуклеокапсида в цитоплазме [23].

Зная трехмерную структуру HBc [24], специалисты разработали несколько классов ненуклеозидных мелких молекул, среди которых фенилпропенамиды (например, AT-130; [25]) и гетероарилдигидропиримидины (например, BAY41-4109; [26]). Эти молекулы подавляют капсидирование пгРНК, что ведет к остановке синтеза вирусной ркДНК, т. к. обратная транскрипция пгРНК происходит только в капсидах [27]. Интересно, что эти CpAM могут подавлять репродукцию мутантных форм HBV, устойчивых к НА [28–30], и с меньшей вероятностью вызывают развитие специфической устойчивости за счет естественного давления, связанного со сборкой капсида.

В настоящее время на ранней стадии разработки находятся три СрАМ: BAY41-4109 (Bayer; разработка приостановлена), NVR 3-778 (NCT02112799; Novira Therapeutics) и GLS-4 (исследование China-CFDA; морфотиадин мезилат, HEC Pharm) (см. табл. 1), в то время как несколько других уже проходят доклинические и вскоре должны войти в клинические исследования [27].

Нужно ли полностью подавлять синтез вирусной ДНК?

кзкДНК изначально образуется в гепатоцитах из ркДНК, содержащейся в вирусах либо при проникновении в клетку, либо при персистирующей инфекции. Пополнение кзкДНК происходит путем возвращения нуклеокапсидов в ядро инфицированных клеток.

В то время как показано, что НА успешно снижают вирусную нагрузку, они не предотвращают образование кзкДНК из привходящих вирионов. К сожалению, отсутствие полного подавления вируса может привести к остаточной виремии с уровнем ниже порога определения современных наборов для полимеразной цепной реакции (ПЦР), что, в свою очередь, может вызывать инфицирование новых гепатоцитов и формирование новых запасов кзкДНК. Неполным подавлением синтеза вирусной ДНК может также объясняться продолжающееся пополнение устойчивой кзкДНК внутри инфицированной клетки.

В нескольких недавних клинических исследованиях были показаны: 1) персистенция ДНК HBV в сыворотке (выявляется чувствительными наборами для качественной ПЦР при отрицательном результате количественных методов); 2) внутрипеченочный синтез ДНК HBV после длительного применения TDF (Boyd et al. J. Hepatol., готовится к печати).

Вместе взятые эти наблюдения подкрепляют необходимость совершенствования методов лечения, подавляющих репликацию вирусного генома в инфицированных гепатоцитах. Этого можно достичь либо путем усиления противовирусной активности НА, либо сочетанием НА с другими препаратами, подавляющими репродукцию вируса, например ингибиторами РНКазы Н, СрАМ или другими ПППД.

Воздействие на экспрессию вирусных белков и их функции

Вопрос разработки препаратов, направленных против репродукции вируса, по сути заключается в отсутствии влияния на кзкДНК, когда белки HBV продолжают синтезироваться и проявлять свои патогенные и/или иммунопатогенные свойства. Сюда относится секреция антигенов HBV (например, HBsAg и HBeAg) в кровь, что, по-видимому, играет решающую роль в ускользании от иммунного ответа [9], или экспрессия HBx, который, как показано, необходим для инициации инфекции [32] и вклада в онкогенные события [33]. Полное и одновременное подавление синтеза всех вирусных белков может представлять мощную лечебную стратегию. Для этого нужно сосредоточиться на разработке терапии, направленной против транскриптов HBV с общим 3'-концом, возможно, за счет подавления РНК.

Подавление РНК

Использование подавления РНК для остановки репродукции HBV интенсивно проводилось *in vitro*, было валидизировано в экспериментах на животных и является темой недавнего полного обзора [34]. Доставка HBV-специфичных коротких интерферирующих РНК (киРНК) в инфицированные гепатоциты *in vivo* было главной задачей этих исследований. Действительно, киРНК — мелкие двухцепочечные олигорибонуклеотиды с гидрофильными свойствами и отрицательным зарядом, поэтому их сложно доставить в цитозоль, где находится индуцируемый РНК выключающий комплекс. В настоящее время для доставки киРНК к гепатоцитам *in vivo* используются различные методики и средства [34]: 1) катионные/нейтрально-липидные наночастицы нуклеиновой кислоты; 2) конъюгация с химическим соединением, способным взаимодействовать с данным рецептором гепатоцита (т. е. N-ацетилгалактозамином в качестве лиганда асиалогликопротеидного рецептора); 3) динамические поликонъюгаты, когда киРНК соединяют с холестерином и вводят вместе с гепатотропным пептидом, проникающим в клетки [34]. На основе этих технологий три молекулы киРНК проходят (или скоро будут проходить) клинические исследования, включая ARC-520 (II фаза, NCT02604212 и NCT02604199; Arrowhead Research Corporation), TKM-HBV (Tekmira/Arbutus Biopharma) и ALN-HBV (Alnylam) (см. табл. 1).

ARC-520 оценивался в нескольких исследованиях у шимпанзе. В одном из этих исследований вначале назначали НА, что приводило к снижению общего уровня ДНК HBV в печени на 1,1–2,5 $\log_{10}$ и кзкДНК на 0,7 ± 0,6 $\log_{10}$ у HBeAg-позитивных шимпанзе. Эффект у HBeAg-негативных шимпанзе был незначительным. После добавления ARC-520 у HBeAg-позитивных животных общее количество ДНК HBV в печени и кзкДНК уменьшалось по сравнению с исходным на 1,5–2,9 $\log_{10}$ и 1,4 ± 0,7 $\log_{10}$ соответственно. Это снижение во многом коррелировало с длительностью ле-

чения. Ни общее количество ДНК HBV, ни количество кзкДНК существенно не изменились у HBeAg-негативных шимпанзе в ходе исследования [35]. Это подняло вопрос интеграции ДНК HBV с вирусными транскриптами с измененным 3'-концом и избегания тем самым действия киРНК и запуска продукции HBsAg, что вело к изменению последовательности, на которую направлена киРНК Arrowhead. ARC-520 также оценивался в клинических исследованиях II фазы у пациентов с ХГВ, получавших или не получавших ранее энтекавир, им вводили одну дозу. В/в введение препарата в дозе до 4 мг/кг не давало каких-либо значимых нежелательных явлений и приводило к максимальному снижению уровня HBsAg на 1,5 $\log_{10}$ у HBeAg-позитивных пациентов *vs* 0,5 $\log_{10}$ у HBeAg-негативных [36]. ARC-520 нанес глубокий и длительный удар по вирусным антигенам и ДНК во II фазе исследования у пациентов с ХГВ. Это первая экспериментальная проверка концепции в отношении использования киРНК в качестве терапевтического средства у пациентов с ХГВ.

Три повышающиеся дозы (введенное количество достигало 0,5 мг/кг) ALN-HBV киРНК назначали в 0, 21 и 42-й дни 4 шимпанзе, что дало снижение уровня HBsAg в среднем на 2 $\log_{10}$ (к 60-му дню) (см. http://www.alnylam.com/web/assets/ALN-HBV_RNAi_Roundtable_072815.pdf). Более того, недавно опубликованные результаты показали, что назначение трех еженедельных доз по 3 мг/кг ALN-HBV AAV-HBV-трансфектированным мышам снижало средний уровень HBsAg на 2,9 $\log_{10}$, при этом выключение HBsAg длилось более 100 дней после введения последней дозы [35]. Инъекции (n = 6) 0,3 мг/кг TKM-HBV в течение 28 дней также приводили к снижению уровня HBsAg на 90 % и, что интересно, к одновременному снижению на 50 % уровня кзкДНК у этих животных (неопубликованные данные).

Различие между этими киРНК и их лекарственными формами в плане противовирусной эффективности, пути введения и нежелательных явлений станут важным вопросом для изучения в ближайшем будущем. Антисмысловые олигонуклеотиды также тестировались на эффективность *in vivo* и *in vitro* с использованием HBV-трансгенных и гидродинамически трансфектированных мышей и в клеточной культуре, моделирующей инфекцию HBV [37].

Стратегии, направленные на снижение уровня HBsAg

Учитывая большое количество HBsAg в крови пациентов с ХГВ, разработка терапевтических моноклональных антител, направленных на нейтрализацию и удаление HBsAg из кровотока, может оказаться сложной или неэффективной. С другой стороны, возможен терапевтический подход, специфически предупреждающий секрецию HBsAg, однако это тоже может быть безуспешным, поскольку HBsAg использует классические секреторные пути клеток хозяина. Тем не менее показано, что Rep2139 (Replicor), полимер нуклеиновой кислоты (NAP), подавляет секрецию HBsAg путем пока неизвестного механизма (см. табл. 1). Во время клинических исследований (NTC02233075) этот препарат при назначении в сочетании с PegIFN-α давал значительное снижение виремии и уровня HBsAg с высокой частотой сероконверсии (появлением антител к HBsAg) [35, 38]. Для подтверждения этих предварительных результатов уже проводятся новые клинические исследования (NCT02565719).

Воздействие на функции HBx

HBx — многофункциональный белок, необходимый для инициации и поддержания инфекции, вызванной HBV, *in vivo* и *in vitro* [39, 32] главным образом за счет механизмов, задействованных в регуляции транскрипционной активности кзкДНК, подавления эффекторов неспецифического иммунитета и разрушения противовирусных факторов хозяина [7]. Воздействие на HBx остается сложной задачей, поскольку он не имеет ферментативной активности. Единственная возможная мишень — это взаимодействие с «партнерами» со стороны хозяина. Недавнее исследование показало, что HBx способен к взаимодействию и запускает разрушение Smc5/6 — белка, ограничивающего транскрипцию кзкДНК [40]. Разрушение HBx наблюдалось при его взаимодействии с системой убиквитина DDB1-CUL4. Предстоит проверить, можно ли создать препарат, вмешивающийся во взаимодействие HBx с DDB1 или HBx с факторами хозяина.

Элиминация кзкДНК

Исходное образование кзкДНК из ркДНК после поступления в ядро и поддержание ее количества за счет возвращения нуклеокапсида в ядро представляют важные противовирусные мишени. Клеточные и биохимические события, необходимые для этого процесса, включают: 1) транспорт нуклеокапсидов в ядро и превращение ркДНК в кзкДНК путем удаления вирусной полимеразы, ковалентно связанной с вирусной антисмысловой цепью ДНК; 2) удаление короткого праймера РНК (используемого для синтеза смысловой цепи

ДНК); 3) завершение цепи смысловой ДНК; 4) удаление избытка вирусной антисмысловой цепи ДНК [8]. Эти этапы требуют ряда ядерных ферментов хозяина, для которых сложно найти специфическую функцию в жизненном цикле вируса [8]. Недавно поступило интересное сообщение, что мелкие молекулы могут специфически воздействовать на образование кзкДНК. Выделено два структурно связанных двузамещенных сульфонамида, которые проходят предварительные испытания как препараты, способные обеспечить элиминацию кзкДНК при ХГВ за счет предупреждения образования кзкДНК, а не за счет разрушения уже образовавшейся кзкДНК [41].

Один из важных вопросов состоит в определении, может ли быть разрушена кзкДНК из запасов в хронически инфицированных клетках. Недавно было показано, что агонисты рецепторов IFN-α и лимфотоксина β могут за счет взаимодействия с соответствующими рецепторами активировать APOBEC3A или APOBEC3B (две цитидиндезаминазы), которые, в свою очередь, индуцируют негепатотоксичное разрушение кзкДНК [42]. Было сделано предположение, что ядерные белки HBV могут опосредовать контакт APOBEC3A/B с кзкДНК, приводящий к цитидиндезаминированию, образованию апуринового/апиримидинового участка и, наконец, по-видимому, к специфическому частичному разрушению кзкДНК без воздействия на геном хозяина. Однако эта концепция требует подтверждения. Недавно экспериментальным путем показано, что IFN-γ и фактор некроза опухолей-α (TNF-α) могут разрушать кзкДНК нецитолитическим и APOBEC3-зависимым путем [43], что открывает новые перспективы, позволяющие достичь разрушения кзкДНК. Интересным способом разрушить кзкДНК может стать использование специфической мегануклеазы кзкДНК (или родственной хоуминг-эндонуклеазы со специфической последовательностью), доставляемой к инфицированным клеткам путем генотерапии [44, 45]. Еще одно подтверждение концепции было сделано недавно в отношении использования системы CRISPR/Cas9: показано, что подавление репликации было вызвано мутациями и делециями в кзкДНК аналогично наблюдаемым в хромосомной ДНК, расщепленной Cas9 и восстановленной соединением негомологичных концов [44, 46]. Это значит, что Cas9 можно нацелить на кзкДНК, что предоставляет возможность для разработки противовирусных стратегий будущего, направленных на эндонуклеотическое расщепление кзкДНК. Тем не менее нужно тщательно оценить на доклинических моделях риск не попадания в цель, хотя недавние успехи в изучении генетических болезней позволяют предположить, что этот подход может быть применен в клинике в ближайшем будущем [47, 48].

Противовирусные средства, направленные на функции клетки (кроме иммуномодуляции)

Ингибиторы проникновения вируса

Открытие клеточного рецептора проникновения HBV, а именно человеческого натрий-таурохолат-котранспортного полипептида (hNTCP), также известного как SLC10A1 [49], дало чрезвычайно ценную информацию для разработки ингибиторов проникновения [50]. Еще до этого открытия было показано, что миристоилированный пептид preS (мирклюдекс B) — липопептид, полученный из домена preS1 оболочки HBV, может предотвращать инфицирование культур гепатоцитов и *in vivo* у мышей uPA/SCID с человеческими гепатоцитами [51]. На такой же мышиной модели было продемонстрировано, что лечение этим соединением эффективно подавляет развитие инфекции, вызванной HDV, которому для инфективности требуются оболочки HBV. Замечено, что подавление вирусного проникновения пептидом preS было связано с его взаимодействием с hNTCP. Более того, препараты, подавляющие функцию hNTCP, такие как циклоспорин, также снижают инфективность вируса в клеточных культурах (см. табл. 1) [50]. Поскольку для персистенции инфекции могут быть необходимы круговые и повторные циклы в гепатоцитах, целесообразно оценить такие ингибиторы проникновения в контексте хронических инфекций. Эффективность ингибиторов проникновения в лечении ХГВ в настоящее время оценивается в клинических исследованиях в России.

Выключение кзкДНК

Еще один перспективный подход — воздействие на белки хроматина, связанного с кзкДНК. Действительно, ацетилирование и/или метилирование гистонов, связанных с кзкДНК, влияют на их транскрипционную активность. В клеточной культуре и на гуманизированных мышах показано, что назначение интерферона способствует гипоацетилированию связанных с кзкДНК гистонов, а также активному привлечению к кзкДНК транскрипционных корепрессоров [52]. Лечение IFN-α также уменьшало связывание транскрипционных факторов STAT1 и STAT2 с активной кзкДНК. Это может представлять молекулярный механизм, в котором IFN-α опосредует эпигенетическое подавление транскрипционной активности

кзкДНК, что может помочь в разработке новых терапевтических стратегий. Потенциальная проблема, связанная с использованием модификаторов эпигенома, — это недостаток специфичности к последовательностям вирусного генома, что может приводить к серьезным нежелательным явлениям. Выявление вирусных механизмов, задействованных в эпигенетической регуляции кзкДНК, имеет, таким образом, решающее значение. Роль HBx в этом отношении точно установлена [32, 40], тогда как роль HBc остается невыясненной. Воздействие на эти белки, как обсуждалось выше, может представлять более специфичный подход к выключению кзкДНК.

Реиндукция апоптоза инфицированных HBV клеток

В недавних исследованиях обнаружено, что блокирование активности клеточных ингибиторов белков апоптоза (cIAP), которые в естественных условиях служат антагонистами проапоптозного эффекта TNF-α, может способствовать гибели клеток и выведению HBV у инфицированных мышей [53]. Показано, что бириапант — вещество, подавляющее cIAP, благоприятствует выведению HBV у этих мышей посредством апоптоз-опосредованного механизма, связанного с продукцией TNF-α и активацией HBV-специфического ответа Т-лимфоцитов [54]. Эта, пока еще не изученная стратегия в настоящее время проходит клинические исследования I–II фазы. Стоит заметить, что бириапант находится на III фазе разработки для использования при различных злокачественных новообразованиях (раке яичников, колоректальном раке, лимфомах и др.); поэтому данные о безопасности *in vivo* для этого препарата уже доступны [55]. Недавно он вошел в исследование I фазы у пациентов с ХГВ (NCT02288208; TetraLogic Pharmaceuticals) (см. табл. 1).

Восстановление иммунитета

Очевидно, что восстановление иммунного ответа против HBV является важным компонентом новых подходов, направленных на излечение инфекции. Может ли это быть достигнуто путем новых механизмов подавления репродукции вируса или потребует специфических иммунотерапевтических подходов, еще предстоит выяснить. Более четкое понимание взаимодействия между HBV и иммунной системой, таким образом, играет решающую роль, поскольку многие исследования до сих пор проводились в неподходящих условиях (не у человека, на трансформированных гепатоцитах или иммунных клетках, полученных из крови, а не из печени). Данные этих исследований показывают, что элиминация HBV при острой инфекции требует от инфицированного сформировать обширный (несколько специфических антигенов) и сильный ответ Т-лимфоцитов, своевременный и синхронный [56, 57]. Напротив, при ХГВ специфические Т-лимфоциты имеют подавленный или истощенный фенотип за счет: 1) сильного и длительного контакта с секретируемыми HBV антигенами (т. е. индуцированное антигенпрезентирующими клетками подавление Т-лимфоцитов); 2) общей недостаточностью активации неспецифических иммунных клеток и отсутствия адекватной презентации антигена инфицированными клетками; 3) высокотолерогенной среды в пораженной печени вследствие избыточного количества иммуномодуляторных клеток (например, регуляторных Т-лимфоцитов [T-reg], M2-подобных или супрессивных миелоидных клеток, клеток, экспрессирующих лиганд 1 программируемой гибели [PD-L1]) и секреции толерогенных молекул (например, интерлейкин-10 [IL-10], трансформирующий фактор роста [TGF-β, -к], аденозин и т. п.) [56, 57]. Более того, HBV-специфичные Т-лимфоциты могут быть подавлены или истощены отрицательными сигналами, передаваемыми при взаимодействии PD-1/PD-L1, CTLA-4/B7-1 или Tim3/Gal9. Кроме слабой цитотоксической активности и нарушенной продукции цитокинов эффекторными Т-лимфоцитами также показано, что изменены функция и взаимный контакт клеток других типов, в т. ч. дендритных естественных киллеров (NK-лимфоцитов), что также создает вклад в общее отсутствие иммунного ответа против вируса при хронической инфекции [58, 59]. Ниже рассматриваются некоторые практические и теоретические аспекты, касающиеся иммунотерапии ХГВ и необходимости учитывать иммунное микроокружение печени.

В настоящее время оценивается усовершенствование применения IFN-α на основе выявления более эффективных прогностических биомаркеров ответа до начала лечения и/или улучшения сочетаний PegIFN-α с НА [60, 61]. Поскольку у пациентов с ХГВ под действием PegIFN-α или НА происходит частичное восстановление функций NK- или Т-лимфоцитов соответственно [62], комбинированная терапия может иметь преимущества у ряда пациентов, что подчеркивает необходимость в биомаркерах восстановления иммунной системы для выявления подходящих пациентов и подходящего времени, что обеспечит успех комбинированной терапии.

Ключевой момент

В настоящее время оцениваются стратегии восстановления специфического и неспецифического иммунного ответа.

Восстановление функций неспецифического иммунитета

Интерфероны и цитокины

Показано, что другие интерфероны, включая модифицированные IFN-α, -β, -γ, IFN типа III, и другие цитокины (например, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-2, IL-12, IL-18 и т. п.) оказывают прямое или непрямое действие на репродукцию HBV *in vitro* и у животных (см. свежий обзор [63]). Однако ни одно из этих соединений не показало более высокой эффективности в тестах (случаи IFN-β и -λ), чем IFN-α, в клинических исследованиях.

Агонисты PRR и другие молекулы, стимулирующие иммунитет

Терапевтический подход с введением больших количеств рекомбинантных цитокинов по большей части разочаровал из-за высокой частоты тяжелых побочных эффектов, вызванных системной активацией иммунитета. С другой стороны, интерес может представлять местное и направленное восстановление эндогенной продукции противовирусных цитокинов [63]. В случае интерферонов это может привести к продукции более широкого разнообразия факторов (т. е. 14 типов IFN-α) и появлению смеси цитокинов с более высокой биологической активностью в месте репродукции вируса. На продукции IFN-α и -λ (IFN III типа; λ1 и λ3) специализируется два вида клеток путем агонизма с toll-подобными рецепторами (TLR7/TLR9 или TLR3), а именно клетки pDC и mDC-BDCA3+/CLEC9A+ [64, 65]. При активации эти клетки в свою очередь активируют другие клетки неспецифического иммунитета и в конечном итоге — специфические клетки. Индуцированная агонистами активация рецептора, распознающего патоген (PRR), в этих клетках может представлять новый подход к лечению ХГВ [66, 67].

Эффект агонизма TLR7 путем приема лиганда внутрь. Показано, что GS-9620 — агонист TLR-7 для приема внутрь — дает сильный анти-HBV эффект со снижением виремии у шимпанзе на два порядка. Что удивительно, у одного животного назначение GS-9620 вело к долговременному безлекарственному подавлению ДНК HBV в печени и крови, что предполагало возможность воздействия на кзкДНК. В дальнейшем это получило подтверждение у инфицированных лесных сурков [69], когда было показано, что, используя более крупную тестовую группу и повышая дозы препарата, можно уменьшить количество кзкДНК, что ведет к резкому снижению уровня HBsAg и сероконверсии с появлением антител к HBs у многих животных, получавших самые высокие концентрации. В настоящее время идет исследование II фазы у пациентов, которые получают тенофовир и GS-9620, сравнивающее эффект с монотерапией тенофовиром (NCT02166047 и NCT02579382; Gilead); несколько исследований IB фазы уже закончено (NCT01590641 и NCT01590654) (см. табл. 1) [70].

Роль других агонистов PRR. Агонисты TLR7 действуют в основном путем активации плазмацитоидных дендритных клеток (pDC) и посредничества IFN I типа, поскольку их рецепторы мало, если вообще, экспрессируются на клетках других типов, включая гепатоциты, в которых идет репродукция HBV. Если такой агонист способен давать интересный терапевтический эффект, можно ожидать, что агонист, направленный на специализированные иммунные клетки и инфицированные гепатоциты (поскольку оба вида клеток экспрессируют его рецепторы), может оказаться еще эффективнее. Показано, что гепатоциты экспрессируют функциональные TLR2 или TLR3, а также другие RIG-подобные, NOD-подобные рецепторы и множество сенсоров ДНК, что открывает возможность использовать соответствующие им агонисты [71, 72]. Еще в 2005 г. в исследовании выявлено, что у трансгенных мышей многие агонисты PRR способны индуцировать противовирусный эффект [73]. Однако эта модель имела недостатки, т. к. не экспрессировала кзкДНК. Недавние данные позволили предположить, что репродукция HBV чувствительна к прямому агонизму TLR1/2, TLR2/6, TLR3, TLR4, RIGI/MDA5 и STING в гепатоцитах [74, 75], что предоставляет нам новые агонисты PRR для тестирования на животных. В отношении этого подхода нужно учитывать два аспекта: 1) токсичность, вызванная «цитокиновой бурей», которая может быть спровоцирована системным введением препарата; 2) возможность того, что вирус деактивирует этот врожденный сенсор, что приведет к снижению эффективности. По последнему аспекту было показано, что у HBe-позитивных пациентов с ХГВ уровень экспрессии TLR2 снижался в гепатоцитах и миелоидных клетках [76], что теоретически может препятствовать функции TLR2-L. Однако у лесных сурков длительная терапия НА была связана с восстановлением экспрессии TLR2 [77]. Поэтому можно предполагать, что терапия, сочетающая НА и агонисты TLR2, сможет восстановить функции неспецифического иммунитета в микроокружении печени [78].

Элиминация и подавление неспецифических иммуномодулирующих клеток: М2-макрофаги

Хорошо известно, что различные неспецифические иммунные клетки могут усиливать им-

мунную толерантность раковых клеток путем инфильтрации опухоли. Концепция связанных с опухолью макрофагов (TAM) привела к разработке стратегий, направленных на элиминацию или редифференцировку этих клеток на устранение толерантности к опухолевым клеткам. Антитела CSF-1R были с успехом протестированы на опухолях, продемонстрировав массивную инфильтрацию TAM [79, 80]. Такая концепция может также работать и при хронических инфекциях.

Недавняя публикация показала, что количество миелоидных супрессивных клеток увеличивалось в печени пациентов с ХГВ, особенно в иммунотолерантной фазе [81]. Увеличение количества супрессивных клеток было связано с ослаблением HBV-специфичных и второстепенных ответов Т-лимфоцитов за счет метаболической регуляции, включающей удаление аргинина секретируемой М2-макрофагами аргиназой. Элиминация или редифференцировка таких клеток (в миелоидные противовирусные клетки) может представлять интересный подход к восстановлению функций Т-лимфоцитов.

Восстановление функций специфического иммунитета

Предложено множество стратегий, направленных на преодоление толерантности к HBV у пациентов с ХГВ путем восстановления функции клеток специфического иммунитета. Ниже частично представлены последние результаты в этой области исследований.

Терапевтическая вакцинация

Цель терапевтической вакцинации — восстановить или индуцировать специфический ответ Т-лимфоцитов путем качественного или количественного улучшения презентации антигена «профессиональными» антигенпрезентирующими клетками, когда: 1) массивная продукция антигенов предположительно вызывает системное и местное истощение Т-лимфоцитов; 2) презентация антигенов гепатоцитами, в которых идет репродукция HBV, по-видимому, неадекватна [82].

Первоначальные стратегии, включающие использование рекомбинантных белков HBV, чтобы стимулировать продукцию В-лимфоцитами нейтрализующих вирус антител, оказались безуспешными. Была сделана попытка напрямую увеличить количество HBV-специфичных Т-лимфоцитов CD8, используя различные сочетания рекомбинантных белков HBV, введение плазмидной ДНК, кодирующей вирусные эпитопы, и/или трансдукцию с вирусными векторами (например, вакцинами, аденовирусами и т. д.). Предпринимались также стратегии «прайм-буст» с целью улучшить ответ на терапевтическую вакцинацию, но без явного успеха в клинических исследованиях (обзор см. в [83, 84]). Последние результаты в этой области в клиническом исследовании I–II фазы, проведенном Fontaine et al., показали, что вакцина из ДНК, экспрессирующей белки оболочки HBV, при назначении в сочетании с НА не снижала риск рецидива и частоту вирусологических прорывов после отмены НА и не восстанавливала иммунный ответ против HBV, несмотря на эффективное подавление вируса с помощью НА [85]. По-видимому, терапевтические вакцины нужно использовать в сочетании с адъювантами/агонистами PRR (чтобы стимулировать неспецифический ответ и пролиферацию/дифференцировку Т-лимфоцитов) и ингибиторами контрольных точек. Это было сделано в доклинических исследованиях на лесных сурках; результаты недавно опубликованы в виде обзора [84].

В настоящее время несколько компаний разрабатывают терапевтические вакцины в исследованиях I или II фазы, включая Transgene (TG1050; результаты на мышах представлены на конференции Европейской ассоциации по изучению печени в 2015 г., NCT02428400), Gilead Sciences (GS4774; убитый нагреванием вакцинный вектор, экспрессирующий белок слияния с последовательностями HBsAg 4 генотипов, NCT01943799 и NCT02174276, см. [86]), Dynavax (DV601; ядерный антиген и HBsAg, NCT01023230, см. [87]) (см. табл. 1).

Терапия Т-лимфоцитами

Чтобы увеличить количество HBV-специфичных Т-лимфоцитов, можно попробовать адоптивный перенос аутологичных клеток путем либо реинфузии Т-лимфоцитов, экспрессирующих HBV-специфичные рецепторы химерических антигенов (CAR), которые сделают возможным HLA-независимое распознавание инфицированных гепатоцитов, либо переносом генно-инженерных Т-лимфоцитов с гиперэкспрессией HLA-ограниченных HBV-специфичных рецепторов Т-лимфоцитов (TCR) [84]. Гиперэкспрессия CAR или HBV-специфичных TCR до недавнего времени проводилась с использованием ретровирусной трансдукции, которая может создавать проблемы безопасности для пациентов. Поэтому последние разработки сосредоточены на использовании электропорации/нуклеопорации для доставки РНК, временно кодирующих рекомбинантные TCR, в Т-лимфоциты покоя. Такой подход эффективно применялся у HBsAg-позитивных пациентов с поражени-

ем печени и метастазами опухолей [88, 89]. Альтернативой может стать новый многообещающий иммунотерапевтический подход, состоящий в перенаправлении иммунных эффекторных клеток на инфицированные HBV гепатоциты, используя антитела, подобные рецепторам Т-лимфоцитов (TCR-L), распознающие ядерный и S-эпитопы HBV, генетически связанные с цитокинами (например, белки слияния TCR-L/IFN-α), или биспецифичные конструкции из антител, несущие два иммуноглобулиновых домена (один — направленный на HBsAg, другой — содержащий эффекторные спецификации для Т-лимфоцитов) [84].

Элиминация и подавление иммуномодулирующих клеток

Ингибиторы иммунных контрольных точек. Истощение HBV-специфичных Т-лимфоцитов отчасти связано с гиперэкспрессией коингибиторных рецепторов, в т. ч. рецепторов программируемой гибели (PD-1), антигена 4, связанного с цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTLA-4 или CD152), гена 3 активации лимфоцитов (Lag-3), иммуноглобулинового домена и домена муцина 3 Т-лимфоцитов (TIM-3) и CD244 (2B4) [56, 57, 90, 91]. Этот истощенный фенотип поддерживается наличием микроокружения из иммуносупрессивных цитокинов/хемокинов, включая IL-10 и TGF-β, продуцируемых толерогенно-восприимчивыми неспецифическими иммунными клетками и T-reg, которых много в печени пациентов с ХГВ [56, 57, 90, 91]. Недавние исследования в онкологии продемонстрировали клиническую пригодность блокирования этих коингибиторных рецепторов антителами. В поздней стадии меланомы комбинированное применение ниволумаба (анти-PD-1) и ипилимумаба (анти-CTLA-4) было связано со значительным повышением выживаемости [92]. Поскольку иммунология ХГВ и опухолей имеет общие характеристики в плане иммунных нарушений, блокирование коингибиторных рецепторов может стать привлекательной концепцией для лечения гепатита В. В эксперименте на мышах с имитацией персистирования HBV недавно было показано, что антитела к PD-1 могут устранять иммунную дисфункцию и способствовать элиминации HBV до некоторой степени (60 % HBsAg-негативных животных *vs* 20 % в контрольной группе) [93]. В недавних исследованиях на животных с хронической инфекцией, вызванной вирусом гепатита лесных сурков (WHV), проверялся эффект сочетания энтекавира, моноклональных антител к PD-L1 и вакцины на основе ДНК WHV. Было показано, что подавление PD-L1 работает синергично с энтекавиром и терапевтической вакцинацией, прекращая репродукцию вируса и восстанавливая WHV-специфичные ответы Т-лимфоцитов [94]. Более того, в экспериментах *ex vivo* на Т-лимфоцитах CD8, которые выделили у 98 пациентов с ХГВ, направленных на сравнение эффективности стратегии ингибиторной блокады рецепторов PD-1, 2B4, Tim-3, CTLA-4 и BTLA, было показано, что молекула анти-PD-1 дает наиболее заметное восстановление функции. Это позволяет предположить важность блокирования PD-1/PD-L1 в контексте ХГВ [95]. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы изучить использование стратегий, направленных на блокирование рецепторов и/или их лигандов, поскольку ряд аспектов, связанных с их клинической оценкой, остается нерешенным, в частности: 1) каков будет риск неконтролируемого, опосредованного Т-лимфоцитами лизиса гепатоцитов в контексте хронического поражения печени? 2) каков будет риск ненаправленного восстановления иммунитета, т. е. аутоиммунитета? Исследования у пациентов с ХГВ и ГЦР, применяющих ингибиторы контрольных точек для лечения онкологических заболеваний, должны помочь в получении первых результатов, необходимых для принятия решения, следует ли продолжать эти программы для лечения ХГВ.

Ингибиторы CD39/CD73. Внеклеточный аденозин, образующийся в микроокружении при гидролизе аденозинтрифосфата, действует как иммунорегуляторный сигнал, который модулирует функцию нескольких клеточных компонентов специфического и неспецифического иммунного ответа [96]. Показано, что внеклеточный аденозин предупреждает активацию, пролиферацию, продукцию цитокинов и цитотоксичность Т-лимфоцитов путем стимуляции пуринергических рецепторов (например, P2X и P2Y) и тем самым создает вклад в истощение этих клеток. CD39 и CD73 — две эктонуклеотидазы, задействованные в образовании внеклеточного аденозина. В иммуносупрессивном микроокружении, как в опухолях или в хронически пораженных тканях, уровень экспрессии CD39 и CD73 значительно повышен [96]. T-reg, которыми массивно инфильтрирована печень пациентов с ХГВ, экспрессируют большое количество CD39 [97], поэтому предполагается, что они участвуют в метаболической регуляции Т-лимфоцитов путем продукции аденозина. С этим связана разработка терапевтических стратегий, направленных на эктонуклеотидазы, которые помогут восстановить функции иммунитета за счет снижения уровня аденозина, а также выработки антител к CD39 или CD73.

Перспективы восстановления иммунитета

С учетом предыдущих безуспешных усилий не стоит ждать быстрой и простой реализации иммунотерапевтических подходов. Примерная «дорожная карта» будет включать супрессию вируса с помощью НА с последующими 1) снижением секреции антигенов HBV, 2) блокировкой ингибиторных путей (в частности, антитела, направленные против контрольных точек, и/или элиминация ингибиторных клеток [например, T-reg, M2-макрофагов и др.], и/или стимуляция функций неспецифического иммунитета [например, агонисты PRR]) и, наконец, 3) стимуляцией Т-лимфоцитов (терапевтическими вакцинами или переносом Т-лимфоцитов), после чего можно будет думать о полном прекращении лечения.

Новые мишени для подавления HDV

HDV — сателлитный вирус, репродукция которого возможна только в присутствии HBV. Поэтому предполагается, что функциональное излечение инфекции, вызванной HBV, приведет одновременно и к элиминации HDV. На сегодня пациенты со смешанной инфекцией, вызванной HBV и HDV, получают НА и PegIFN-α. Однако эффективность такого лечения довольно низкая: неопределяемого уровня РНК HDV в крови через 24 нед. после прекращения лечения удается добиться примерно у 25 % пациентов (результаты исследований HIDIT-1 и -2) [98–101]. Более того, наблюдаются поздние рецидивы гепатита D [102], что снижает частоту долгосрочного вирусологического ответа и оправдывает поиск новых подходов к лечению.

Специфического лечения гепатита D в настоящее время нет. Это в основном объясняется тем, что вирус не кодирует ферменты. Необходимо более четкое понимание биологии HDV, чтобы выявить изменяемые вирусом функции клеток хозяина, которые могут стать подходящими мишенями [13, 14].

Поскольку HDV использует те же рецепторы хозяина, что и HBV, т. е. hNTCP, вполне возможно, что ингибиторы проникновения HBV будут действовать и на HDV [50], что и было показано *in vitro* и в экспериментах на животных [103]. Результаты проводившегося в России клинического исследования IIA фазы мирклюдекса ± PegIFN-α показали обнадеживающий эффект против HDV: у большинства пациентов имело место падение уровня РНК HDV (более чем на порядок) после курса лечения в 24 нед., а у некоторых пациентов даже исчезла виремия (в обеих экспериментальных группах) [104].

NAP (Rep2139), которые подавляют секрецию HBsAg, могут также оказывать положительное действие на HDV. Предварительные результаты клинического исследования II фазы (NCT02233075) показали значительное снижение уровня РНК HDV в крови 12 белых пациентов со смешанной инфекцией, вызванной HBV и HDV [35], хотя нужны дальнейшие наблюдения, чтобы сделать окончательный вывод о потенциальной пользе NAP при ХГД.

Поскольку сборка HDV зависит от пренилирования и фарнезилирования последних четырех аминокислот крупного белка HDV (необходимого для сборки), были протестированы ингибиторы фарнезилтрансферазы, которые ранее использовались как противоопухолевые препараты (например, онкогенный Ras фарнезилируется) [105], и выяснилось, что они эффективны *in vitro* и у мышей против гепатита D. Поэтому лорафарниб был включен в клинические исследования, и предварительные результаты исследований IIA фазы (см. табл. 1) показали, что лечение лорафарнибом связано с дозозависимым, хотя и слабым (–1,54 log МЕ/мл), снижением виремии HDV. Однако влияния на активность аминотрансфераз не наблюдалось, а после отмены препарата всегда отмечался рецидив виремии, что позволяет предположить необходимость дальнейшей оптимизации препарата, особенно с учетом того, что его применение было также связано с нежелательными явлениями со стороны ЖКТ [106].

Ключевой момент

В настоящее время оцениваются новые противовирусные стратегии для борьбы со смешанной инфекцией, вызванной HBV и HDV.

Будущее терапии ХГВ

Какого вида излечения следует ожидать в будущем?

Сейчас, по-видимому, наступает подходящий момент направить исследовательские усилия с фундаментальных работ на прикладные и клинические испытания. Параллельно необходимы усилия фармацевтических компаний для разработки и оценки эффективности новых препаратов. Желательно, конечно, добиться полного излечения гепатита B, включая элиминацию кзкДНК и удаление интегрированных вирусных последовательностей, но такой исход маловероятен даже у пациентов, у которых спонтанно проходит острая инфекция, что делает эту цель лечения при хронической инфекции труднодостижимой. Потребуются большие исследовательские усилия и долгосрочная приверженность медицинского и научного сообщества. Более вероятно достижение функционального излечения, которое в настоящее время наблюдается после острой инфекции и у некоторой

Ключевой момент

Сочетание ПППД и восстановления иммунного ответа может быть необходимо для стабильности функционального излечения.

части больных ХГВ с элиминацией HBsAg в сыворотке на фоне лечения. Учитывая текущую активность в разработке препаратов и быстрый переход клинических исследований от IB ко II фазе, можно предполагать, что новые методы лечения, увеличивающие частоту функционального излечения, будут доступны в ближайшем будущем.

Будущие стратегии в разработке препаратов

С учетом сложности жизненного цикла HBV и его иммунопатогенеза в будущем необходимо решить несколько вопросов. В целом путь к повышению частоты функционального излечения гепатита В простым не будет. Поскольку используемые в настоящее время НА имеют долгосрочный благоприятный профиль безопасности и обеспечивают значительные клинические преимущества, новые противовирусные средства должны иметь исключительно высокую безопасность. Клинические исследования II фазы должны опираться на новые конечные точки в лечении, возможно включающие количественную оценку HBsAg из-за отсутствия доступа к печени для вирусологических и иммунологических исследований. Важным аспектом станет определение порогового уровня HBsAg, до которого следует продолжать монотерапию, прежде чем предложить пациенту комбинированную терапию. Необходимо также оценивать и другие вирусологические и иммунологические биомаркеры. Это поднимает вопрос об идентификации клинических маркеров функционального излечения. В ближайшем будущем высока вероятность, что для увеличения частоты функционального излечения потребуется комбинированная терапия, основанная на ПППД и препаратах, восстанавливающих неспецифический и специфический иммунный ответ. Однако перспективны и стратегии, которые эффективно выключат кзкДНК и/или существенно снизят число вирусных антигенов, что поможет восстановить противовирусный иммунитет. При проведении исследований важно учитывать разные клинические ситуации, в т. ч. пациентов с вызванной НА супрессией вируса (в основном, в западных и развитых странах), нелеченных пациентов (в основном, из высокоэндемичных регионов), пациентов с классическим хроническим активным гепатитом и так называемых иммунотолерантных пациентов, пациентов, инфицированных вирусами различных генотипов или мутантными формами, а также разные возрастные группы. Дизайн этих исследований будет различным в зависимости от типа противовирусных и иммунотерапевтических средств, используемых в виде моно- или комбинированной терапии. Регуляторные пути для разработки новых препаратов также требуют доработки, как это было в случаях ВИЧ-инфекции и гепатита С, что позволит ускорить оценку новых препаратов, а также эффективно ввести их в клиническую практику, чтобы найти излечение от гепатита В.

Спонсоры

DD и FZ получали гранты от ANRS (Французское национальное управление по изучению СПИДа и вирусных гепатитов), Finovi (Фонд инноваций в инфектологии), FRM (Фонд медицинских исследований; DEQ20110421327) и INSERM (Национальный институт здравоохранения и медицинских исследований). Их работу также поддерживают DEVweCAN LABEX (ANR-10-LABX-0061) Лионского университета в рамках программы перспективного инвестирования (ANR-11-IDEX-0007) под управлением Французского национального агентства исследований (ANR).

Конфликты интересов

DD и FZ получали исследовательские гранты от компаний Hoffmann-La-Roche, Gilead Sciences, Novira Therapeutics, Janssen и Assembly Biosciences.

Литература

[1] Villain P, Gonzalez P, Almonte M, Franceschi S, Dillner J, Anttila A, et al. European code against cancer 4th edition: infections and cancer. Cancer Epidemiol 2015;39:S120–S138.
[2] Chan SL, Wong VW, Qin S, Chan HL. Infection and cancer: the case of hepatitis B. J Clin Oncol 2016;34:83–90.
[3] El-Serag HB. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2012;142:e1.
[4] Zoulim F, Durantel D. Antiviral therapies and prospects for a cure of chronic hepatitis B. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021501, pii: a021501.
[5] Gish RG, Given BD, Lai C-L, Locarnini SA, Lau JYN, Lewis DL, et al. Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. Antiviral Res 2015;121:47–58.
[6] Papatheodoridis GV, Chan HL, Hansen BE, Janssen HL, Lampertico P. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. J Hepatol 2015;62:956–967.
[7] Seeger C, Zoulim F, Mason WS. Hepadnaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, editors. Field's virology, vol. 2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2015. p. 2185.
[8] Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. Gut 2015;64:1972–1984.
[9] Bertoletti A, Ferrari C. Innate and adaptive immune responses in chronic hepatitis B virus infections: towards restoration of immune control of viral infection. Gut 2012;61:1754–1764.

[10] Zeisel MB, Lucifora J, Mason WS, Sureau C, Beck J, Levrero M, et al. Towards an HBV cure: state-of-the-art and unresolved questions-report of the ANRS workshop on HBV cure. Gut 2015;64:1314–1326.
[11] Rizzetto M. Hepatitis D virus: introduction and epidemiology. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021576, pii: a021576.
[12] Yurdaydin C, Idilman R. Therapy of delta hepatitis. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021543, pii: a021543.
[13] Alfaiate D, Deny P, Durantel D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options. Antiviral Res 2015;122:112–129.
[14] Taylor JM. Hepatitis D virus replication. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021568, pii: a021568.
[15] Clark DN, Hu J. Hepatitis B virus reverse transcriptase – Target of current antiviral therapy and future drug development. Antiviral Res 2015;123:132–137.
[16] Tavis JE, Lomonosova E. The hepatitis B virus ribonuclease H as a drug target. Antiviral Res 2015;118:132–138.
[17] Murakami E, Wang T, Park Y, Hao J, Lepist E-I, Babusis D, et al. Implications of efficient hepatic delivery by tenofovir alafenamide (GS-7340) for hepatitis B virus therapy. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:3563–3569.
[18] Lu G, Lomonosova E, Cheng X, Moran EA, Meyers MJ, Le Grice SFJ, et al. Hydroxylated tropolones inhibit hepatitis B virus replication by blocking viral ribonuclease H activity. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:1070–1079.
[19] Gruffaz M, Testoni B, Luangsay S, Fusil F, Malika AG, Mancip J, et al. The nuclear function of Hepatitis B capsid (HBc) protein is to inhibit IFN response very early after infection of hepatocytes. Hepatology 2013;58, 276A–276A.
[20] Guo YH, Li YN, Zhao JR, Zhang J, Yan Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. Epigenetics 2011;6:720–726.
[21] Li H-C, Huang E-Y, Su P-Y, Wu S-Y, Yang C-C, Lin Y-S, et al. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. PLoS Pathog 2010;6:e1001162.
[22] Hadziyannis SJ, Lieberman HM, Karvountzis GG, Shafritz DA. Analysis of liver disease, nuclear HBcAg, viral replication, and hepatitis B virus DNA in liver and serum of HBcAg Vs. Anti-HBe positive carriers of hepatitis B virus. Hepatology 1983;3:656–662.
[23] Belloni L, Li LC, Palumbo GA, Chirapu SR, Calvo L, Finn M, et al. HAPs hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors block core protein interaction with the viral minichromosome and host cell genes and affect cccDNA transcription and stability. Hepatology 2013;58, 277A–277A.
[24] Selzer L, Zlotnick A. Assembly and release of hepatitis B virus. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5. http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a021394, pii: a021394.
[25] Delaney WE, Edwards R, Colledge D, Shaw T, Furman P, Painter G, et al. Phenylpropenamide derivatives AT-61 and AT-130 inhibit replication of wild-type and lamivudine-resistant strains of hepatitis B virus in vitro. Antimicrob Agents Chemother 2002;46:3057–3060.
[26] Deres K, Schroder CH, Paessens A, Goldmann S, Hacker HJ, Weber O, et al. Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. Science 2003;299:893–896.
[27] Zlotnick A, Venkatakrishnan B, Tan Z, Lewellyn E, Turner W, Francis S. Core protein: A pleiotropic keystone in the HBV lifecycle. Antiviral Res 2015;121:82–93.
[28] Billioud G, Pichoud C, Puerstinger G, Neyts J, Zoulim F. The main Hepatitis B virus (HBV) mutants resistant to nucleoside analogs are susceptible in vitro to non-nucleoside inhibitors of HBV replication. Antiviral Res 2011;92:271–276.
[29] Wang XY, Wei ZM, Wu GY, Wang JH, Zhang YJ, Li J, et al. In vitro inhibition of HBV replication by a novel compound, GLS4, and its efficacy against adefovir-dipivoxil-resistant HBV mutations. Antivir Ther 2012;17:793–803.
[30] Lam, A., Ren, S., Vogel, R. et al., Inhibition of hepatitis B virus replication by the HBV core inhibitor NVR 3-778. In: 66th annual meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases (AASLD), San Francisco, CA; 2015. Hepatology 62(Suppl. 1):223A–223A.
[31] Marcellin P, Gane EJ, Flisiak R, Manns MP, Kaita KD, Gaggar A, et al. Evidence for ongoing low-level viremia in patients with chronic hepatitis B receiving Long-term Nucleos(t)ide analog therapy. Hepatology 2014;60, 1093A–1093A.
[32] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. J Hepatol 2011;55:996–1003.
[33] Bouchard MJ, Navas-Martin S. Hepatitis B and C virus hepatocarcinogenesis: lessons learned and future challenges. Cancer Lett 2011;305:123–143.
[34] Gish RG, Yuen MF, Chan HL, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, et al. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. Antiviral Res 2015;121:97–108.
[35] Bazinet M, Pantea V, Cebotarescu V, et al. Update on the safety and efficacy of REP 2139 monotherapy and subsequent combination therapy with pegylated interferon alpha-2a in chronic HBV/HDV co-infection in Caucasian patients. In: 66th annual meeting of the American-Association-for-the-Study-of-Liver-Diseases (AASLD), San Francisco, CA; 2015. Hepatology 62(Suppl. 1): 222A–222A.
[36] Yuen M-F, Chan HL-Y, Liu SHK, et al. ARC-520 produces deep and durable knockdown of viral antigens and DNA in a phase II study in patients with chronic hepatitis B. Hepatology 2015;62, 1385A–1385A.
[37] Billioud G, Kruse RL, Carrillo M, Whitten-Bauer C, Gao D, Kim A, et al. In vivo reduction of hepatitis B virus antigenemia and viremia by antisense oligonucleotides. J Hepatol 2016;64:781–789.
[38] Jansen L, Vaillant A, Stelma F, Kootstra NA, Bazinet M, Al-Mahtab M, et al. Serum HBV-RNA Levels Decline Significantly In Chronic Hepatitis B patients dosed with the nucleic-acid polymer REP2139-CA. J Hepatol 2015;62, S250–S250.
[39] Zoulim F, Saputelli J, Seeger C. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. J Virol 1994;68:2026–2030.
[40] Decorsiere, A., et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. Nature, 2016. http://dx.doi.org/.10.1038/nature17170.
[41] Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, et al. Identification of the disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. Antimicrob Agents Chemother 2012.
[42] Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. Science 2014;343:1221–1228.
[43] Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hosel M, et al. Interferon-γ and tumor necrosis factor-α produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis. Gastroenterology 2016;150:194–205.
[44] Kennedy EM, Kornepati AVR, Cullen BR. Targeting hepatitis B virus cccDNA using CRISPR/Cas9. Antiviral Res 2015;123:188–192.
[45] Ahmed M, Wang F, Levin A, Le C, Eltayebi Y, Houghton M, et al. Targeting the Achilles heel of the hepatitis B virus: a review of current treatments against covalently closed circular DNA. Drug Discovery Today 2015;20:548–561.
[46] Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. Mol Ther Nucleic Acids 2014;3:e216.
[47] Nelson CE, Hakim CH, Ousterout DG, Thakore PI, Moreb EA, Rivera RMC, et al. In vivo genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Science 2016;351:403–407.
[48] Urnov F. Genome editing: The domestication of Cas9. Nature 2016;529:468–469.
[49] Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. Elife 2012;1:e00049.

[50] Urban S, Bartenschlager R, Kubitz R, Zoulim F. Strategies to inhibit entry of HBV and HDV into hepatocytes. Gastroenterology 2014.

[51] Lutgehetmann M, Mancke LV, Volz T, Helbig M, Allweiss L, Bornscheuer T, et al. Humanized chimeric uPA mouse model for the study of hepatitis B and D virus interactions and preclinical drug evaluation. Hepatology 2012;55:685–694.

[52] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. J Clin Invest 2012;122:529–537.

[53] Ebert G, Preston S, Allison C, Cooney J, Toe JG, Stutz MD, et al. Cellular inhibitor of apoptosis proteins prevent clearance of hepatitis B virus. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:5797–5802.

[54] Ebert G, Allison C, Preston S, Cooney J, Toe JG, Stutz MD, et al. Eliminating hepatitis B by antagonizing cellular inhibitors of apoptosis. Proc Natl Acad Sci U S A 2015;112:5803–5808.

[55] Fulda S. Promises and challenges of Smac Mimetics as cancer therapeutics. Clin Cancer Res 2015;21:5030–5036.

[56] Ferrari C. HBV and the immune response. Liver Int 2015;35:121–128.

[57] Tan A, Koh S, Bertoletti A. Immune response in hepatitis B virus infection. Cold Spring Harb Perspect Med 2015;5.

[58] Martinet J, Dufeu-Duchesne T, Bruder Costa J, Larrat S, Marlu A, Leroy V, et al. Altered functions of plasmacytoid dendritic cells and reduced cytolytic activity of natural killer cells in patients with chronic HBV infection. Gastroenterology 2012;143:1586–1596.e8.

[59] Schuch A, Hoh A, Thimme R. The role of natural killer cells and CD8(+) T cells in hepatitis B virus infection. Front Immunol 2014;5:258.

[60] Lampertico P, Liaw YF. New perspectives in the therapy of chronic hepatitis B. Gut 2012;61:i18–i24.

[61] Marcellin P, Ahn SH, Ma X, Caruntu FA, Tak WY, Elkashab M, et al. Combination of tenofovir disoproxil fumarate and peginterferon alfa-2a increases loss of hepatitis B surface antigen in patients with chronic hepatitis B. Gastroenterology 2015.

[62] Thimme R, Dandri M. Dissecting the divergent effects of interferon-alpha on immune cells: Time to rethink combination therapy in chronic hepatitis B? J Hepatol 2013;58:205–209.

[63] Isorce N, Lucifora J, Zoulim F, Durantel D. Immune-modulators to combat hepatitis B virus infection: From IFN-α to novel investigational immunotherapeutic strategies. Antiviral Res 2015;122:69–81.

[64] van der Aa E, van Montfoort N, Woltman AM. BDCA3+CLEC9A+ human dendritic cell function and development. Semin Cell Dev Biol 2015;41:39–48.

[65] Dalod M, Chelbi R, Malissen B, Lawrence T. Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. EMBO J 2014;33:1104–1116.

[66] Zoulim F, Luangsay S, Durantel D. Targeting innate immunity: a new step in the development of combination therapy for chronic hepatitis B. Gastroenterology 2013;144:1342–1344.

[67] Testoni B, Durantel D, Lebosse F, Fresquet J, Helle F, Negro F, et al. Ribavirin restores IFNalpha responsiveness in HCV-infected livers by epigenetic remodelling at interferon stimulated genes. Gut 2015.

[68] Lanford RE, Guerra B, Chavez D, Giavedoni L, Hodara VL, Brasky KM, et al. GS-9620, an oral agonist of Toll-like receptor-7, induces prolonged suppression of hepatitis B virus in chronically infected chimpanzees. Gastroenterology 2013;144:1508–1517.

[69] Menne S, Tumas DB, Liu KH, Thampi L, AlDeghaither D, Baldwin BH, et al. Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. J Hepatol 2015;62:1237–1245.

[70] Gane EJ, Lim Y-S, Gordon SC, Visvanathan K, Sicard E, Fedorak RN, et al. The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. J Hepatol 2015.

[71] Cui X, Clark DN, Liu K, Xu X-D, Guo J-T, Hu J. Viral DNA-dependent induction of innate immune response to hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocytes. J Virol 2015;90:486–496.

[72] Luangsay S, Ait-Goughoulte M, Michelet M, Floriot O, Bonnin M, Gruffaz M, et al. Expression and Functionality of Toll- and RIG-like receptors in HepaRG Cells. J Hepatol 2015;63:1077–1085.

[73] Isogawa M, Robek MD, Furuichi Y, Chisari FV. Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. J Virol 2005;79:7269–7272.

[74] Guo F, Han Y, Zhao X, Wang J, Liu F, Xu C, et al. STING Agonists Induce an Innate Antiviral Immune Response against Hepatitis B Virus. Antimicrob Agents Chemother 2015;59:1273–1281.

[75] Lucifora J, Maadadi S, Floriot O, Daffis S, Fletcher S, Zoulim F, et al. Direct antiviral effects of various pattern recognition receptor (PRR) agonists in HBV-replicating hepatocytes. J Hepatol 2015;62:S515–S516.

[76] Visvanathan K, Skinner NA, Thompson AJ, Riordan SM, Sozzi V, Edwards R, et al. Regulation of Toll-like receptor-2 expression in chronic hepatitis B by the precore protein. Hepatology 2007;45:102–110.

[77] Zhang X, Ma Z, Liu H, Liu J, Meng Z, Broering R, et al. Role of Toll-like receptor 2 in the immune response against hepadnaviral infection. J Hepatol 2012;57:522–528.

[78] Durantel D, Zoulim F. Interplay between hepatitis B virus and TLR2-mediated innate immune responses: can restoration of TLR2 functions be a new therapeutic option? J Hepatol 2012;57:486–489.

[79] Ries Carola H, Cannarile Michael A, Hoves S, Benz J, Wartha K, Runza V, et al. Targeting tumor-associated macrophages with anti-CSF-1R antibody reveals a strategy for cancer therapy. Cancer Cell 2014;25:846–859.

[80] Cassier PA, Italiano A, Gomez-Roca CA, Le Tourneau C, Toulmonde M, Cannarile MA, et al. CSF1R inhibition with emactuzumab in locally advanced diffuse-type tenosynovial giant cell tumours of the soft tissue: a dose-escalation and dose-expansion phase 1 study. Lancet Oncol 2015;16:949–956.

[81] Pallett LJ, Gill US, Quaglia A, Sinclair LV, Jover-Cobos M, Schurich A, et al. Metabolic regulation of hepatitis B immunopathology by myeloid-derived suppressor cells. Nat Med 2015;21:591–600.

[82] Barnes E. Therapeutic vaccines in HBV: lessons from HCV. Med Microbiol Immunol 2015;204:79–86.

[83] Michel M-L, Bourgine M, Fontaine H, Pol S. Therapeutic vaccines in treating chronic hepatitis B: the end of the beginning or the beginning of the end? Med Microbiol Immunol 2015;204:121–129.

[84] Zhang E, Kosinska A, Lu M, Yan H, Roggendorf M. Current status of immunomodulatory therapy in chronic hepatitis B, fifty years after discovery of the virus: Search for the "magic bullet" to kill cccDNA. Antiviral Res 2015;123:193–203.

[85] Fontaine H, Kahi S, Chazallon C, Bourgine M, Varaut A, Buffet C, et al. Anti-HBV DNA vaccination does not prevent relapse after discontinuation of analogues in the treatment of chronic hepatitis B: a randomised trial—ANRS HB02 VAC-ADN. Gut 2015;64:139–147.

[86] Gaggar A, Coeshott C, Apelian D, Rodell T, Armstrong BR, Shen G, et al. Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, a hepatitis B virus-specific therapeutic vaccine, in healthy subjects: A randomized study. Vaccine 2014;32:4925–4931.

[87] Plotkin SA, Schaffner W. A hepatitis B vaccine with a novel adjuvant. Vaccine 2013;31:5297–5299.

[88] Bertoletti A, Brunetto M, Maini MK, Bonino F, Qasim W, Stauss H. T cell receptor-therapy in HBV-related hepatocellular carcinoma. OncoImmunology 2015;4:e1008354.

[89] Qasim W, Brunetto M, Gehring AJ, Xue S-A, Schurich A, Khakpoor A, et al. Immunotherapy of HCC metastases with autologous T cell receptor redirected T cells, targeting HBsAg in a liver transplant patient. J Hepatol 2015;62:486–491.

[90] Ye B, Liu X, Li X, Kong H, Tian L, Chen Y. T-cell exhaustion in chronic hepatitis B infection: current knowledge and clinical significance. Cell Death Dis 2015;6:e1694.

[91] Rehermann B, Bertoletti A. Immunological aspects of antiviral therapy of chronic hepatitis B virus and hepatitis C virus infections. Hepatology 2015;61:712–721.

[92] Wolchok JD, Kluger H, Callahan MK, Postow MA, Rizvi NA, Lesokhin AM, et al. Nivolumab plus Ipilimumab in Advanced Melanoma. N Engl J Med 2013;369:122–133.
[93] Tzeng H-T, Tsai H-F, Liao H-J, Lin Y-J, Chen L, Chen P-J, et al. PD-1 blockage reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. PLoS One 2012;7:e39179.
[94] Liu J, Zhang E, Ma Z, Wu W, Kosinska A, Zhang X, et al. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection. PLoS Pathog 2014;10: e1003856.
[95] Bengsch B, Martin B, Thimme R. Restoration of HBV-specific CD8+ T cell function by PD-1 blockade in inactive carrier patients is linked to T cell differentiation. J Hepatol 2014;61:1212–1219.
[96] Bono MR, Fernandez D, Flores-Santibanez F, Rosemblatt M, Sauma D. CD73 and CD39 ectonucleotidases in T cell differentiation: Beyond immunosuppression. FEBS Lett 2015;589:3454–3460.
[97] Tang Y, Jiang L, Zheng Y, Ni B, Wu Y. Expression of CD39 on FoxP3+ T regulatory cells correlates with progression of HBV infection. BMC Immunol 2012;13:17.
[98] Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. N Engl J Med 2011;364:322–331.
[99] Heidrich B, Yurdaydın C, Kabacam G, Ratsch BA, Zachou K, Bremer B, et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. Hepatology 2014;60:87–97.
[100] Heidrich B, Yurdaydin C, Kabacam G, Ratsch BA, Zachou K, Bremer B, et al. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta. Hepatology 2014;60:87–97.
[101] Wedemeyer H, Yurdaydin C, Dalekos GN, Erhardt A, Cakaloglu Y, Degertekin H, et al. Peginterferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta. N Engl J Med 2011;364:322–331.
[102] Keskin O, Wedemeyer H, Tuzun A, Zachou K, Deda X, Dalekos GN, et al. Association between level of hepatitis D virus RNA at week 24 of pegylated interferon therapy and outcome. Clin Gastroenterol Hepatol 2015;13:e2.
[103] Volz T, Giersch K, Allweiss L, Bhadra OD, Petersen J, Lohse AW, et al. Myrcludex-B inhibits establishment of HDV super-infection in HBV infected mice and reduces HDV viremia in stably HBV/HDV co-infected mice. J Hepatol 2015;62, S514–S514.
[104] Bogomolov P, Voronkova N, Allweiss L, Dandri M, Schwab M, Lempp FA, et al. A proof-of-concept Phase 2a clinical trial with HBV/HDV entry inhibitor Myrcludex B. Hepatology 2014;60:1279A–1280A.
[105] Palsuledesai CC, Distefano MD. Protein prenylation: enzymes, therapeutics, and biotechnology applications. ACS Chem Biol 2015;10:51–62.
[106] Koh C, Canini L, Dahari H, Zhao X, Uprichard SL, Haynes-Williams V, et al. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D infection: a proof-of-concept randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2A trial. Lancet Infect Dis 2015;15:1167–1174.