

乙型肝炎的“治愈”之路

孟忠吉, 杨益大

背景资料

人类与乙型肝炎的斗争已经历40余年, 疫苗的广泛使用使乙型肝炎的流行得到很好的控制, 治疗上虽然取得了长足进展, 但是现有的治疗大多只能抑制病毒复制, 不能清除乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)和乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)共价闭合环状DNA(covalent closed circular DNA, cccDNA)。近年来, 随着对HBV致病机制的深入研究和基因编辑技术的发展, 越来越多的乙型肝炎得到“治愈”。基因编辑技术和抗病毒/免疫调节联合治疗可能在HBV的治愈治疗中发挥重要作用。

同行评议者

刘妍, 副研究员, 解放军302医院临床研究中心, 全军传染病研究所/全军艾滋病和病毒性肝炎防治重点实验室

孟忠吉, 十堰市太和医院(湖北医药学院附属医院)感染科湖北省十堰市 442000

杨益大, 浙江大学医学院附属第一医院感染性疾病协同创新中心 传染病诊治国家重点实验室 浙江省杭州市 310003

孟忠吉, 教授, 主要从事慢性肝病的基因治疗与免疫调节治疗方面的研究。

基金项目: 国家传染病防治重大专项基金资助项目, No. 2013ZX10002-001。

作者贡献分布: 本文由孟忠吉完成; 杨益大审校。

通讯作者: 孟忠吉, 教授, 442000, 湖北省十堰市人民南路32号, 湖北医药学院附属太和医院感染科。
 zhongji.meng@163.com
 电话: 0719-8801821

收稿日期: 2016-04-26
 修回日期: 2016-05-23
 接受日期: 2016-06-06
 在线出版日期: 2016-11-28

Potential strategies for “cure” of hepatitis B

Zhong-Ji Meng, Yi-Da Yang

Zhong-Ji Meng, Department of Infectious Diseases, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei Province, China

Yi-Da Yang, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases; State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, the First Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310003, Zhejiang Province, China

Supported by: National Key Program for Infectious Diseases of China, No. 2013ZX10002-001.

Correspondence to: Zhong-Ji Meng, Professor, Department of Infectious Diseases, Taihe Hospital Affiliated to Hubei University of Medicine, 32 Renmin South Road, Shiyan 442000, Hubei Province,

China. zhongji.meng@163.com

Received: 2016-04-26

Revised: 2016-05-23

Accepted: 2016-06-06

Published online: 2016-11-28

Abstract

Hepatitis B is a worldwide health problem and the main cause of liver cirrhosis, liver failure, and liver cancer. The steady state of hepatitis B virus (HBV) covalently closed circular DNA (cccDNA) in HBV infected hepatocytes and virus specific immune tolerance contribute to the chronic persistent infection and hard-to-cure of hepatitis B. The presently available therapeutics for hepatitis B can control viral replication, but rarely eliminate HBV surface antigen (HBsAg) or HBV cccDNA. The “cure” of hepatitis B, which is characterized by the HBsAg loss or HBsAg seroconversion, and cccDNA clearance, has been the goal of researchers for years. In recent years, with the robust progress in understanding the HBV pathogenesis and the rapid development of gene editing technology, the “cure” of hepatitis B becomes prospective. This paper aims to summarize the potential strategies for the “cure” of hepatitis B.

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatitis B; Hepatitis B virus; Covalently closed circular DNA; HBV surface antigen; Immune tolerance; Cure

Meng ZJ, Yang YD. Potential strategies for “cure” of hepatitis B. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2016; 24(33): 4438-4449 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/>

full/v24/i33/4438.htm DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i33.4438>

摘要

乙型肝炎流行范围广, 是肝硬化、肝衰竭和肝癌的重要病因, 严重威胁人类健康。因乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)特殊的复制过程中共价闭合环状DNA(covalent closed circular DNA, cccDNA)的稳态调节和病毒特异性的免疫耐受, 造成HBV慢性持续性感染, 难以清除。现有的治疗大多只能抑制病毒复制, 不能清除乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)和HBV cccDNA。乙型肝炎的“治愈”治疗是科学家一直努力的方向, 其标志是HBsAg的消失和肝细胞内HBV cccDNA的清除。近年来, 随着对HBV致病机制的深入研究和基因编辑技术的发展, 乙型肝炎的“治愈”治疗已曙光初现。本文就乙型肝炎的“治愈”研究方面的进展进行简要综述。

© The Author(s) 2016. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 乙型肝炎; 乙型肝炎病毒; 共价闭合环状DNA; 乙型肝炎病毒表面抗原; 免疫耐受; 治愈

核心提要: 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的共价闭合环状DNA(covalent closed circular DNA, cccDNA)和病毒特异性的免疫耐受, 造成HBV慢性持续性感染。清除血清中的HBV表面抗原和肝细胞核内的cccDNA, 才能“治愈”乙型肝炎。基因编辑技术和抗病毒/免疫调节联合治疗有可能达到“治愈”目标。

孟忠吉, 杨益大. 乙型肝炎的“治愈”之路. 世界华人消化杂志 2016; 24(33): 4438-4449 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v24/i33/4438.htm> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v24.i33.4438>

0 引言

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染可导致急慢性肝脏损伤, 是肝硬化和肝细胞肝癌最重要的病因, 全球60亿人口中, 约1/2的人生活在HBV高流行区, 约20亿人被证明有HBV感染, 根据世界卫生组织估计, 全球约有2.4亿人慢性感染HBV(<http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en/>), 其中25%-40%最终将死于肝硬化和肝癌。每年大

约有100万人死于慢性乙型肝炎相关疾病^[1,2]。2006年全国乙型肝炎流行病学调查结果表明, 我国1-59岁一般人群HBsAg携带率为7.18%, 据此推算, 我国现有的慢性HBV感染者约9300万人, 其中慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者约2000万例^[3]。

慢性乙型肝炎“治愈”能在不同水平定义, 最理想的终点是病毒血症(HBV DNA)和表面抗原的清除, 随之出现乙型肝炎表面抗体血清学转变^[4,5]。这一状态在很大程度上令人满意, 是因为他会显著改善CHB(至少对于非肝硬化患者)的结局, 降低发生并发症的风险^[5]。然而, 完全治愈应该仅能通过清除感染的肝细胞中的共价闭合环状DNA(covalent closed circular DNA, cccDNA)来完成, 这标志病毒的彻底根除, 不会有再活化的风险^[6]。然而, 这些终点仍是一个挑战, 因为目前的治疗无法充分实现这些目标。因此, 临床医生必须依赖一个替代的但更实际的终点, 那就是持续的病毒学缓解现象^[1,7]。

目前用于慢性乙型肝炎抗病毒治疗的药物主要有干扰素(interferon, IFN)或聚乙二醇化干扰素(PEG-IFN)及核苷(酸)类似物(nucleos(t)ide analogues, NAs)两类。使用PEG-IFN- α 能通过抑制病毒和增强宿主免疫应答达到“治愈”效果, 但不幸的是, PEG-IFN- α 的有效治愈率不足10%^[7,8]。乙型肝炎表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)水平、病毒基因型、乙型肝炎e抗原(hepatitis B e antigen, HBeAg)阳性患者的HBeAg水平等可作为IFN的疗效预测因素, 通过这些指标优选患者和优化IFN治疗方案可以提高IFN的治疗应答率^[9]。然而, 这些优化方案可能会排除更多不适宜IFN治疗的患者, 结果, 这一策略并没有影响慢性乙型肝炎的总体治愈率, 而且不良反应较多^[10]。

NAs可有效抑制HBV的复制, 而且具有高效、低毒、使用方便等优点, 广泛应用于临床。使用NAs的无限期治疗, 能成功实现非根治性的抑制病毒复制^[1]。NAs治疗期间HBsAg血清学清除非常罕见, 在所有治疗患者中HBsAg血清学清除率只有0.5%-1.0%。根据数学模型, 实现HBsAg清除在理论上需要20-30年的时间^[11,12]。这种效果对HBeAg阳性和HBeAg阴性的慢性乙型肝炎患者都是意料之中的, 事实上, 尽管HBeAg阳性患者HBsAg水平下降率更显著, 但HBeAg阳性患者通常比HBeAg阴性患

■ 研究前沿

如何最大限度地清除HBV特异性耐受原(HBsAg、HBeAg和HBV病毒颗粒), 清除HBV复制的原始模板HBV cccDNA, 同时使免疫病理控制在安全范围内, 是乙型肝炎“治愈”治疗亟需解决的难题。

■ 相关报道

Loggi等综述了靶控IAP、Myrcludex B、细胞治疗、PD-1等在HBV“治愈”治疗中的潜能。Phyo等对于探索基因编辑技术、APOBEC3A/3B胞嘧啶核苷脱氨基作用、cccDNA转录抑制剂、RNAi等乙型肝炎“治愈”方法进行了综述。

者有更高的HBsAg基线水平。使用更有效的核苷类似物、足够的疗程、更好的疗效监测指标来优化治疗可能会优化核苷类似物的疗效^[13]。

1 乙型肝炎为何难以根治

1.1 HBV cccDNA是HBV持续感染和复发的根源 HBV是属嗜肝DNA病毒的小DNA病毒, 具有3.2 kb部分双链的DNA基因组。HBV进入肝细胞是通过细胞的胞吞作用, 依靠HBV大表面蛋白(PreS1)N末端附着于肝细胞表面的钠离子-牛磺胆酸共转运蛋白受体(sodium taurocholate cotransporting polypeptide, NTCP)^[14]。在脱壳和释放入胞质中之后, 包含松弛环状DNA的核衣壳被转运至细胞核内形成cccDNA^[15]。在肝细胞核内cccDNA与组蛋白结合构成微型染色体, 每个感染肝细胞平均有5-50拷贝cccDNA, 半衰期约50 d^[16]。病毒复制以cccDNA为模板转录HBV各种mRNA, 翻译相应的蛋白质, 同时以3.5 kb前基因组RNA为模板逆转录形成负链DNA, 包装形成核心颗粒后进行正链DNA的合成而完成基因组复制。其中新生的核心颗粒可释放子代病毒DNA进入肝细胞核, 形成cccDNA, 从而维持cccDNA的稳态^[17]。所以, cccDNA是HBV复制的原始模板, 肝细胞核内cccDNA的持续存在是HBV持续感染和复发的根源。长期以来, 一直未能找到以cccDNA为靶点的药物。NAs虽然能高效抑制病毒复制水平, 使病毒DNA载量下降或消失, 但由于肝细胞核内cccDNA未能根除, 即使患者在达到理想的治疗终点后(HBsAg血清转换)停药, 病毒也可能以cccDNA为模板再次大量复制, 激发强烈的免疫应答, 导致肝组织损伤, 甚至肝衰竭^[18]。

1.2 HBV特异性免疫耐受是乙型肝炎久治不愈的重要原因 乙型肝炎治疗的另一困境是HBV特异性免疫耐受。HBV通过多种途径来拮抗宿主的抗病毒效应机制^[19,20]。研究^[21]表明, HBV的蛋白成分(HBsAg、HBeAg、HBV DNA多聚酶)和病毒颗粒均可以不同程度的抑制肝细胞和肝脏非实质细胞以及抗原提呈细胞的应答能力。其中DC细胞数量减少和功能障碍是造成免疫耐受的重要原因。DC细胞功能障碍, 表现为协同刺激分子表达减低, 细胞因子分泌减少^[22]。接受抗原刺激后, DC细胞成熟障碍, 不能传递抗原信息给CD4和CD8T细胞, 从而不能产生功能性辅助性T(Th)细胞和细胞毒性T

细胞(cytotoxic lymphocyte, CTL)。CHB患者血液中的自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)的频率、活化以及细胞因子的生成显著下降, 具有免疫抑制性的白介素(interleukin, IL)-10大量分泌, 导致了免疫耐受并且促使病毒的持续存在。阻断IL-10的作用或者给予抗病毒治疗有助于恢复NK细胞的活性以及IFN- γ 的合成^[23,24]。

下调HBV感染的肝细胞上Toll样受体(toll like receptors, TLRs)的表达已被证实是免疫逃避的一个可能机制^[25]。作为一个重要的宿主先天免疫系统的一部分, TLRs是与识别病原体有关的膜结合受体, 从而激活参与抗病毒免疫应答的多种基因的表达^[26]。TLR-7, 表达于树突状细胞及B淋巴细胞^[27], 能够识别病毒的核酸样结构, 刺激他们各自的受体加强树突状细胞分泌IFN- α 和其他细胞因子, 并且激活自然杀伤细胞和细胞毒性T淋巴细胞。TLR-7以及许多其他的受体在CHB患者体内被抑制导致抗病毒感染的免疫功能紊乱^[28], 尤其在表面抗原存在的情况下^[29]。HBV的持续存在不仅可以直接抑制PRR的识别和抗病毒信号通路, 导致细胞固有免疫耐受, 也能抑制系统性固有免疫细胞(包括NK、NKT和pDCs)的频率和功能, 导致系统性固有免疫耐受, 同样会诱导系统性适应性细胞和体液免疫耐受, 这严重阻碍了HBV的清除^[30]。

因此慢性乙型肝炎患者免疫系统不健全、免疫细胞(T细胞、NK, DC)应答数量和质量上的不足, 加上病毒颗粒和抗原的耐受原作用等因素形成HBV特异性免疫耐受^[20], 而这种免疫耐受是导致HBV持续感染和久治不愈的重要原因, 仅仅抑制病毒复制难以清除HBV感染^[31,32]。无法阻止这一复杂的复制机制导致了病毒抗原持续合成, 这反过来又逐步加剧了免疫反应功能衰竭, 而免疫反应是控制病毒的最有效的工具^[33]。

2 靶向HBV cccDNA的治疗

作为病毒复制和基因表达的原始模板, cccDNA在HBV的慢性化和持续感染中发挥关键作用, 也是HBV难以清除的根源。一旦cccDNA被清除, HBV就失去了“根基”, 所以cccDNA的靶向治疗一直是科学家努力的方向, 成为乙型肝炎治疗研究的新热点。这可以通过抑制cccDNA的合成及维持, 包括通过应用转录抑制剂抑制病毒的定居, 阻止他的活动, 通

过直接灭活cccDNA以及激活宿主的先天免疫应答来实现。

2.1 阻断cccDNA的生成与补充

2.1.1 阻断cccDNA池的补充: 强效抑制病毒复制水平可能部分阻断cccDNA池的补充, 使用核苷酸类似物治疗后cccDNA水平显著下降^[6,34], 但是按照数学公式推算, 如果按照这种方法使cccDNA水平降低一半, 需要14.6年^[35]。所以需要直接作用于cccDNA, 使其降解, 才有可能从根本上根除乙型肝炎。

2.1.2 cccDNA转录抑制剂: 小分子物质已经被证明可以通过改变病毒的表现遗传调控, 阻碍cccDNA向pgRNA的转录并且阻碍乙型肝炎病毒的复制。通过控制与cccDNA结合的组蛋白的乙酰化或者甲基化, 乙型肝炎病毒的转录可以被抑制。这些小分子包括Class I、II、III组蛋白去乙酰化酶抑制剂, p300和P300/CBP相关因素的组蛋白乙酰转移酶抑制剂, hSirt1 activators; JMJD3组蛋白去甲基酶抑制剂^[36]。所有这些小分子物质还处于临床前期研究阶段。由于这些小分子标靶的酶作用非常广泛, 影响多种基因表达, 这些化合物的安全性在临床应用前还需要广泛的评估。

2.1.3 阻断HBV衣壳的组装: HAPs是核衣壳形成以及核心颗粒组装的抑制剂。这是通过对加工过程的错误指导来实现的, 并非主要影响核心蛋白水平或者病毒的复制水平。尽管如此, 由于他对衣壳组装及病毒复制的抑制作用, 还是会出现核心蛋白水平的下降^[37]。另一种有特殊属性的HAP是HAP12, 他会结合微型染色体上的核心蛋白, 引起结构性的改变并且形成一种不支持cccDNA转录以及pgRNA进一步生产的核心蛋白。因此, HAP12也是另一种潜在的治疗药物, 他除了能够有效的抑制核心蛋白, 还能抑制cccDNA的功能^[38]。

NVR-1221, 是一种HAPs的替代物, 能够直接作用于HBV的核心蛋白, 正在进行I a期的药物试验。其他相似的替代物对衣壳蛋白有抑制作用, 包括一些2-氨基-乙酰胺衍生物^[39], 氨磺酰基苯甲酰胺衍生物^[40], 磺胺衍生物^[41], 第一种衍生物与拉米夫定联合使用对乙型肝炎病毒载量具有协同抑制作用^[39]。

2.2 cccDNA稳态的调节

HBV cccDNA的稳态主要受与之结合的H3、H4组蛋白的乙酰化水平调节, HBV x抗原(HBV x antigen, HBxAg)

通过上调H3、H4组蛋白的乙酰化、甲基化和磷酸化水平来维持HBV cccDNA的稳态水平, HBxAg突变后可以下调cccDNA水平^[42]。我们最近的研究表明, 干扰HBxAg的表达或通过使用姜黄素下调组蛋白乙酰化水平可以下调HBV cccDNA的水平, 抑制HBV的复制。

2.3 cccDNA清除

2.3.1 非溶细胞机制: IFN- α 和TNF- α 家族成员以一种特异的无细胞损害的模式诱导cccDNA的降解, 这一最新发现似乎是一个重要的里程碑^[43]。然而, 这种模型中显示的IFN- α 的有效抗病毒活性与临床实践中观察到的PEG-IFN- α 的慢性乙型肝炎治愈率并不相符。可以推测, 实现cccDNA的降解需要大量的IFN- α (与高度复杂的体外模型中使用的水平类似), 或目前临床实践中使用的IFN- α 的剂型或方法所起的作用仅占其生物学潜能的很小一部分。TLRs激动剂等通过活化天然免疫通路, 有望通过非溶细胞机制来清除cccDNA, 但是免疫应答的强度难以控制, 而且非特异性免疫可能造成肝脏的炎症坏死, 甚至出现肝衰竭^[44]。

2.3.2 基因修饰: 2014-02 Science报道, 利用IFN- α 和淋巴毒素 β 受体活化分别上调载脂蛋白B mRNA编辑酶催化多肽样蛋白3A(apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A, APOBEC3A)和APOBEC3B胞嘧啶脱氨酶, 可以导致cccDNA降解从而抑制HBV复制^[45]。这一结果第一次为开发乙型肝炎治愈疗法提供了可能性。但是这种上调APOBEC3A和APOBEC3B胞嘧啶脱氨酶介导的胞嘧啶脱氨作用缺乏特异性, 可能对基因组DNA有潜在的不良反应^[46]。最重要的是这项发现的临床应用的安全问题。淋巴毒素 β 受体激动剂可以触发细胞凋亡、肝细胞的增殖、炎症, 以及肝细胞癌。因此在当前形势下对于他的安全性考量可能会阻碍监管部门对他的认可^[45]。

2.3.3 DNA编辑技术: 锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)和规律成簇的间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas是基因编辑的三大技术。ZFNs和TALEN均显示对HBV cccDNA的编辑能力, 引起cccDNA分子的基因突变, 并抑制病毒复制。但是对cccDNA的降解

应用要点

以CRISPR为代表的基因编辑技术代表HBV cccDNA清除治疗的研究方向; 抗病毒/免疫调节联合治疗可能在“治愈”治疗中发挥重要作用。

能力有限^[47,48]。

CRISPR/Cas系统是利用RNA导向的DNA核酸内切酶来剪切目的DNA。CRISPR/Cas是在大多数细菌和古细菌中发现的一种天然免疫系统, 可用于对抗入侵的病毒及外源DNA。CRISPR/Cas9基因组编辑技术的快速发展为定点清除感染细胞内HBV cccDNA提供了可能。Lin等^[49]应用CRISPR/Cas系统设计筛选了8个HBV特异性gRNA中2个有效, 有趣的是, 一个针对HBV保守区的gRNA可以作用于不同的基因型。在高压水注射HBV持续感染模型体内, 这种CRISPR/Cas系统可以切割含有HBV的质粒, 促进HBV的清除, 结果血清HBsAg的水平显著降低。在转染了NTCP的HepG2细胞, HBV特异性CRISPR/Cas可以通过突变和降解cccDNA显著抑制HBV的感染^[50]。利用慢病毒载体转染CRISPR/Cas系统, 联合不同位点的gRNA可以使cccDNA降低10倍, 病毒DNA水平抑制1000倍^[51]。在一种产生HBV cccDNA的小鼠模型体内, 尾静脉注射sgRNA-Cas9质粒显著降低cccDNA和HBV蛋白水平^[52]。在HepG2.2.15细胞持续表达Cas9和特定的gRNA, 第36天HBV cccDNA下降90%以上。在HepAD38细胞, 双靶位CRISPR/Cas系统显著抑制HBV cccDNA^[53]。上述研究显示, 通过对HBV全基因组序列的分析, 筛选合适的位点作为目标序列, 构建HBV特异性CRISPR/Cas9载体, 有可能发挥HBVcccDNA的降解作用甚至清除cccDNA, 对于HBV“治愈”治疗前景广阔, 因而成为新的研究热点^[54]。

2.3.4 通过诱导肝细胞凋亡清除cccDNA: 目前传染性肝病方面正在研究的一个新方法是靶控凋亡蛋白抑制剂(inhibitor of apoptosis proteins, IAP), 其目标是诱导被病毒感染的细胞的凋亡。来自澳大利亚墨尔本沃尔特和伊莱扎霍尔医学研究所的科学家的最新研究^[55]发现, 在HBV感染时细胞凋亡蛋白的抑制剂(cellular inhibitor of apoptosis proteins, cIAPs)减弱肿瘤坏死因子信号, 他们限制被感染的肝细胞的凋亡, 从而使病毒持续感染。一种用于癌症治疗的XIAP和cIAP1的拮抗药物Birinapant与恩替卡韦联合用于感染HBV的细胞, HBV感染的成功清除率达到100%。Birinapant能够破坏HBV感染的肝细胞, 然而, 正常细胞却不受伤害^[56]。目前, Birinapant正处于慢性乙型肝炎

患者的临床试验 I 期阶段^[57]。该方法具有广阔前景, 但是其安全性有待进一步验证, 而且保护未被感染的肝细胞被HBV继续感染可能会减少肝细胞凋亡导致肝衰竭的风险。

3 HBV的免疫清除

如何打破HBV特异性免疫耐受, 诱导HBV特异性免疫应答来清除HBV? 同时控制免疫损伤, 需要两方面的工作: 一方面减轻HBV病毒和抗原的负荷, 即降低HBV DNA、HBsAg、HBeAg的水平; 另一方面诱导多克隆HBV特异性免疫应答。

3.1 耐受原的清除 siRNA可以序列特异性的结合和降解mRNA。体内外研究^[58,59]已经证实特定序列的siRNA可以高效降解HBV mRNA, 包括pgRNA, 从而降低HBsAg、HBeAg、HBcAg、HBxAg以及DNA多聚酶的表达水平, 显著抑制病毒复制。在小鼠模型体内、2215细胞系和原代肝细胞中联用多种siRNA或siRNA联合核苷类似物治疗, 可以获得更加强效的对于乙型肝炎病毒复制以及抗原表达的抑制^[60-62]。

美国Arrowhead公司开发的以DPC为载体的siRNA(ARC-520)在黑猩猩体内实验证实可以长期抑制乙型肝炎病毒DNA、HBsAg、HBeAg^[63]。ARC-520联合恩替卡韦的II期的临床试验正在进行。这个试验不仅会评估他的安全性及药效学而且还会评估他与恩替卡韦联合应用后对HBsAg、HBeAg、病毒DNA水平的效能^[64]。美国FDA已批准继续推进ARC-520的一项多剂量IIb期临床研究Hepar-2004。目前, ARC-520正处于II期临床开发, 该药每月注射1次, 具有功能性治愈乙型肝炎的潜力^[65]。2016亚太肝病年会学术年会上, 研究人员发表了一项有关ARC-520用于CHB患者的耐受性和活性的研究报道, 研究结果显示ARC-520能有效的抑制cccDNA驱动mRNA下降1.9logs(99%), 而且耐受性良好; 这是目前首个有关HBeAg和HBsAg有效的直接抗病毒研究。

3.2 非特异性免疫增强 免疫治疗是以操控/刺激适应性免疫为基础的, 最近的研究集中在固有免疫通路上, 他在控制感染中起关键作用。固有免疫的活化也可以刺激适应性免疫, 因此, 这一策略有望在慢性乙型肝炎的免疫控制中起更广泛作用。

使用TLR激动剂能重建自身免疫功能^[66]。最近, TLR7激动剂(GS-9620)已被证实慢性

乙型肝炎动物模型中能持续降低病毒血症和抗原血症^[27,67]. GS-9620短期应用于土拨鼠及黑猩猩能够降低血液中及肝内的表面抗原以及HBV DNA. TLR-7激活的免疫应答能够清除表面抗原、e抗原和乙型肝炎核心抗原阳性的肝细胞, 并且能够直接抑制病毒的复制^[27]. 这种药物具有较高的生物利用度及耐受力, 在健康的受试者中没有严重的不良反应^[68]. 联合应用GS-9620和核酸类似物能够有效的治疗乙型肝炎病毒感染, 而不产生与干扰素治疗有关的严重不良反应^[27]. GS-9620是一个接近于临床应用的新的治疗策略, 正处于临床 I / II 期研究中.

3.3 HBV特异性免疫治疗

3.3.1 特异性CTL: 在超过90%的成年期感染病毒患者中观察到的急性期后自发的HBsAg清除是通过建立强大的固有或适应性免疫应答发生的^[33,69]. 因此, 模拟自限性HBV感染期间的免疫反应是治疗慢性乙型肝炎的一个可行的方法. 这一方法包括修复在慢性阶段丧失的合适的免疫功能^[20], 这也是目前探究最广泛的策略.

一个直接精细的方法就是细胞治疗, 他是使用不同类型的改良的T细胞. 这些T细胞在基因上做了改良来表达预先设定的抗病毒特异性. 这一过程的基本原理是使用一个新的具有完美功能的T细胞库来替代或增强宿主缺少或低能的T细胞库, 同时也靶控控制病毒相关的免疫显性的表位^[70,71]. 因此, 这一策略有可能治愈CHB. 然而, 还有几点需要处理以确立他在慢性乙型肝炎中的有效性和安全性: (1)强烈的T细胞介导的杀伤作用激活可能导致肝炎, 出现未知的结果; (2)必须要证明改良的T细胞与天然的T细胞在循环中抗原所致的功能衰竭作用机制不同, 并给肝脏一个促进免疫耐药的环境.

3.3.2 嵌合抗原受体T细胞: 嵌合抗原受体T细胞(chimeric antigen receptor T-cell). 赋予T细胞HLA非依赖的方式识别肿瘤抗原的能力, 这使得经过CAR改造的T细胞相对于天然T细胞表面受体TCR能够识别更广泛的目标. CAR-T已经在包括CD19+急性白血病等多种肿瘤治疗中显示出高效的抗肿瘤活性, 可能发展成为安全有效的肿瘤治疗策略^[72].

慢性乙型肝炎患者由于免疫耐受缺少清除病毒所需的特异性CTL. CTL的特异性由TCR基因决定, 采用转基因表达TCR可使经

CD3抗体活化的CD8⁺ T淋巴细胞转化为特异性CTL. 使用人淋巴细胞中的HBV-T细胞受体信使RNA电转染淋巴细胞生成的HBV特异性T细胞能够使HepG2.2.15病毒载量下降50%, 而不会造成肝毒性^[73]. 生成一种能高效抑制HBV复制但不会直接杀死肝细胞的HBV特异性T细胞是有可能的. 利用CAR-T技术制备HBsAg/HBcAg特异性的CAR-T细胞有可能在HBV的免疫清除中发挥重要作用.

3.3.3 DC疫苗/DC-CIK: DC是体内功能最强的抗原递呈细胞(antigen presenting cell, APC), 也是唯一能活化初始T细胞的APC, 在特异性激活初始T细胞、联结天然免疫和获得性免疫应答中发挥独一无二的作用. 细胞因子诱导的杀伤细胞(cytokine-induced killer cells, CIK)是人体内T淋巴细胞的一种. 在外周血单个核细胞的培养物中加入含有IL-2、IFN- γ 等细胞因子及抗CD3单抗, 可以获得大量增殖的细胞毒性细胞. DC-CIK是指与DC细胞共培养的CIK细胞. CIK细胞和DC细胞是细胞免疫治疗的两个重要组成部分, 两者联合可确保高效的免疫反应. 随着细胞制备技术的日趋完善, DC-CIK细胞过继免疫治疗逐渐在临床广泛开展. 实验研究表明DC和CIK共同培养可以同时促进CIK细胞和DC细胞的增殖和免疫功能. 在临床研究^[74]中, HBsAg活化的自体DC-CIK在部分CHB患者中可以抑制血清HBV载量, 降低HBsAg的水平, 促进HBeAg的血清转换. 未经HBsAg活化的CIK也可以降低血清HBV载量, 促进高ALT水平CHB患者的HBeAg的消失^[75]. 我们在一些低HBsAg水平的患者进行的DC疫苗临床研究发现, HBsAg活化的DC疫苗可以加速HBsAg的清除, 少数患者出现HBsAg/HBsAb血清转换. 但上述研究缺乏随机对照试验和大样本的观察.

3.3.4 DNA疫苗: 与传统疫苗相比, DNA疫苗的优势在于既可诱导体液免疫, 又可诱导细胞免疫^[76]. 从理论、动物实验和临床实验上都充分证实, HBsAg和HBcAg DNA疫苗, 均能诱导出HBV特异性的CTL反应^[77-80]. 但是试图通过接种疫苗治疗慢性乙型肝炎并没有得到令人满意的结果. 核心抗原特异性细胞免疫在CHB中最具特异性, 也与HBV的控制正相关^[81]. 在临床前研究^[82]中获得了鼓舞人心的结果, 目前正在评估核心蛋白DNA疫苗的治疗潜能. 但是这

■名词解释

HBV cccDNA: 乙型肝炎病毒共价闭合环状DNA, 是HBV的复制中间体; 嵌合抗原受体T细胞: 将识别相关抗原的单链抗体和胞内信号域“免疫受体酪氨酸活化基序”在体外进行基因重组, 生成重组质粒, 转染到患者的T细胞, 使患者T细胞表达抗原受体.

同行评价

本文选题准确, 跟踪最新研究进展, 从HBV cccDNA的稳态调节和HBV特异性免疫耐受阐释乙型肝炎难以根治, 到靶向HBV cccDNA的治疗和打破HBV特异性免疫耐受、诱导HBV特异性免疫应答来清除HBV, 进行系统综述, 最后谈到针对HBsAg阴转的临床新方案的探索, 为临床“治愈”更多乙型肝炎患者指明可能的方向。

些资料还仅局限于动物模型中, 因此, 要应用到慢性乙型肝炎的治疗中还需要更多时间。

3.3.5 治疗疫苗: GS-4774是一种酵母菌型的疫苗, 表达X基因、大S基因以及乙型肝炎病毒的核心抗原。他的作用包括在吞噬作用后激活树突状细胞, 兴奋CD4⁺和CD8⁺T细胞, 下调调节性T细胞水平。GS-4774在健康人的I期实验中可诱导HBV特异性免疫应答, 目前正在评估他在CHB患者中的作用^[83]。

DV-601是另一种治疗性的疫苗, 包含重组的HBsAg及HBcAg。在CHB患者的研究中, 有8位HBeAg阳性的初治患者, 6位HBeAg阴性的经恩替卡韦治疗的患者接受了DV-601肌肉注射。疫苗被良好的耐受, 只有较轻的并且在停止治疗后消退的不良反应。所有患者出现了期望的淋巴组织增生的反应以及令人满意的HBsAg、HBeAg和病毒载量的下降, 而且在接受高剂量DV-601的患者中可检测到HBsAb及HBeAb^[84]。

NASVAC, 一种包含HBsAg及HBcAg的联合治疗性疫苗, 可以通过鼻腔喷雾给药。I期实验中, 所有受试者在免疫30 d后产生了HBcAb, 75%受试者在应用10 IU/L以上剂量的情况下, 最迟90 d后出现了HBcAb^[85]。目前正在进行III期实验以评估其降低HBV DNA载量及其他重要临床参数的治疗作用。

最初用于降低肝脏肿瘤风险的合成HBcAg疫苗, 被发现为一种强有力的免疫治疗性疫苗。这种疫苗被设计用来清除乙型肝炎病毒感染的肝细胞而不引起肝损害, 通过高效的HBcAg特异性CTL及抗体应答, 来加强肝脏中现存的宿主T细胞应答^[86]。

3.4 免疫检查点通路的抑制 PD-1, 是隶属于CD28/CTLA-4超家族的T细胞抑制性受体。PD-1在外周和肝内HBV特异性T细胞上均高度表达, 阻断PD-1通路可以修复抗病毒功能^[87-89]。2011年, 美国食品药品监督管理局批准了伊匹单抗(ipilimumab)用于治疗晚期黑色素瘤。包括PD-1和PD-L1抑制剂等检查点制剂正在多种肿瘤中测试单独使用或联合不同疗法的疗效^[90,91]。抗-PD1抗体在评估用于慢性丙型肝炎患者的治疗中有着显著的疗效。然而, 由于患者样本量小, 而且使用的是单一剂量的抗PD1, 研究的临床意义有限^[92]。

目前尚无数据可用于CHB的治疗; 然而体

外研究中, 封闭PD1通路联合CD137活化, 可以增强肝内浸润的T淋巴细胞对HBV的反应性^[89]。在高压水注射HBV小鼠模型体内, 应用PD1单抗阻断PD1通路可以恢复肝内T淋巴细胞的功能表型, 从而清除病毒^[93]。在土拨鼠模型中联合ETV、治疗性DNA疫苗和PD-L1抗体治疗, 显著增强病毒特异性T细胞的功能, 抑制WHV复制和持续的免疫控制, 甚至在一些动物中产生抗-WHs抗体和病毒清除^[94]。

这一方法用于治疗慢性乙型肝炎的治疗具有非常大的吸引力, 因为他赋予T细胞高度的生物学潜能和相对于其他免疫治疗方法的优势。这种方法不需要侵入性操作, 增强预先存在的免疫应答, 因此排除了交叉反应的风险和基因修饰的不良反应。然而, 主要的安全问题来自于生理免疫检查点模式的操作, 比如发生自身免疫的可能性等。

4 针对HBsAg阴转的临床新方案的探索

联合IFN和NAs可能增强抗病毒活性, 而稳定的抑制病毒复制有望加速HBsAg水平下降。因此, 一旦使用核苷酸类似物完全抑制病毒复制, 再给予聚乙二醇IFN- α 2a, 大大提高HBsAg的下降速率和清除率, 就是目前正在评估的最新的治疗方法^[95,96]。

由浙江大学杨益大教授牵头的“十二五”提高慢性乙型肝炎HBsAg阴转率项目中, 以NAs+IFN- α 为基础的抗病毒/免疫调节联合治疗提高HBsAg阴转率。除了联合NAs和IFN- α 以外, 还加了粒-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和乙型肝炎疫苗等免疫调节剂, 以尽可能地调动患者自身的抗病毒免疫反应。结果, 在HBeAg阳性初治慢性乙型肝炎患者中经48 wk治疗获得了8.9%的HBsAg阴转率; 对于NAs经治、HBsAg已经<3000 IU/mL的患者, 经48 wk治疗HBsAg阴转率能够达到15.5%。根据“十二五”项目研究结果, NAs+IFN- α 为基础的抗病毒/免疫调节联合治疗是目前能提高HBsAg阴转率的有效方案。争取在“十三五”期间, 使初治患者的HBsAg阴转率达到10%以上, 经治患者达到20%以上。

5 结论

乙型肝炎的慢性化机制中, HBV cccDNA的稳态存在是造成乙型肝炎久治不愈的根源, HBV

特异性免疫耐受是最重要的原因. 乙型肝炎的“治愈”, 清除cccDNA是关键, 以CRISPR为代表的基因编辑技术已初步显示对cccDNA的降解作用, 在抗乙型肝炎的治疗中可能发挥革命性的作用. 而免疫调节治疗需要持续抑制病毒的复制, 降低病毒载量, 封闭病毒蛋白表达, 以清除耐受原; 另一方面, 诱导多克隆高活性的HBV特异性的免疫应答, 二者协同作用, 有可能打破HBV特异性免疫耐受, 从而清除HBV感染. 目前的临床联合治疗方案中, 在核苷类似物经治患者中, 联合IFN或其他免疫调节剂的治疗将有可能“治愈”更多的乙型肝炎患者.

6 参考文献

- Wong VW, Chan HL. Chronic hepatitis B: a treatment update. *Semin Liver Dis* 2013; 33: 122-129 [PMID: 23749668 DOI: 10.1055/s-0033-1345715]
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: update 2009. *Hepatology* 2009; 50: 661-662 [PMID: 19714720 DOI: 10.1002/hep.23190]
- 中华医学会肝病学分会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2015年版). 中华实验和临床感染病杂志(电子版) 2015; 9: 570-589
- Yuan H, Lee WM. Update of chronic hepatitis B. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 217-223 [PMID: 21423004 DOI: 10.1097/MOG.0b013e32834595b5]
- Loggi E, Vitale G, Conti F, Bernardi M, Andreone P. Chronic hepatitis B: Are we close to a cure? *Dig Liver Dis* 2015; 47: 836-841 [PMID: 26138799 DOI: 10.1016/j.dld.2015.05.019]
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wurstthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750-1758 [PMID: 15188170 DOI: 10.1053/j.gastro.2004.03.018]
- Lee M, Keeffe EB. Hepatitis B: modern end points of treatment and the specter of viral resistance. *Gastroenterol Clin North Am* 2011; 40: 495-505 [PMID: 21893270 DOI: 10.1016/j.gtc.2011.06.004]
- Kao JH. HBsAg-positive chronic hepatitis B: why do I treat my patients with pegylated interferon? *Liver Int* 2014; 34 Suppl 1: 112-119 [PMID: 24373087 DOI: 10.1111/liv.12400]
- Wang Y, Zhao C, Zhang L, Yu W, Shen C, Wang W, Zhen Z, Zhou J. Predictive value of interferon-gamma inducible protein 10 kD for hepatitis B e antigen clearance and hepatitis B surface antigen decline during pegylated interferon alpha therapy in chronic hepatitis B patients. *Antiviral Res* 2014; 103: 51-59 [PMID: 24418572 DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.01.001]
- Seo Y, Yano Y. Short- and long-term outcome of interferon therapy for chronic hepatitis B infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 13284-13292 [PMID: 25309065 DOI: 10.3748/wjg.v20.i37.13284]
- Li MR, Xi HL, Wang QH, Hou FQ, Huo N, Zhang XX, Li F, Xu XY. Kinetics and prediction of HBsAg loss during long-term therapy with nucleos(t)ide analogues of different potency in patients with chronic hepatitis B. *PLoS One* 2014; 9: e98476 [PMID: 24905586 DOI: 10.1371/journal.pone.0098476]
- Bogliione L, D'Avolio A, Cariti G, Gregori G, Burdino E, Baietto L, Cusato J, Ghisetti V, De Rosa FG, Di Perri G. Kinetics and prediction of HBsAg loss during therapy with analogues in patients affected by chronic hepatitis B HBeAg negative and genotype D. *Liver Int* 2013; 33: 580-585 [PMID: 23311449 DOI: 10.1111/liv.12091]
- Jaroszewicz J, Ho H, Markova A, Deterding K, Wurstthorn K, Schulz S, Bock CT, Tillmann HL, Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) decrease and serum interferon-inducible protein-10 levels as predictive markers for HBsAg loss during treatment with nucleoside/nucleotide analogues. *Antivir Ther* 2011; 16: 915-924 [PMID: 21900724 DOI: 10.3851/IMP1866]
- Yan H, Li W. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide acts as a receptor for hepatitis B and D virus. *Dig Dis* 2015; 33: 388-396 [PMID: 26045274 DOI: 10.1159/000371692]
- Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol* 2005; 42: 302-308 [PMID: 15710212 DOI: 10.1016/j.jhep.2004.12.015]
- Taranta A, Tien Sy B, Zacher BJ, Rogalska-Taranta M, Manns MP, Bock CT, Wurstthorn K. Hepatitis B virus DNA quantification with the three-in-one (3io) method allows accurate single-step differentiation of total HBV DNA and cccDNA in biopsy-size liver samples. *J Clin Virol* 2014; 60: 354-360 [PMID: 24890819 DOI: 10.1016/j.jcv.2014.04.015]
- Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 267-272 [PMID: 20483545 DOI: 10.1016/j.patbio.2010.03.005]
- You CR, Lee SW, Jang JW, Yoon SK. Update on hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 13293-13305 [PMID: 25309066 DOI: 10.3748/wjg.v20.i37.13293]
- Chisari FV, Isogawa M, Wieland SF. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathol Biol (Paris)* 2010; 58: 258-266 [PMID: 20116937 DOI: 10.1016/j.patbio.2009.11.001]
- 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 [PMID: 22157327 DOI: 10.1136/gutjnl-2011-301073]
- Wu J, Meng Z, Jiang M, Pei R, Trippler M, Broering R, Bucchi A, Sowa JP, Dittmer U, Yang D, Roggendorf M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology* 2009; 49: 1132-1140 [PMID: 19140219 DOI: 10.1002/hep.22751]

- 22 孟忠吉, 张永红, 李东, 柯昌征, 汤守兵, 陈悦. 乙型肝炎病毒对树突状细胞表型成熟和功能活化的影响. *中西医结合肝病杂志* 2011; 21: 284-286
- 23 Peppas D, Micco L, Javadi A, Kennedy PT, Schurich A, Dunn C, Pallant C, Ellis G, Khanna P, Dusheiko G, Gilson RJ, Maini MK. Blockade of immunosuppressive cytokines restores NK cell antiviral function in chronic hepatitis B virus infection. *PLoS Pathog* 2010; 6: e1001227 [PMID: 21187913 DOI: 10.1371/journal.ppat.1001227]
- 24 Tjwa ET, van Oord GW, Hegmans JP, Janssen HL, Woltman AM. Viral load reduction improves activation and function of natural killer cells in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2011; 54: 209-218 [PMID: 21095036 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.07.009]
- 25 Schwabe RF, Seki E, Brenner DA. Toll-like receptor signaling in the liver. *Gastroenterology* 2006; 130: 1886-1900 [PMID: 16697751 DOI: 10.1053/j.gastro.2006.01.038]
- 26 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; 17: 1-14 [PMID: 15585605 DOI: 10.1093/intimm/dxh186]
- 27 Barrera A, Lanford RE. Infection of primary chimpanzee hepatocytes with recombinant hepatitis D virus particles: a surrogate model for hepatitis B virus. *Methods Mol Med* 2004; 96: 131-142 [PMID: 14762265]
- 28 Momeni M, Zainodini N, Bidaki R, Hassanshahi G, Daneshvar H, Khaleghinia M, Ebrahim M, Karimi-Googheri M, Askari A, Arababadi MK, Kennedy D. Decreased expression of toll like receptor signaling molecules in chronic HBV infected patients. *Hum Immunol* 2014; 75: 15-19 [PMID: 24120739 DOI: 10.1016/j.humimm.2013.09.015]
- 29 Jiang M, Broering R, Trippler M, Poggenpohl L, Fiedler M, Gerken G, Lu M, Schlaak JF. Toll-like receptor-mediated immune responses are attenuated in the presence of high levels of hepatitis B virus surface antigen. *J Viral Hepat* 2014; 21: 860-872 [PMID: 24498958 DOI: 10.1111/jvh.12216]
- 30 Han Q, Lan P, Zhang J, Zhang C, Tian Z. Reversal of hepatitis B virus-induced systemic immune tolerance by intrinsic innate immune stimulation. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28 Suppl 1: 132-137 [PMID: 23855309 DOI: 10.1111/jgh.12034]
- 31 Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 1999; 17: 2826-2829 [PMID: 10438052 DOI: 10.1016/S0264-410X(99)00094-8]
- 32 Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? *Liver Int* 2011; 31 Suppl 1: 111-116 [PMID: 21205147 DOI: 10.1111/j.1478-3231.2010.02399.x]
- 33 Tan A, Koh S, Bertolotti A. Immune Response in Hepatitis B Virus Infection. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2015; 5: a021428 [PMID: 26134480 DOI: 10.1101/cshperspect.a021428]
- 34 Wong DK, Yuen MF, Ngai VW, Fung J, Lai CL. One-year entecavir or lamivudine therapy results in reduction of hepatitis B virus intrahepatic covalently closed circular DNA levels. *Antivir Ther* 2006; 11: 909-916 [PMID: 17302253]
- 35 Yang HC, Kao JH. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerg Microbes Infect* 2014; 3: e64 [PMID: 26038757 DOI: 10.1038/emi.2014.64]
- 36 Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, Raimondo G, Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 19975-19979 [PMID: 19906987 DOI: 10.1073/pnas.0908365106]
- 37 Stray SJ, Zlotnick A. BAY 41-4109 has multiple effects on Hepatitis B virus capsid assembly. *J Mol Recognit* 2006; 19: 542-548 [PMID: 17006877 DOI: 10.1002/jmr.801]
- 38 Belloni L, Li LC, Palumbo GA, Chirapu SR, Calvo L, Finn M, Lopatin U, Zlotnick A, Levrero M. HBV 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
- 39 Cho MH, Jeong H, Kim YS, Kim JW, Jung G. 2-amino-N-(2,6-dichloropyridin-3-yl)acetamide derivatives as a novel class of HBV capsid assembly inhibitor. *J Viral Hepat* 2014; 21: 843-852 [PMID: 24372792 DOI: 10.1111/jvh.12214]
- 40 Campagna MR, Liu F, Mao R, Mills C, Cai D, Guo F, Zhao X, Ye H, Cuconati A, Guo H, Chang J, Xu X, Block TM, Guo JT. Sulfamoylbenzamide derivatives inhibit the assembly of hepatitis B virus nucleocapsids. *J Virol* 2013; 87: 6931-6942 [PMID: 23576513 DOI: 10.1128/JVI.00582-13]
- 41 Cho MH, Song JS, Kim HJ, Park SG, Jung G. Structure-based design and biochemical evaluation of sulfanilamide derivatives as hepatitis B virus capsid assembly inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2013; 28: 916-925 [PMID: 22803663 DOI: 10.3109/14756366.2012.694879]
- 42 Luo L, Chen S, Gong Q, Luo N, Lei Y, Guo J, He S. Hepatitis B virus X protein modulates remodelling of minichromosomes related to hepatitis B virus replication in HepG2 cells. *Int J Mol Med* 2013; 31: 197-204 [PMID: 23128981 DOI: 10.3892/ijmm.2012.1165]
- 43 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Stadler D, Heikenwälder M, Protzer U. [Specific degradation of nuclear hepatitis B virus covalently closed circular DNA]. *Med Sci (Paris)* 2014; 30: 724-726 [PMID: 25174742 DOI: 10.1051/medsci/20143008003]
- 44 Baltayiannis G, Karayiannis P. Treatment options beyond IFN α and NUCs for chronic HBV infection: expectations for tomorrow. *J Viral Hepat* 2014; 21: 753-761 [PMID: 25271858 DOI: 10.1111/jvh.12307]
- 45 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Münk C, Heim MH, Browning JL, Dejjardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014; 343: 1221-1228 [PMID: 24557838 DOI: 10.1126/science.1243462]

- 46 Landry S, Narvaiza I, Linfesty DC, Weitzman MD. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep* 2011; 12: 444-450 [PMID: 21460793 DOI: 10.1038/embor.2011.46]
- 47 Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010; 18: 947-954 [PMID: 20160705 DOI: 10.1038/mt.2010.20]
- 48 Marimani M, Hean J, Bloom K, Ely A, Arbuthnot P. Recent advances in developing nucleic acid-based HBV therapy. *Future Microbiol* 2013; 8: 1489-1504 [PMID: 24199806 DOI: 10.2217/fmb.13.87]
- 49 Lin SR, Yang HC, Kuo YT, Liu CJ, Yang TY, Sung KC, Lin YY, Wang HY, Wang CC, Shen YC, Wu FY, Kao JH, Chen DS, Chen PJ. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3: e186 [PMID: 25137139 DOI: 10.1038/mtna.2014.38]
- 50 Seeger C, Sohn JA. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014; 3: e216 [PMID: 25514649 DOI: 10.1038/mtna.2014.68]
- 51 Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, Kornepati AV, Bogerd HP, Nie T, Chatterjee P, Javanbakht H, Schinazi RF, Cullen BR. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* 2015; 476: 196-205 [PMID: 25553515]
- 52 Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res* 2015; 118: 110-117 [PMID: 25843425 DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015]
- 53 Wang J, Xu ZW, Liu S, Zhang RY, Ding SL, Xie XM, Long L, Chen XM, Zhuang H, Lu FM. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 9554-9565 [PMID: 26327763 DOI: 10.3748/wjg.v21.i32.9554]
- 54 Peng C, Lu M, Yang D. CRISPR/Cas9-based tools for targeted genome editing and replication control of HBV. *Virol Sin* 2015; 30: 317-325 [PMID: 26511989 DOI: 10.1007/s12250-015-3660-x]
- 55 Ebert G, Preston S, Allison C, Cooney J, Toe JG, Stutz MD, Ojaimi S, Scott HW, Baschuk N, Nachbur U, Torresi J, Chin R, Colledge D, Li X, Warner N, Revill P, Bowden S, Silke J, Begley CG, Pellegrini M. Cellular inhibitor of apoptosis proteins prevent clearance of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 5797-5802 [PMID: 25902529 DOI: 10.1073/pnas.1502390112]
- 56 Ebert G, Allison C, Preston S, Cooney J, Toe JG, Stutz MD, Ojaimi S, Baschuk N, Nachbur U, Torresi J, Silke J, Begley CG, Pellegrini M. Eliminating hepatitis B by antagonizing cellular inhibitors of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015; 112: 5803-5808 [PMID: 25902530 DOI: 10.1073/pnas.1502400112]
- 57 Deng Y, Haimowitz T, LaPorte MG, Rippin SR, Alexander MD, Kumar PT, Hendi MS, Lee YH, Condon SM. Electrophilic Oxidation and [1,2]-Rearrangement of the Biindole Core of Birinapant. *ACS Med Chem Lett* 2016; 7: 318-323 [PMID: 26985322 DOI: 10.1021/acsmedchemlett.5b00461]
- 58 Ivacic D, Ely A, Arbuthnot P. Countering hepatitis B virus infection using RNAi: how far are we from the clinic? *Rev Med Virol* 2011; 21: 383-396 [PMID: 21913277 DOI: 10.1002/rmv.705]
- 59 Meng Z, Xu Y, Wu J, Tian Y, Kemper T, Bleekmann B, Roggendorf M, Yang D, Lu M. Inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by endoribonuclease-prepared siRNA. *J Virol Methods* 2008; 150: 27-33 [PMID: 18378325 DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.02.008]
- 60 Li GQ, Yu DM, Lu J, Chen SL, Zhao JY, Wang YC. Study of the efficacy of combination therapy of siRNAs in HepG2.2.15 cells. *Hepatogastroenterology* 2011; 58: 570-574 [PMID: 21661433]
- 61 Li G, Fu L, Jiang J, Ping Y, Huang Y, Wang Y. siRNA combinations mediate greater suppression of hepatitis B virus replication in mice. *Cell Biochem Biophys* 2014; 69: 641-647 [PMID: 24549857 DOI: 10.1007/s12013-014-9846-2]
- 62 Meng Z, Qiu S, Zhang X, Wu J, Schreiter T, Xu Y, Yang D, Roggendorf M, Schlaak J, Lu M. Inhibition of woodchuck hepatitis virus gene expression in primary hepatocytes by siRNA enhances the cellular gene expression. *Virology* 2009; 384: 88-96 [PMID: 19064272 DOI: 10.1016/j.virol.2008.11.012]
- 63 Wooddell CI, Chavez D, Goetzmann JE, Notvall-Elkey LM, Lee H, Guerra B, Peterson RM, Johnson CN, Hegge JO, Gish R, Locarnini S, Anzalone CR, Lanford RE, Lewis DL. Monthly dosing of ARC-520 in chronically hepatitis B virus infected chimpanzees produces rapid, deep and durable reductions in circulating viral antigens. *Hepatology* 2015; 62: 1194a-1195a
- 64 Yuen MF, Chan HLY, Given B, Hamilton J, Schluep T, Lewis DL, Lai CL, Locarnini S, Lau JY, Gish RG. Phase II, dose ranging study of ARC-520, a siRNA-based therapeutic, in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2014; 60: 1280a-1280a
- 65 Gish RG, Yuen MF, Chan HL, Given BD, Lai CL, Locarnini SA, Lau JY, Wooddell CI, Schluep T, Lewis DL. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Res* 2015; 121: 97-108 [PMID: 26129970 DOI: 10.1016/j.antiviral.2015.06.019]
- 66 Zhang X, Kraft A, Broering R, Schlaak JF, Dittmer U, Lu M. Preclinical development of TLR ligands as drugs for the treatment of chronic viral infections. *Expert Opin Drug Discov* 2012; 7: 597-611 [PMID: 22607384 DOI: 10.1517/17460441.2012.689281]
- 67 Menne S, Tumas DB, Liu KH, Thampi L, AlDeghaither D, Baldwin BH, Bellezza CA, Cote PJ, Zheng J, Halcomb R, Fosdick A, Fletcher SP, Daffis S, Li L, Yue P, Wolfgang GH, Tennant BC. 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 [PMID: 25559326 DOI: 10.1016/j.jhep.2014.12.026]
- 68 Lawitz E, Gruener D, Marbury T, Hill J, Webster L, Hassman D, Nguyen AH, Pflanz S, Mogalian E, Gaggar A, Massetto B, Subramanian GM,

- McHutchison JG, Jacobson IM, Freilich B, Rodriguez-Torres M. Safety, pharmacokinetics and pharmacodynamics of the oral toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2015; 20: 699-708 [PMID: 25105516 DOI: 10.3851/IMP2845]
- 69 Loggi E, Gamal N, Bihl F, Bernardi M, Andreone P. Adaptive response in hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat* 2014; 21: 305-313 [PMID: 24674098 DOI: 10.1111/jvh.12255]
- 70 Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, Wiegmann K, Kürschner T, Schulze A, Urban S, Krönke M, Abken H, Protzer U. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008; 134: 239-247 [PMID: 18166356 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.002]
- 71 Gehring AJ, Xue SA, Ho ZZ, Teoh D, Ruedl C, Chia A, Koh S, Lim SG, Maini MK, Stauss H, Bertolotti A. Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *J Hepatol* 2011; 55: 103-110 [PMID: 21145860 DOI: 10.1016/j.jhep.2010.10.025]
- 72 Dai H, Wang Y, Lu X, Han W. Chimeric Antigen Receptors Modified T-Cells for Cancer Therapy. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108: pii djv439 [PMID: 26819347 DOI: 10.1093/jnci/djv439]
- 73 Koh S, Tham CYL, Tanoto AT, Pavesi A, Kamm RD, Bertolotti A. Engineered Hbv-Specific T Cells: Disentangling Antiviral from Killing Capacity. *Journal of Hepatology* 2015; 62: S188-S188
- 74 Ma YJ, He M, Han JA, Yang L, Ji XY. A clinical study of HBsAg-activated dendritic cells and cytokine-induced killer cells during the treatment for chronic hepatitis B. *Scand J Immunol* 2013; 78: 387-393 [PMID: 23841728 DOI: 10.1111/sji.12097]
- 75 Shi M, Fu J, Shi F, Zhang B, Tang Z, Jin L, Fan Z, Zhang Z, Chen L, Wang H, Lau GK, Wang FS. Transfusion of autologous cytokine-induced killer cells inhibits viral replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Clin Immunol* 2009; 132: 43-54 [PMID: 19328038 DOI: 10.1016/j.clim.2009.03.001]
- 76 Cova L. Advances and challenges in the development of therapeutic DNA vaccines against hepatitis B virus infection. *Curr Gene Ther* 2014; 14: 149-160 [PMID: 24828255 DOI: 10.2174/1566523214666140509102644]
- 77 Yang FQ, Yu YY, Wang GQ, Chen J, Li JH, Li YQ, Rao GR, Mo GY, Luo XR, Chen GM. A pilot randomized controlled trial of dual-plasmid HBV DNA vaccine mediated by in vivo electroporation in chronic hepatitis B patients under lamivudine chemotherapy. *J Viral Hepat* 2012; 19: 581-593 [PMID: 22762143 DOI: 10.1111/j.1365-2893.2012.01589.x]
- 78 Im SJ, Yang SH, Yoon SK, Sung YC. Increase of Plasma IL-12/p40 Ratio Induced by the Combined Therapy of DNA Vaccine and Lamivudine Correlates with Sustained Viremia Control in CHB Carriers. *Immune Netw* 2009; 9: 20-26 [PMID: 20107534 DOI: 10.4110/in.2009.9.1.20]
- 79 Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Bréchet C, Pol S, Michel ML. Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Vaccine* 2006; 24: 4482-4489 [PMID: 16310901 DOI: 10.1016/j.vaccine.2005.08.013]
- 80 Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Bréchet C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 2004; 40: 874-882 [PMID: 15382173 DOI: 10.1002/hep.20408]
- 81 Loggi E, Bihl FK, Cursaro C, Granieri C, Galli S, Brodosi L, Furlini G, Bernardi M, Brander C, Andreone P. Virus-specific immune response in HBeAg-negative chronic hepatitis B: relationship with clinical profile and HBsAg serum levels. *PLoS One* 2013; 8: e65327 [PMID: 23750252 DOI: 10.1371/journal.pone.0065327]
- 82 Kosinska AD, Zhang E, Johrden L, Liu J, Seiz PL, Zhang X, Ma Z, Kemper T, Fiedler M, Glebe D, Wildner O, Dittmer U, Lu M, Roggendorf M. Combination of DNA prime-adenovirus boost immunization with entecavir elicits sustained control of chronic hepatitis B in the woodchuck model. *PLoS Pathog* 2013; 9: e1003391 [PMID: 23785279 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003391]
- 83 Gaggar A, Coeshott C, Apelian D, Rodell T, Armstrong BR, Shen G, Subramanian GM, McHutchison JG. 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 [PMID: 25045824 DOI: 10.1016/j.vaccine.2014.07.027]
- 84 Spellman M, Martin JT. Treatment of Chronic Hepatitis B Infection with Dv-601, a Therapeutic Vaccine. *J Hepatol* 2011; 54: S302-S302 [DOI: 10.1016/S0168-8278(11)60753-8]
- 85 Betancourt AA, Delgado CA, Estévez ZC, Martínez JC, Ríos GV, Aureoles-Roselló SR, Zaldívar RA, Guzmán MA, Baile NF, Reyes PA, Ruano LO, Fernández AC, Lobaina-Matos Y, Fernández AD, Madrazo AI, Martínez MI, Baños ML, Alvarez NP, Baldo MD, Mestre RE, Pérez MV, Martínez ME, Escobar DA, Guanche MJ, Cáceres LM, Betancourt RS, Rando EH, Nieto GE, González VL, Rubido JC. Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 394-401 [PMID: 17257877 DOI: 10.1016/j.ijid.2006.09.010]
- 86 Phyo WW, Soh AY, Lim SG, Lee GH. Search for a cure for chronic hepatitis B infection: How close are we? *World J Hepatol* 2015; 7: 1272-1281 [PMID: 26019743 DOI: 10.4254/wjh.v7.i9.1272]
- 87 Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Biasini E, Sacchelli L, Cavallo MC, Silini EM, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2010; 138: 682-693, 693.e1-4 [PMID: 19800335 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.09.052]
- 88 Schurich A, Khanna P, Lopes AR, Han KJ, Peppas D, Micco L, Nebbia G, Kennedy PT, Geretti AM, Dusheiko G, Maini MK. Role of the coinhibitory receptor cytotoxic T lymphocyte antigen-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent hepatitis

- B virus infection. *Hepatology* 2011; 53: 1494-1503 [PMID: 21360567 DOI: 10.1002/hep.24249]
- 89 Fisicaro P, Valdatta C, Massari M, Loggi E, Ravanetti L, Urbani S, Giuberti T, Cavalli A, Vandelli C, Andreone P, Missale G, Ferrari C. Combined blockade of programmed death-1 and activation of CD137 increase responses of human liver T cells against HBV, but not HCV. *Gastroenterology* 2012; 143: 1576-1585.e4 [PMID: 22929808 DOI: 10.1053/j.gastro.2012.08.041]
 - 90 Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, Powderly JD, Carvajal RD, Sosman JA, Atkins MB, Leming PD, Spigel DR, Antonia SJ, Horn L, Drake CG, Pardoll DM, Chen L, Sharfman WH, Anders RA, Taube JM, McMiller TL, Xu H, Korman AJ, Jure-Kunkel M, Agrawal S, McDonald D, Kollia GD, Gupta A, Wigginton JM, Sznol M. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2443-2454 [PMID: 22658127 DOI: 10.1056/NEJMoa1200690]
 - 91 Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, Drake CG, Camacho LH, Kauh J, Odunsi K, Pitot HC, Hamid O, Bhatia S, Martins R, Eaton K, Chen S, Salay TM, Alaparthi S, Grosso JF, Korman AJ, Parker SM, Agrawal S, Goldberg SM, Pardoll DM, Gupta A, Wigginton JM. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N Engl J Med* 2012; 366: 2455-2465 [PMID: 22658128 DOI: 10.1056/NEJMoa1200694]
 - 92 Gardiner D, Lalezari J, Lawitz E, DiMicco M, Ghalib R, Reddy KR, Chang KM, Sulkowski M, Marro SO, Anderson J, He B, Kansra V, McPhee F, Wind-Rotolo M, Grasela D, Selby M, Korman AJ, Lowy I. A randomized, double-blind, placebo-controlled assessment of BMS-936558, a fully human monoclonal antibody to programmed death-1 (PD-1), in patients with chronic hepatitis C virus infection. *PLoS One* 2013; 8: e63818 [PMID: 23717490 DOI: 10.1371/journal.pone.0063818]
 - 93 Tzeng HT, Tsai HF, Liao HJ, Lin YJ, Chen L, Chen PJ, Hsu PN. PD-1 blockade reverses immune dysfunction and hepatitis B viral persistence in a mouse animal model. *PLoS One* 2012; 7: e39179 [PMID: 22761734 DOI: 10.1371/journal.pone.0039179]
 - 94 Liu J, Zhang E, Ma Z, Wu W, Kosinska A, Zhang X, Möller I, Seiz P, Glebe D, Wang B, Yang D, Lu M, Roggendorf M. Enhancing virus-specific immunity in vivo by combining therapeutic vaccination and PD-L1 blockade in chronic hepadnaviral infection. *PLoS Pathog* 2014; 10: e1003856 [PMID: 24391505 DOI: 10.1371/journal.ppat.1003856]
 - 95 Ouzan D, Pénaranda G, Joly H, Khiri H, Pironti A, Halfon P. Add-on peg-interferon leads to loss of HBsAg in patients with HBsAg-negative chronic hepatitis and HBV DNA fully suppressed by long-term nucleotide analogs. *J Clin Virol* 2013; 58: 713-717 [PMID: 24183313 DOI: 10.1016/j.jcv.2013.09.020]
 - 96 Brouwer WP, Xie Q, Sonneveld MJ, Zhang N, Zhang Q, Tabak F, Streinu-Cercel A, Wang JY, Idilman R, Reesink HW, Diculescu M, Simon K, Voiculescu M, Akdogan M, Mazur W, Reijnders JG, Verhey E, Hansen BE, Janssen HL. Adding pegylated interferon to entecavir for hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B: A multicenter randomized trial (ARES study). *Hepatology* 2015; 61: 1512-1522 [PMID: 25348661 DOI: 10.1002/hep.27586]

编辑: 于明茜 电编: 李瑞芳





Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
8226 Regency Drive, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

