

## Гепатит С стал излечим. Гепатит В — следующий?

В.П. ЧУЛАНОВ<sup>1,2</sup>, А.П. ЗУЕВА<sup>1,3</sup>, Д.С. КОСТЮШЕВ<sup>1</sup>, С.А. БРЕЗГИН<sup>1</sup>, Е.В. ВОЛЧКОВА<sup>2</sup>, В.В. МАЛЕЕВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; <sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия; <sup>3</sup>ФГБУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

### Аннотация

Хронический гепатит В (ХГВ) и хронический гепатит С (ХГС) — главные причины цирроза и рака печени, от которых в мире ежегодно умирают более 1 млн человек. В России заболеваемость и смертность от этих причин имеет выраженную тенденцию к росту. Благодаря достигнутым в последние годы успехам в разработке противовирусных препаратов, ХГС перешел в разряд полностью излечимых заболеваний. Современные возможности лечения ХГВ позволяют эффективно подавлять репликацию вируса, но после отмены противовирусных препаратов, как правило, наблюдается рецидив заболевания. Достичь функционального излечения, элиминации HBsAg удается в редких случаях. Полное же излечение — элиминация вируса из организма в настоящее время недостижимая задача. Это связано с персистенцией кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса гепатита В (HBV) в клетках печени, на которые современные препараты не действуют. В настоящее время на разных стадиях разработки находится множество новых препаратов, воздействующих на разные этапы жизненного цикла вируса. К ним относятся ингибиторы связывания HBV с рецептором NTCP, ингибиторы ккзДНК HBV, ингибиторы сборки нуклеокапсида, технологии редактирования генома (TALEN, CRISPR/Cas и др.) и РНК-интерференции. Кроме препаратов прямого противовирусного действия, разрабатываются подходы, усиливающие врожденный и адаптивный иммунный ответ. В исследованиях некоторые из этих подходов или их комбинации позволяют добиваться функционального излечения, однако перспектива достичь полной элиминации вируса есть только при использовании технологий редактирования генома, позволяющих специфически расщеплять ккзДНК. В настоящее время системы нуклеаз находятся на ранних этапах разработки, и еще многое предстоит сделать для доказательства их эффективности и безопасности, но обнадеживающие результаты последних исследований не оставляют сомнений, что уже в недалеком будущем CRISPR/Cas и аналогичные технологии могут стать основой терапии ХГВ.

*Ключевые слова:* вирус гепатита В, хронический гепатит В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, CRISPR/Cas9, миРНК, молекулярная терапия, иммунотерапия, генная инженерия.

### Hepatitis C can be cured: will hepatitis B become next?

V.P. CHULANOV<sup>1,2</sup>, A.P. ZUEVA<sup>1,3</sup>, D.S. KOSTYUSHEV<sup>1</sup>, S.A. BREZGIN<sup>1</sup>, E.V. VOLCHKOVA<sup>2</sup>, V.V. MALEYEV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia; <sup>2</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Ministry of Health of Russian Federation, Moscow, Russia; <sup>3</sup>M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Chronic hepatitis B (CHB) and C (CHC) are one of the leading causes of cirrhosis and liver cancer with over a million of people dying annually from their consequences. In Russia CHB and CHC morbidity and related mortality show an upward trend. As a result of recent breakthroughs in antiviral therapeutics CHC became a curable disease. Modern therapeutics effectively suppress viral replication in CHB patients, but withdrawal of antivirals usually results in disease relapse. Loss of HBsAg required for the so called «functional cure» is a very rare event. Moreover, «complete cure» when the virus is entirely eliminated from the body is not possible due to a persistent form of covalently closed circular DNA (cccDNA) of hepatitis B virus (HBV) in hepatocytes refractory to modern antivirals. Today, there is a plethora of new promising medications being at different stages of development that target different steps of viral life cycle, including inhibitors of interaction between HBV and its entry receptor NTCP, inhibitors of HBV cccDNA, inhibitors of nucleocapsid assembly, technologies of genome editing (TALENs, CRISPR/Cas etc) and RNA-interference. In addition to direct acting antivirals, there is a number of approaches aimed at enhancement of the innate and adaptive immune responses. In experimental conditions, some of these approaches or their combinations help to achieve functional cure. However, complete elimination of the virus is possible only using technologies of genome editing, capable of specific cccDNA degradation. Nuclease systems are currently at their early stages of development, and there is a long way to prove their efficacy and safety. Nevertheless, highly promising results of the recent years leave no doubt that CRISPR/Cas systems and similar technologies can become the basis of CHB therapy.

*Key words:* hepatitis B virus, chronic hepatitis B, covalently closed circular DNA, CRISPR/Cas9, miRNA, molecular therapy, immunotherapy, gene therapy.

АН — аналоги нуклеозидов/нуклеотидов  
 АРС — апуриновые/апиримидиновые сайты  
 ИКТ — иммунные контрольные точки  
 ИФН — интерферон  
 КИ — клинические исследования  
 ккзДНК — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК  
 кчдДНК — кольцевая частично двуцепочечная ДНК  
 миРНК — малые интерферирующие РНК  
 мРНК — матричные РНК

пгРНК — прегеномная РНК  
 ХГВ — хронический гепатит В  
 ХГС — хронический гепатит С  
 ЦП — цирроз печени  
 HBsAg — core-белок (ядерный антиген HBV)  
 HBsAg — поверхностные белки HBV  
 HBV — вирус гепатита В  
 NTCP — рецептор для проникновения HBV в клетку  
 TLR — Toll-подобные рецепторы

По оценкам ВОЗ, смертность от вирусных гепатитов в мире с 2000 г. увеличилась на 22% и превысила таковую от ВИЧ-инфекции. В 2015 г. от вирусных гепатитов умерли 1,34 млн человек, причем 96% из них от цирроза печени (ЦП) и рака печени вследствие хронического гепатита В (ХГВ) и хронического гепатита С (ХГС) [1]. Согласно данным государственного статистического наблюдения в России заболеваемость ХГВ и ХГС по-прежнему очень высока: в 2016 г. 22 и 36 случаев на 100 тыс. населения соответственно, что в абсолютных цифрах приближается к 85 тыс. новых случаев. При этом заболеваемость ЦП за предыдущие 5 лет выросла более чем на 40%, а смертность от ЦП, исключая алкогольный, в 2015 г. составляла 29,4 на 100 тыс. населения, или 34 651 случай. Из приведенных цифр видно, что актуальность проблемы хронических вирусных гепатитов не только не снижается, а стремительно возрастает.

За последние 5 лет новые препараты прямого противовирусного действия совершили переворот в области лечения ХГС. Используя комбинацию из двух или трех препаратов, в течение 12—24 нед можно добиться полной элиминации вируса гепатита С из организма более чем у 90% пациентов [2]. При этом современное лечение ХГС не только высокоэффективно, но и безопасно — легко переносится, не сопряжено со значительными побочными эффектами. Несмотря на пока еще невысокую доступность таких препаратов в нашей стране, мы можем с уверенностью констатировать, что ХГС перешел из разряда трудно поддающихся лечению болезней в категорию полностью излечимых.

Современные подходы к лечению ХГВ основываются на применении препаратов интерферона (ИФН) или аналогов нуклеозидов/нуклеотидов (АН). В первом случае эффективность лечения в целом невысока. Во втором случае лечение АН позволяет подавить репликацию вируса практически у всех пациентов, однако для большинства срок лечения может быть неопределенно долгим, возможно пожизненным. И в том, и в другом случае после завершения лечения репликация вируса, как правило, возобновляется. Элиминация HBsAg удается достичь лишь у небольшого числа пациентов.

В последние десятилетия мир переживает невероятный подъем во многих областях науки, включая молекулярную биологию, что обусловлено прежде всего создани-

ем и развитием новых методов и технологий. Высокопроизводительное секвенирование и обработка больших массивов данных заполнили множество пробелов в изучении природы вирусов. Технологии сайт-специфичного редактирования генома открывают широкие возможности для развития генотерапии. Системы синтеза, прогнозирования свойств и анализа действия химических соединений позволяют получать сотни потенциальных лекарственных веществ в короткие сроки. Можно ли в этих условиях рассчитывать, что ХГВ аналогично гепатиту С будет вычеркнут из списка неизлечимых заболеваний? Поиску ответа на этот вопрос посвящена данная публикация.

**Биология вируса гепатита В.** Вирус гепатита В (HBV) относится к семейству *Hepadnaviridae*. Вирионы HBV, которые также называют частицами Дейна, содержат липидную оболочку клеточного происхождения, декорированную поверхностными белками вируса (HBsAg), и нуклеокапсид, состоящий из core-белков (HBcAg). Внутри нуклеокапсида находится геном вируса — кольцевая частично двуцепочечная ДНК (кчДНК) [3]. После проникновения HBV в гепатоцит кчДНК вируса попадает в цитоплазму клетки и транспортируется в ядро, где достраивается до другой формы генома — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК). ккзДНК служит матрицей для вирусных РНК: матричных РНК (мРНК), с которых синтезируются белки вируса, и прегеномной РНК (пгРНК). пгРНК в комплексе с вирусной полимеразой и рядом клеточных белков попадает в *de novo* синтезированный нуклеокапсид. Внутри нуклеокапсида происходит обратная транскрипция, в результате которой снова образуется геномная кчДНК, в то время как пгРНК деградирует [4].

**Почему ХГВ в настоящее время неизлечим?** Основная причина перехода инфекции в хроническую форму — персистенция ккзДНК в ядре гепатоцита. Данная форма генома HBV характеризуется высокой стабильностью, сохраняется в клетках печени независимо от характера и длительности терапии и обнаруживается даже у пациентов с разрешившейся инфекцией, когда ДНК HBV и HBsAg в крови не выявляется [5, 6]. Поскольку ккзДНК может запустить весь вирусный цикл, только полная ее элиминация может быть условием выздоровления без риска реактивации инфекции [7]. Однако, несмотря на многолетнее изучение и большой арсенал перспективных лекарственных препаратов, еще не удается добиться деградации всех ккзДНК в гепатоцитах.

Стабильность ккзДНК обусловлена тем, что она существует в ядре в виде мини-хромосомы в комплексе с гистоновыми и негистоновыми белками клетки, а также вирусными белками HBxAg и HBcAg. Вследствие такой особенности в структуре ккзДНК подвержена эпигенетической регуляции клеточными белками, которые изменяют ее транскрипционную активность. Основная роль в этом процессе принадлежит метилированию островков CpG ДНК, метилированию и ацетилированию гистонов

#### Сведения об авторах:

*Зуева Анастасия Павловна* — ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, лаборатория вирусных гепатитов, лаборант; ФГБУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, магистр

*Костюшев Дмитрий Сергеевич* — ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, лаб. вирусных гепатитов, м.н.с.

*Брезгин Сергей Алексеевич* — ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, лаб. вирусных гепатитов, лаборант

*Волчкова Елена Васильевна* — ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, зав. каф. инфекционных болезней

*Малеев Виктор Васильевич* — ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, заместитель директора, акад. РАН, проф.

#### Контактная информация:

*Чуланов Владимир Петрович* — ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, зав. научно-консультативным клинико-диагностическим центром; ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, проф. каф. инфекционных болезней; тел.: +7(925)748-8874; e-mail: vladimir.chulanov@rcvh.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6303-9293>

Таблица 1. Основные критерии вариантов излечения ХГВ

Маркер	Полное излечение (элиминация вируса)	Функциональное излечение (элиминация HBsAg)	Частичное излечение (устойчивый вирусологический ответ)
ДНК HBV в крови	Не обнаруживается	Не обнаруживается	Не обнаруживается или менее 2000 МЕ/мл
HBsAg в крови	Не обнаруживается	Не обнаруживается	Обнаруживается
ккзДНК HBV в гепато- цитах	Не обнаруживается	Обнаруживается/транскрипционно- неактивна	Обнаруживается/транскрипционно- активна

[8]. Таким образом, транскрипционный статус ккзДНК, степень компактизации и соответственно доступность ДНК вируса для внешних воздействий во многом зависят от эпигенетической модификации белков, которые привлекаются к мини-хромосоме [9].

Еще одна причина хронизации инфекции — способность HBV «избегать» иммунного ответа [10, 11]. Причиной нарушения интерферонового ответа в острой фазе инфекции является нарушение работы различных сигнальных путей, которые в норме индуцируют продукцию интерферона при других вирусных инфекциях. Механизм этого феномена до конца остается не изученным. Кроме того, HBV создает условия устойчивой иммуносупрессии, снижая абсолютные количества и подавляя функцию специфических для HBV Т-лимфоцитов, дендритных клеток и естественных киллеров [12, 13].

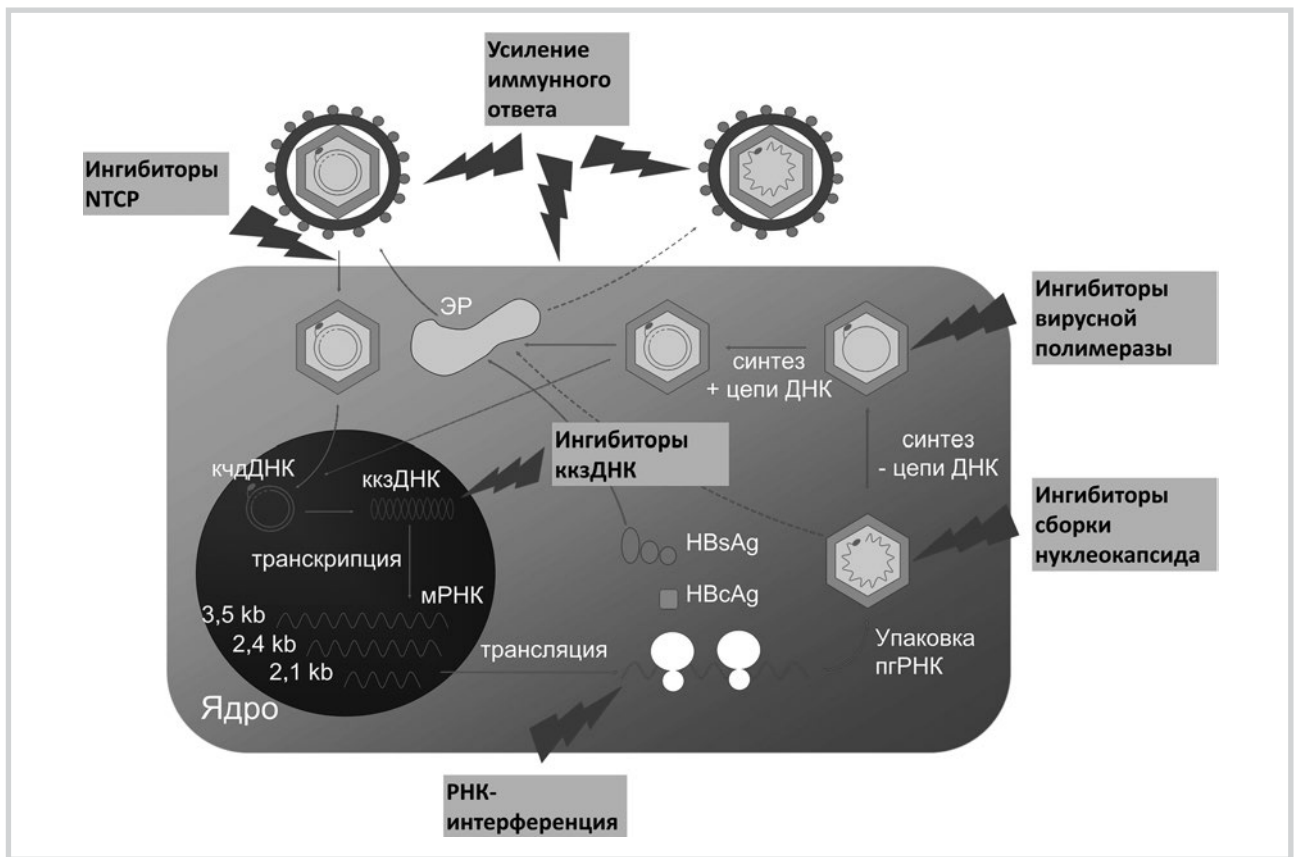
**Ответ на лечение ХГВ: желаемый и достижимый.** Очевидно, что на вопрос, что является желаемым, идеальным ответом на противовирусную терапию, напрашивается ответ — излечение. Однако что считать излечением ХГВ и к каким конечным точкам в терапии следует стремиться в настоящее время — предмет активных дискуссий. Мы обсуждаем вопрос с позиций воздействия на этиологический фактор — HBV. В идеальном случае необходимо добиться полного излечения, т.е. полной элиминации вируса из организма, при котором не детектируется ни один интермедиат вирусного цикла, а в гепатоцитах не сохраняется ни одной копии ккзДНК. Только в этом случае риск развития гепатоцеллюлярной карциномы и вероятность реактивации инфекции после прекращения терапии будут сведены к нулю. Усилия многих разработок, о которых пойдет речь далее, направлены на элиминацию ккзДНК, однако эта цель пока недостижима. Более вероятным считается достижение так называемого функционального излечения, которое характеризуется элиминацией HBsAg с сероконверсией или без нее. В ряде исследований доказано, что при спонтанной или индуцированной лечением элиминации HBsAg риск неблагоприятных исходов заболевания значительно снижается. Это связывают с функциональной, транскрипционной неактивностью ккзДНК. Однако даже такой цели с помощью противовирусных препаратов, имеющихся в арсенале, достичь удается довольно редко. Частота элиминации HBsAg при современных подходах к лечению ХГВ не превышает 5—10%. Большой оптимизм вселяют результаты исследований по возможности блокирования различных этапов жизненного цикла вируса. Комбинирование нескольких препаратов, воздействующих на разные мишени, очевидно, будет гораздо более эффективным. Наконец, под частичным излечением понимают стойкое подавление ре-

пликации HBV, при котором HBsAg продолжает обнаруживаться. Такой результат лечения является вполне достижимым и считается приемлемым, так как снижение вирусной нагрузки коррелирует со снижением риска развития неблагоприятных исходов. Однако он не может рассматриваться как окончательная цель противовирусной терапии, а лишь как промежуточный положительный результат. Основные критерии описанных выше вариантов излечения представлены в табл. 1.

В клинической практике выделяют вирусологический, серологический, биохимический и гистологический ответ на лечение. Наиболее важен вирусологический ответ, который определяется по-разному в зависимости от характера лечения (препараты ИФН или АН) и периода оценки. При лечении АН вирусологическим ответом считается отрицательный результат на ДНК HBV после 3 мес лечения (при аналитической чувствительности метода 10 МЕ/мл и выше). При лечении препаратами ИФН вирусологический ответ определяется как уровень ДНК HBV в плазме крови менее 2000 МЕ/мл через 6 и 12 мес лечения. По завершении любого варианта лечения устойчивым вирусологическим ответом считается уровень ДНК HBV < 2000 МЕ/мл на протяжении не менее 12 мес [14]. Таким образом, клиническое определение устойчивого вирусологического ответа соответствует критериям частичного излечения, описанным ранее.

Открытие пгРНК в составе вирионов HBV, секретируемых в кровь из инфицированных гепатоцитов, не только во многом изменило представления о биологии вируса, но и породило идею об использовании пгРНК в качестве маркера для оценки эффективности лечения ХГВ [15]. Переход ккзДНК в транскрипционно-неактивную форму в результате воздействия лекарственных препаратов влечет за собой прекращение секреции пгРНК в составе вирионов. Таким образом, отрицательный результат на пгРНК в плазме крови косвенно свидетельствует о функциональной неактивности ккзДНК в гепатоцитах и может рассматриваться как ранний признак скорого достижения функционального излечения.

**Терапия ХГВ.** Современные подходы к лечению ХГВ основываются на использовании двух групп препаратов: прямого противовирусного действия и иммуноопосредованного действия. К препаратам прямого противовирусного действия относятся аналоги нуклеозидов (ламивудин, телбивудин, энтекавир) и нуклеотидов (адефовир, тенофовир), которые являются ингибиторами вирусной полимеразы (см. рисунок). Предпочтение отдается препаратам энтекавир и тенофовир, оказывающим выраженное противовирусное действие и обладающим высоким генетическим барьером (низкий риск развития лекарственной



### Жизненный цикл HBV и ключевые мишени для противовирусной терапии.

ЭР — эндоплазматическая сеть (эндоплазматический ретикулум).

устойчивости) [16]. К препаратам иммуноопосредованного действия относятся различные формы ИФН- $\alpha$  (короткого или пролонгированного действия). Их назначение оправдано пациентам, у которых мы вправе ожидать относительно более высокую эффективность такого лечения (HBeAg-положительный ХГВ, низкая вирусная нагрузка, низкий уровень HBsAg, повышенная активность трансаминаз, генотип А HBV) [17]. Несмотря на то что современные противовирусные препараты могут подавлять активную репликацию вируса, ккзДНК HBV не является мишенью такого рода терапии и служит причиной реактивации вирусной инфекции при ее завершении.

По мере изучения молекулярной биологии HBV и его взаимодействий с клеткой появляются новые подходы к лечению ХГВ, направленные на различные стадии жизненного цикла вируса (см. рисунок). Некоторые, наиболее перспективные, экспериментальные методы лечения описаны далее. Препараты для лечения ХГВ, находящиеся в разработке приведены табл. 2.

Экспериментальные методы лечения ХГВ: препараты прямого противовирусного действия

**Ингибиторы связывания HBV с рецептором.** Главным рецептором, посредством которого HBV проникает в гепатоцит, является NTCP (sodium taurocholate co-transporting polypeptide). Мирклодекс-В представляет синтетический липопептид, полученный на основе pre-S1-домена белка оболочки HBV. Данный препарат эффективно ингибирует проникновение HBV в клетку, по-

скольку конкурирует с ним за возможность связывания с рецептором NTCP [18]. В эксперименте у иммунодефицитных гуманизированных мышей, инфицированных HBV, наблюдалось снижение вирусной нагрузки в сыворотке крови. Мирклодекс-В не только ингибировал увеличение количества ккзДНК в инфицированных клетках, но и предотвращал дальнейшее распространение вируса в неинфицированные гепатоциты [19]. В настоящее время препарат находится во II фазе клинических исследований (КИ). Показаны его безопасность, хорошая переносимость и эффективность в широком диапазоне доз (0,5—10 мг). Значительное снижение уровня ДНК HBV (более  $1 \log_{10}$ ) к 12-й неделе лечения наблюдалось у 75% пациентов, получающих 10 мг препарата [20]. В будущем препарат может стать важным компонентом комбинированных схем лечения ХГВ.

**Ингибиторы ккзДНК HBV.** Одним из этапов жизненного цикла вируса, на который может быть направлено воздействие с целью предотвращения образования ккзДНК, является конверсия кчдДНК в ккзДНК. К ингибиторам этого процесса относятся два двузамещенных сульфонида CCC-0975 и CCC-0346 [21]. Показано, что данные молекулы снижают количества ккзДНК в культуре клеток гепатоцитов утки в 2 раза. Однако эти соединения не стимулировали деградацию ккзДНК, т.е. эффект снижения связан только с нарушением образования ккзДНК *de novo*. Данная работа хорошо демонстрирует возможности современных технологий. Авторам за 5 мес

Таблица 2. Препараты для лечения ХГВ, находящиеся в разработке

Препарат	Механизм	Фаза испытаний	Фармацевтическая компания
<i>Ингибиторы проникновения HBV в гепатоциты</i>			
Мирклодекс-В	Ингибитор проникновения вируса в клетку через рецептор NTCP	II	«Hepatera»
Циклоспорин	Конкурентный ингибитор проникновения вируса через рецептор NTCP	Утвержденный FDA препарат (не для HBV), доклинические испытания для HBV	
Эзетимиб	Конкурентный ингибитор проникновения вируса через рецептор NTCP	Утвержденный FDA препарат (не для HBV), доклинические испытания для HBV	
<i>Ингибиторы ккзДНК: деградация, подавление транскрипции и элиминация</i>			
ZFNs	Блокируют транскрипцию ккзДНК, ингибируют образование ккзДНК, подавляют транскрипционную активность ккзДНК, редактируют ккзДНК и вызывают мутации	Доклиническая	
TALENs		"	
CRISPR/Cas9		"	
CCC-0975	Напрямую блокирует конверсию ккзДНК в ккзДНК	"	
CCC-0346	Напрямую блокирует конверсию ккзДНК в ккзДНК	"	
Агонист LT-β R	Усиливает продукцию APOBEC3B	"	
<i>Ингибиторы сборки капсида</i>			
Морфотиадин (GLS4)	Ингибитор сборки капсида	II	«HEC»
NVR 3—778	Ингибитор сборки капсида	II	«Janssen»
AIC 649	Ингибитор сборки капсида	I	«AiCuris»
JNJ56136379	Ингибитор сборки капсида	I	«Janssen»
ABI-H0731	Фактор аллостерической модификации Core-белка (CrAMs)	I	«Assembly Biosciences Inc.»
AB-423	Фактор аллостерической модификации Core-белка (CrAMs)	I	«Arbutus Biopharma»
<i>Ингибиторы HBsAg: нарушают образование HBsAg</i>			
Rep 2139	Ингибитор HBsAg	II	«Replicor»
Rep 2165	Ингибитор HBsAg	II	«Replicor»
GC1102	Рекомбинантный иммуноглобулин человека к HBV	I	«Green Cross»
<i>Антисмысловые молекулы: связываются с мРНК вируса и предотвращают трансляцию белков</i>			
IONIS-HBVRx (GSK3228836)	Ингибитор трансляции белков HBV	I	«IONIS Pharmaceuticals/GSK»
IONIS-HBVLRx (GSK33389-404)	Ингибитор трансляции белков HBV	I	«IONIS Pharmaceuticals/GSK»
<i>Малые интерферирующие РНК: связываются и разрушают РНК вируса</i>			
ARB-1467	Малая интерферирующая РНК	II	«Arbutus Biopharma»
ARB-1740		II	«Arbutus Biopharma»
ALN-HBV		Доклиническая	«Alnylam Pharmaceuticals»
Нербама (BB-HB-331)		"	«Benitec»
Lunar-HBV		"	«Arcturus/Janssen»
ARO-HBV		"	«Arrowhead Pharma»
<i>Агонисты внутриклеточного иммунного ответа</i>			
GS 9620	Агонист TLR-7	II	«Gilead»
RO6864018 (RG7795, ANA773)	Агонист TLR-7	II	«Roche»
SB9200	Агонист RIG-1 и NOD2	II	«Spring Bank Pharmaceuticals»
AIC649	Индукция естественного противовирусного иммунного ответа. Дополнительно к этому, препятствует развитию фиброза, оказывает противоопухолевое действие	II	«AiCuris»

Примечание. FDA — Управление по контролю за качеством лекарственных препаратов и пищевых продуктов США.

удалось оценить влияние на вирусный цикл 85 тыс. низкомолекулярных соединений и отобрать из их 2, давших эффект, для дальнейших исследований.

**Технологии «редактирования» генома.** Большой интерес представляют технологии «редактирования» генома, основанные на использовании нуклеаз — ферментов, способных избирательно связываться с определенными нуклеотидными последовательностями в составе целевой молекулы ДНК и катализировать ее расщепление. К ним относятся нуклеазы с «цинковыми пальцами» (zinc-finger nucleases — ZFN), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas nucleases) — системы, которые могут «разрезать» заданный участок последовательности ДНК, но при этом не оказывать цитотоксического действия, связанного с внецелевым воздействием на геном клетки [22]. Наиболее перспективной в настоящее время является технология «редактирования» генома на основе сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9. Сайтспецифические нуклеазы вызывают двуцепочечные разрывы ДНК и могут использоваться как ингибиторы репликации HBV.

Элементами CRISPR-систем являются проводники РНК (guide RNAs) и белки Cas. Узнавание осуществляется за счет взаимодействия РНК с комплементарным участком ДНК. Система представляет собой комплекс из РНК и белков Cas, обладающих нуклеазной активностью. Опубликовано несколько успешных работ с использованием

этой системы для HBV. В клетках HepAD38, экспрессирующих геном HBV, наблюдалось значительное снижение уровня ДНК вируса при трансдукции клеток плазмидой, кодирующей Cas9, и кассетой из трех проводников РНК, комплементарных последовательностям HBV. В клетках HepaRG также отмечено понижение уровня ккзДНК. Таким образом, показано эффективное снижение числа копий ДНК и ккзДНК как на модели хронической инфекции (HepAD38-клетки), так и при инфекции *de novo* (HepaRG-клетки) [23].

В других работах целевой последовательностью в геноме HBV выбрана рамка считывания, кодирующая белок Х. При этом подтверждена эффективность модели *in vivo* с использованием системы, экспрессирующей ккзДНК в клетках печени мыши. С. Dong и соавт. [24] продемонстрировали, что система может сокращать количество ккзДНК и подавлять репликацию вируса как в клетках, трансфицированных ккзДНК, так и на модели гуманизированных мышей *in vivo*. С. Seeger и J. Sohn [23] показали, что при двуцепочечных разрывах ДНК, вносимых системами CRISPR/Cas9 на модели клеток HepG2-NTCP, инфицированных HBV, репарация разрывов преимущественно происходит по пути негомологичного соединения концов, т.е. системы CRISPR/Cas9 вносят многочисленные мутации в геном HBV [25]. Опубликованные данные по действию систем CRISPR/Cas9 на цикл HBV приведены в табл. 3.

Таким образом, во многих исследованиях продемонстрирована высокая эффективность системы CRISPR/

**Таблица 3. Основные результаты исследований противовирусных свойств CRISPR/Cas9 при HBV-инфекции на модельных системах**

Исследование	Результаты	Ссылка
S. Lin et al.	На линии клеток Huh7: снижение экспрессии мРНК HBsAg на 96%. Уменьшение уровня HBsAg в культуральной среде на 64% Частота целевого мутагенеза до 25,6% при использовании комбинации двух РНК-проводников Эффективность расщепления ДНК HBV <i>in vivo</i> после 2 введений препарата составила 50%	[26]
J. Wang et al.	На линии клеток Huh7: снижение уровня HBsAg в культуральной среде на 93%. Снижение уровня HBeAg на 80% Эффективность расщепления ДНК HBV при использовании комбинации из двух РНК-проводников до 100% Уменьшение уровня ккзДНК на 45%	[27]
S. Zhen et al.	На линии клеток HepG2.2.15: снижение уровня HBsAg в культуральной среде на 61% Снижение уровня ккзДНК на 78% Частота целевого мутагенеза геномов HBV <i>in vivo</i> до 75%	[28]
C. Seeger и J. Sohn E. Kennedy et al.	На линии клеток HepG2/NTCP: снижение экспрессии HBsAg в 10 раз На линии клеток HepAD38: снижение уровня ДНК HBV в клетках в 125 раз и в культуральной среде в 800 раз Снижение уровня ккзДНК в 10 раз HBsAg в культуральной среде в на уровне предела обнаружения	[25] [23]
C. Dong et al.	На линии клеток Huh7: снижение уровня HBsAg в культуральной среде на 50%. Снижение уровня ккзДНК на 40% Снижение уровня ккзДНК на 65% в ткани печени <i>in vivo</i>	[24]
X. Liu et al.	На линии клеток HepG2: при использовании комбинации проводников РНК уровень пгРНК и ДНК HBV (внутриклеточной и в культуральной среде) снижается почти на 100% Снижение количества HBsAg в плазме крови мышей <i>in vivo</i> на 95%	[29]
V. Ramanan et al.	Эксперимент <i>in vivo</i> : снижение секреции HBsAg, снижение вирусной нагрузки 4 раза На линии клеток HepG2.2.15: уменьшение уровня ДНК HBV в культуральной среде на 95%, пгРНК более, чем на 50% Снижение уровня ккзДНК на 92% через 5 нед после трансдукции	[30]
M. Karimova et al.	На линиях клеток HepG2.2.15 и HepG2-H1.3: значительное подавление образования вирионов и снижение количества HBsAg в культуральной среде Количество мутантных вариантов, содержащих вставки и делеции, до 93,9%	[31]

Cas9 при разрушении различных форм ДНК HBV, что позволяет считать данный подход одним из наиболее перспективных направлений разработки противовирусных препаратов для лечения ХГВ.

**Ингибиторы сборки нуклеокапсида HBV.** Белок нуклеокапсида HBV (HBsAg) играет центральную роль в жизненном цикле вируса, обеспечивая упаковку генома, участвуя в обратной транскрипции и множестве других ключевых процессов, необходимых для поддержания стабильной инфекции. Сборка нуклеокапсида — сложный многокомпонентный процесс, ингибирование которого может остановить репликацию вируса и восполнение пула ккзДНК, а потому является привлекательной мишенью для противовирусного воздействия.

Два препарата находятся в разработке у компании «Janssen»: NVR 3—778 (II фаза КИ) и JNJ56136379 (I фаза КИ). Наиболее хорошо изучен препарат NVR 3—778, который ингибирует сборку нуклеокапсида и ряд других функций HBsAg в микромолярных концентрациях *in vitro* и *in vivo*. Он продемонстрировал активность в отношении HBV разных генотипов, хорошую переносимость, биодоступность и фармакокинетику при дозировании 1 раз в день. Эффективность данного препарата показана также в комбинации с аналогами нуклеоз(т)идов [32].

Препарат морфотиадин (GLS4) компании «HEC Pharma» относится к группе гетероарилдигидропиримидинов, является селективным ингибитором сборки нуклеокапсида HBV и также находится во II фазе КИ. GLS4 продемонстрировал выраженную ингибирующую активность в культуре клеток HBV HepG2.2.15, в том числе в отношении резистентных к АН штаммов HBV. Препарат имеет благоприятный фармакокинетический профиль и достаточно безопасен для проведения дальнейших исследований [33].

Недавно открыта еще одна группа веществ, ингибирующих сборку нуклеокапсида, которая получила название факторов аллостерической модификации core-белка (core protein allosteric modifiers— CpAMs), одним из которых является ABI-N0731 («Assembly Biosciences», I фаза КИ). На моделях *in vitro* показано, что CpAM снижают репликацию HBV, уровень ккзДНК, HBeAg, HBsAg и пгРНК [34].

Для ингибитора АВ-423 («Arbutus Biopharma», I фаза КИ) показана активность на двух разных стадиях жизненного цикла HBV: инкапсидации пгРНК и формирования ккзДНК. В культуре клеток HepAD38 и гепатомы человека показан аддитивный и синергетический эффект при комбинированном использовании АН и препаратов из группы малых интерферирующих РНК (миРНК), о которых пойдет речь далее [35].

**РНК-интерференция.** Одной из перспективных мишеней для противовирусных препаратов является транскрипция вирусных мРНК. При хронической инфекции, вызванной HBV, как правило, наблюдается избыточный синтез HBsAg и других вирусных белков, постоянное воздействие которых на Т-лимфоциты приводит к истощению Т-клеточного звена иммунитета. Подавление или полная блокировка экспрессии вирусных мРНК может привести к значительному снижению уровня антигенов HBV и как следствие восстановлению иммунитета [36]. Механизм РНК-интерференции — подавления экспрессии целевых генов с помощью малых молекул РНК — в

настоящее время широко используется как один из инструментов для создания лекарственных препаратов. Опубликовано более десятка перспективных экспериментальных разработок препаратов против HBV на основе малых некодирующих РНК. Интерес представляет препарат ARC-520 («Arrowhead», II фаза КИ), содержащий 2 малые интерферирующие РНК (миРНК), конъюгированные с молекулой холестерина, которые комплементарны 2 регионам в геноме HBV. Препарат продемонстрировал дозозависимое подавление экспрессии HBsAg. После однократного введения 2 мг/кг ARC-520 наблюдалось снижение уровня HBsAg до 50% на протяжении 43—57 дней. При этом частота нежелательных явлений не отличалась от таковой при применении плацебо [37].

Препарат ARB-1467 («Arbutus Biopharma», II фаза КИ) включает 3 миРНК, комплементарные фрагментам S и X генов HBV, которые заключены в липидные наночастицы. При внутривенном введении 1 раз в неделю в исследованиях дает синергетический эффект при комбинации с энтекавиром или АВ-423. Эта же компания выводит во II фазу КИ свой препарат второго поколения ARB-1740, демонстрирующий в 10 раз более высокую активность по сравнению с ARB-1467 [38].

На I/II стадии КИ находится препарат компании «Alylam ALN-HBV», который представляет собой миРНК, конъюгированную с N-ацетилгалактозаминном и нацеленную на высококонсервативный фрагмент X гена HBV. Особая форма конъюгата с повышенной стабильностью позволяет вводить препарат подкожно 1 раз в месяц и добиваться высокой терапевтической эффективности [39].

Несомненными достоинствами подхода на основе миРНК являются его универсальность, возможность быстрой адаптации к новым вариантам вируса, разработки препаратов пролонгированного действия, а также механизм действия, основанный на подавлении экспрессии генов. Из недостатков следует упомянуть инъекционный способ введения и чувствительность к мутациям в геноме вируса. Кроме того, в ряде работ показано, что при использовании миРНК возможны такие нежелательные эффекты, как неспецифическая активация иммунной системы, связывание с нецелевой мРНК, нарушение процессинга микроРНК в клетке и нарушение посттранскрипционной регуляции генов. Поэтому вопрос безопасности использования технологии РНК-интерференции остается весьма актуальным.

**Экспериментальные методы лечения ХГВ: иммуномодулирующая терапия.** *Усиление иммунного ответа.* Хорошо известно, что патогенез ХГВ определяется иммунными механизмами. Слабовыраженный Т-клеточный ответ на этапе острой инфекции играет решающую роль в развитии хронического процесса. Повреждение гепатоцитов при ХГВ опосредовано иммунными реакциями. HBV обладает способностью подавлять врожденный и адаптивный иммунный ответ, используя различные тактики. По этим причинам иммуномодулирующие методы терапии играют важную роль в лечении ХГВ. Иммунный механизм разрушения ккзДНК HBV описан J. Lucifora и соавт. [40], которые в эксперименте показали, что индукция внутрипеченочного противовирусного иммунного ответа может вызывать стимуляцию нецитолитического расщепления ккзДНК в инфицированных гепатоцитах. Под воздействием высоких доз ИФН- $\alpha$  и агонистов LT $\beta$ R происхо-

дило повышение уровня дезаминаз АРОВЕС3А и АРОВЕС3В, которые вызывали образование апуриновых/апиримидиновых сайтов (АРС) в ккзДНК без повреждения ДНК генома клетки. АРОВЕС3А и АРОВЕС3В — одни из немногих факторов, которые могут напрямую действовать на ккзДНК. Они локализируются вместе с белком НВс и транспортируются в ядро, где дезаминируют матрицы ккзДНК. Дезаминазы способны взаимодействовать с одноцепочечной ДНК, таким образом, ккзДНК может быть подвержена действию дезаминаз только в транскрипционно активном состоянии.

При действии дезаминаз происходит замена гуанина на урацил, который распознается гликозилазами клетки и отщепляется с образованием АРС. Они в свою очередь расщепляются эндонуклеазами, что приводит к деградации молекул ккзДНК. Почему происходит расщепление ккзДНК, а не ее репарация, пока неясно, однако авторы высказали предположение, что количество АРС оказывается слишком велико, и репарационные механизмы не способны справиться с таким количеством повреждений. Использование препаратов, индуцирующих действие дезаминаз АРОВЕС, в комбинации с другими противовирусными агентами может стать эффективным терапевтическим подходом для лечения ХГВ. Агонисты LT $\beta$ R активны даже при использовании в низких дозах в отличие от ИФН- $\alpha$  и не оказывают токсического действия на клетки *in vivo* и *in vitro* [40].

Семейство Toll-подобных рецепторов (TLR) — важнейший регулятор обеих ветвей иммунитета, который активируется в ответ на внедрение широкого спектра патогенов [41]. Стимуляция TLR патогеном приводит к экспрессии многих генов, таких как ко-стимулирующие молекулы и провоспалительные цитокины [42]. Выяснилось, что экспрессия TLR на гепатоцитах понижает уровень продукции НВV [43]. Это свидетельствует, что активация иммунного ответа, опосредованная TLR, может контролировать инфекцию НВV. Препарат GS-9620 («Gilead Sciences», II фаза КИ), селективный агонист TLR7, снижает уровень ДНК НВV у шимпанзе с хронической инфекцией НВV [44]. В I фазе КИ показана безопасность препарата у 75 здоровых волонтеров, а также его способность активировать экспрессию генов, стимулированных ИФН, у пациентов с ХГВ [45].

**Ингибиторы контрольных точек иммунного ответа.** Контрольные точки иммунного ответа, или иммунные контрольные точки (ИКТ, англ.: immune checkpoints) — семейство молекул, которые стимулируют или подавляют реакции клеточного иммунитета. Они играют ключевую роль в поддержании гомеостаза иммунной системы и предотвращении аутоиммунного ответа. Одной из ингибирующих ИКТ является рецептор программированной смерти клеток PD-1, который способен инактивировать клетки иммунной системы при взаимодействии со своими лигандами PD-L. У пациентов с ХГВ наблюдали повышение экспрессии PD-1 на Т-клетках CD8(+) [46]. Блокирование PD-1 увеличивает пролиферацию Т-клеток CD8(+) и продукцию ИФН- $\gamma$  в лимфоцитах [47]. Таким образом, блокирование ингибирующих ИКТ может усилить противовирусный иммунный ответ. Эффективность подобного подхода уже доказана, и он используется в практике при лечении ряда онкологических заболеваний. Комбинация новых иммуномодулирующих агентов с прямыми проти-

вовирусными препаратами может стать перспективным подходом к лечению больных ХГВ.

## Заключение

Хронические гепатиты В и С как в мире, так и в России являются главными причинами цирроза и рака печени, смертность от которых ежегодно возрастает. Благодаря бурному развитию биомедицинской науки и новых технологий разработки лекарственных средств, всего за несколько лет создано более десятка высокоэффективных противовирусных препаратов, которые не оставили шанса вирусному гепатиту С — в настоящее время это заболевание полностью излечимо. Излечение от гепатита В — значительно более трудная задача, однако результаты современных исследований позволяют надеяться на успех.

Ключевой мишенью в жизненном цикле НВV является ккзДНК, элиминация которой будет означать полное излечение от инфекции. Среди новых групп лекарственных препаратов, находящихся на разных стадиях разработки, каждая обладает рядом достоинств и недостатков. Показавшие высокую эффективность и хорошую переносимость ингибиторы связывания НВV с рецептором NTCP позволяют предотвращать проникновение вируса в неинфицированные клетки, но не воздействуют на ккзДНК. При прекращении приема этих препаратов происходит реактивация ХГС. Ингибиторы синтеза ккзДНК снижают образование ккзДНК *de novo*, однако ранее накопленные матрицы продолжают персистировать в клетках печени. Ингибиторы сборки нуклеокапсидов не только подавляют сборку вирионов, но и действуют на неканонические функции соге-белка НВV. Тем самым негативное влияние НВV на организм снижается в большей степени. Технология РНК-интерференции не просто прерывает цикл НВV, но полностью останавливает образование вирусных белков — НВx, НВs и НВc, с которыми связана трансформация клеток и развитие гепатоцеллюлярной карциномы. Препараты, усиливающие иммунный ответ, и ингибиторы ИКТ в целом эффективны, однако как терапевтический подход могут быть использованы только в комбинации с препаратами прямого действия. Одна общая особенность каждой из перечисленных групп состоит в том, что они не действуют на ккзДНК НВV и позволяют достичь в лучшем случае «функционального» излечения. Персистирующие ккзДНК сохраняются в клетке, и прекращение приема препаратов почти всегда приводит к реактивации инфекции.

По мнению авторов, технологии сайт-специфического расщепления ккзДНК — наиболее перспективная в настоящее время стратегия, на основе которой могут быть созданы подходы, позволяющие добиться полного излечения от ХГВ. Системы нуклеаз пока находятся на ранних этапах разработки и еще многое предстоит сделать для доказательства их эффективности и безопасности, но обнадеживающие результаты последних исследований не оставляют сомнений в том, что уже в недалеком будущем CRISPR/Cas и аналогичные технологии могут стать основой терапии ХГВ.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.**

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16-15-10426.



## ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Global Hepatitis Report 2017. Geneva: World Health Organization; 2017.
2. Falade-Nwulia O, Suarez-Cuervo C, Nelson DR, Fried MW, Segal JB, Sulkowski MS. Oral Direct-Acting Agent Therapy for Hepatitis C Virus Infection: A Systematic Review. *Ann Intern Med.* 2017;166(9):637-648. <https://doi.org/10.7326/M16-2575>
3. Bremer C, Glebe D. The Molecular Virology of Hepatitis B Virus. *Seminars in Liver Disease.* 2013;33(02):103-112. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345717>
4. Habig J, Loeb D. Template Switches during Plus-Strand DNA Synthesis of Duck Hepatitis B Virus Are Influenced by the Base Composition of the Minus-Strand Terminal Redundancy. *Journal of Virology.* 2003;77(23):12412-12420. <https://doi.org/10.1128/jvi.77.23.12412-12420.2003>
5. Yang H, Kao J. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerging Microbes & Infections.* 2014;3(9):e64. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.64>
6. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *Journal of Hepatology.* 2005;42(3):302-308. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2004.12.015>
7. Block T, Guo J. The Covalently Closed Circular Form of Hepatitis B Virus Genome: Is There Now an End in «Site»? *Gastroenterology.* 2016;150(1):34-36. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.11.032>
8. Pollicino T, Belloni L, Raffa G et al. Hepatitis B Virus Replication Is Regulated by the Acetylation Status of Hepatitis B Virus cccDNA-Bound H3 and H4 Histones. *Gastroenterology.* 2006;130(3):823-837. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.001>
9. Bock C, Schwinn S, Locarnini S et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *Journal of Molecular Biology.* 2001;307(1):183-196. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4481>
10. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015;64(12):1972-1984. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
11. Vierling J. The Immunology of Hepatitis B. *Clinics in Liver Disease.* 2007;11(4):727-759. <https://doi.org/10.1016/j.cld.2007.08.001>
12. Busca A, Kumar A. Innate immune responses in hepatitis B virus (HBV) infection. *Virology Journal.* 2014;11(1):22. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-11-22>
13. Chisari F, Isogawa M, Wieland S. Pathogenesis of hepatitis B virus infection. *Pathologie Biologie.* 2010;58(4):258-266. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2009.11.001>
14. European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2017;67(2):370-398. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.03.021>
15. Wang J, Shen T, Huang X et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. *Journal of Hepatology.* 2016;65(4):700-710. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029>
16. Liu S, Seto W, Lai C, Yuen M. Hepatitis B: treatment choice and monitoring for response and resistance. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology.* 2016;10(6):697-707. <https://doi.org/10.1586/17474124.2016.1145547>
17. Wang Y-C, Yang S-S, Su C-W, et al. Predictors of response to pegylated interferon in chronic hepatitis B: a real-world hospital-based analysis. *Scientific Reports.* 2016;6:29605. <https://doi.org/10.1038/srep29605>
18. Yan H, Li W. Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide Acts as a Receptor for Hepatitis B and D Virus. *Digestive Diseases.* 2015;33(3):388-396. <https://doi.org/10.1159/000371692>
19. Volz T, Allweiss L, MBarek M et al. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *Journal of Hepatology.* 2013;58(5):861-867. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.008>
20. Rizzo T, Urban S. Myrcludex B Therapy Reduced HBV DNA and HDV RNA in Phase 2a Clinical Trial. *MD Conference Express.* 2014;14(48):19-20. <https://doi.org/10.1177/155989771448014>
21. Cai D, Mills C, Yu W et al. Identification of Disubstituted Sulfonamide Compounds as Specific Inhibitors of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2012;56(8):4277-4288. <https://doi.org/10.1128/aac.00473-12>
22. Allweiss L, Dandri M. The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses.* 2017;9(6):156. <https://doi.org/10.3390/v9060156>
23. Kennedy E, Bassit L, Mueller H et al. 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. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.001>
24. 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 Research.* 2015;118:110-117. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.03.015>
25. Seeger C, Sohn J. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9. *Molecular Therapy — Nucleic Acids.* 2014;3:e216. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.68>
26. Lin S, Yang H, Kuo Y et al. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo. *Molecular Therapy — Nucleic Acids.* 2014;3:e186. <https://doi.org/10.1038/mtna.2014.38>
27. Wang J. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication. *World Journal of Gastroenterology.* 2015;21(32):9554. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i32.9554>
28. Zhen S, Hua L, Liu Y et al. Harnessing the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated Cas9 system to disrupt the hepatitis B virus. *Gene Therapy.* 2015;22(5):404-412. <https://doi.org/10.1038/gt.2015.2>
29. Liu X, Chen Y, Guo D, Chen S, Hao R. Inhibition of hepatitis B virus by the CRISPR/Cas9 system via targeting the conserved regions of the viral genome. *Journal of General Virology.* 2015;96(8):2252-2261. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000159>
30. Ramanan V, Shlomai A, Cox D et al. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Scientific Reports.* 2015;5(1). <https://doi.org/10.1038/srep10833>
31. Karimova M, Beschorn N, Dammermann W et al. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Scientific Reports.* 2015;5(1). <https://doi.org/10.1038/srep13734>
32. Yuen M.-F., Kim D.J., Weiler F. et al. NVR 3-778, a First-in-Class HBV Core Inhibitor, Alone and in Combination with Peg-Interferon (PegIFN), in Treatment-Naive HBeAg-Positive Patients: Early Reductions in HBV DNA and HBeAg. *Journal of Hepatology.* 2016;64(2):S210-S211. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(16\)00175-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(16)00175-6)
33. Ren Q, Liu X, Luo Z, Li J, Wang C, Goldmann S, Zhang J, Zhang Y. Discovery of hepatitis B virus capsid assembly inhibitors

- leading to a heteroaryldihydropyrimidine based clinical candidate (GLS4). *Bioorg Med Chem*. 2017;25(3):1042-1056. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2016.12.017>
34. Huang Q, Mercier A, Zong Y et al. Preclinical Characterization of Potent Core Protein Assembly Modulators for the Treatment of Chronic Hepatitis B. *Journal of Hepatology*. 2017;64(2):S584. [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278\(16\)01072-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-8278(16)01072-2)
  35. Mani N, Cole AG, Ardzinski A et al. The HBV capsid inhibitor AB-423 exhibits a dual mode of action and displays additive/synergistic effects in in vitro combination studies. *Hepatology*. 2016; 64(1 Suppl):123A-124A. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28796>
  36. Yang H, Kao J. Viral hepatitis: HBV cure — can we pin our hopes on immunotherapy? *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 2015;12(3):129-131. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2015.8>
  37. Gish R, Yuen M, Chan H et al. Synthetic RNAi triggers and their use in chronic hepatitis B therapies with curative intent. *Antiviral Research*. 2015;121:97-108. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.019>
  38. Thi EP, Ye X, Dhillon AP et al. Development of Second Generation RNA Interference Therapy for Hepatitis B Virus Infection. *Hepatology*. 2016;64(1,Suppl):922A. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28800>
  39. Sepp-Lorenzino L, Sprague AG, Mayo T et al. GalNAc-siRNA conjugate ALN-HBV targets a highly conserved, pan-genotypic X-orf viral site and mediates profound and durable HBsAg silencing in vitro and in vivo. *Hepatology*. 2015;6(1?Suppl):224A-225A. <http://dx.doi.org/10.1002/hep.28171>
  40. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*. 2014;343:1221-1228. <https://doi.org/10.1126/science.1243462>
  41. Aderem A, Ulevitch R. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000;406(6797):782-787. <https://doi.org/10.1038/35021228>
  42. Takeda K. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology*. 2004;17(1):1-14. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh186>
  43. Funk E, Kottlilil S, Gilliam B, Talwani R. Tickling the TLR7 to cure viral hepatitis. *Journal of Translational Medicine*. 2014;12(1):129. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-129>
  44. Lanford R, Guerra B, Chavez D 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(7):1508-1517.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.02.003>
  45. Gane E, Lim Y, Gordon S et al. The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2015;63(2):320-328. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.02.037>
  46. Peng G, Luo B, Li J et al. Hepatitis B e-antigen Persistence is Associated with the Properties of HBV-Specific CD8 T Cells in CHB Patients. *Journal of Clinical Immunology*. 2010;31(2):195-204. <https://doi.org/10.1007/s10875-010-9483-5>
  47. 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. *Journal of Hepatology*. 2014;61(6):1212-1219. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2014.07.005>

Поступила 30.08.17