



Fármacos en desarrollo contra la hepatitis B dirigidos al ADNccc

Drugs in Development for Hepatitis B Targeting cccDNA

Robert G. Gish, M.D.¹

¹Hepatitis B Foundation, Doylestown, Pennsylvania.

RESUMEN

Para eliminar por completo la infección por el virus de la hepatitis B (VHB), se requeriría la erradicación total del ADN circular cerrado de forma covalente (ADNccc), el minicromosoma que proporciona la plantilla para la transcripción de todos los ARNm virales. El ADNc nuclear se acumula en los núcleos de los hepatocitos donde persiste como un epigenoma estable. Debido a que el genoma del virus de la hepatitis B está integrado en la célula huésped con esta persistencia de ADNccc, hoy no existe una cura completa en la que se elimine todo el ADNccc y el virus integrado, pero se considera el objetivo final de futuras terapias. Las docenas de tratamientos experimentales contra la hepatitis B crónica (HBC) que se están desarrollando actualmente se dividen en dos categorías principales: antivirales de acción directa que impiden la replicación viral en un punto específico y agentes dirigidos al huésped que modifican la función de la célula huésped de manera que inhiben la replicación viral, incluidos los inmunomoduladores y agentes que se dirigen a otras funciones de *host*. Cada uno de estos puede apuntar al ADNccc directa o indirectamente. Aquí se analizan los agentes que se encuentran actualmente en la etapa clínica de desarrollo para el tratamiento de HBC que se dirigen directamente al ADNccc y los que pueden afectar el ADNccc indirectamente.

Palabras clave: virus de la hepatitis B; antivirales; inmunomoduladores; ADNccc.

Introducción

En todo el mundo, aproximadamente 292 millones de personas están infectadas crónicamente con el virus de la hepatitis B (VHB),⁽¹⁾ aproximadamente 75 % de las cuales reside en Asia y 12 % en África.⁽²⁾ Aunque la prevalencia de la hepatitis B crónica (HBC) es mucho menor en los países occidentales; se estima que incluso en los EE. UU., hasta 2,2 millones de personas pueden estar infectadas crónicamente.⁽³⁾ En Cuba, no hay datos epidemiológicos suficientes para estimar con precisión la prevalencia nacional de HBC, pero desde la inclusión de la vacuna contra la hepatitis B en el Programa Nacional de Inmunización en 1992 ha habido una disminución en los casos anuales reportados.⁽⁴⁾

La HBC es una de las principales causas de enfermedad hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular (CHC) en todo el mundo.⁽¹⁾ En Cuba, la cirrosis hepática fue la novena causa principal de muerte en 2018.⁽⁵⁾ Por lo tanto, existe un considerable interés en el desarrollo de terapias eficaces contra la HBC.

Las únicas terapias actualmente aprobadas son el tratamiento a largo plazo con análogos de nucleósidos (NUC) y un curso finito de interferón alfa pegilado (PEG-IFN- α).⁽⁶⁾ Aunque estas terapias tienen beneficios sustanciales —disminuyen los riesgos de CHC y descompensación hepática, y aumentan de la supervivencia—,⁽⁶⁻⁸⁾ generalmente no ocurre la eliminación del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg). La pérdida de HBsAg se observa solo en el 3-8 % de los pacientes con HBC HBeAg negativo o HBeAg positivo a las 48-52 semanas de tratamiento con PEG-IFN- α .^(6,9,10) La pérdida de HBsAg está en el mismo rango para los pacientes que reciben NUC terapia, que solo ocurre en el 0 al 11,8 % de pacientes HBeAg positivos y el 0,3 al 5 % de pacientes HBeAg negativos incluso después de varios años de terapia.⁽¹¹⁻¹⁴⁾ Por lo tanto, son de gran interés nuevas terapias que podrían aumentar sustancialmente la pérdida de HBsAg y potencialmente permitir la terapia.

Para eliminar por completo la infección por el VHB, se requeriría la erradicación total del ADN circular cerrado de forma covalente (ADNccc), el minicromosoma que proporciona la plantilla para la transcripción de todos los ARNm virales,⁽¹⁵⁻¹⁷⁾ El ADNc nuclear se acumula en los núcleos de los hepatocitos donde persiste como un epigenoma estable.^(16,18,19) Debido a que el genoma del virus de la hepatitis B está integrado en la célula huésped con esta

persistencia de ADNcc, hoy no existe una cura completa en la que se elimine todo el ADNcc y el virus integrado, pero se considera el objetivo final de futuras terapias.⁽²⁰⁾

Fármacos en desarrollo

Las docenas de tratamientos experimentales contra la HBC que se están desarrollando en la actualidad se dividen en dos categorías principales: (1) antivirales de acción directa (AAD) que impiden la replicación viral en un punto específico y (2) agentes dirigidos al huésped que modifican la función de la célula huésped de manera que inhiben la replicación viral, incluidos los moduladores inmunes y los agentes que se dirigen a otras funciones del huésped.⁽²¹⁾ Cada uno de estos puede dirigirse al ADNcc directa o indirectamente. En este estudio se analizan los agentes que se encuentran hoy en la etapa clínica de desarrollo para el tratamiento contra la HBC que se dirigen directamente al ADNcc y los que pueden afectar el ADNc indirectamente. En la [tabla](#) se muestra un resumen más amplio de los agentes en desarrollo para el tratamiento de la HBC.

Tabla - Fármacos en desarrollo para el tratamiento de la HBC

Antivirales de acción directa: se dirigen al virus e interfieren en el proceso de replicación del VHB		
Silenciando ARN (siRNA): interfieren y destruyen el ARN viral		
Fármacos/Compuestos	Mecanismo de acción	Fase de desarrollo
VIR-2218	Silenciadores de genes de ARNi	Fase II
RG6004	Silenciadores de genes de ARNi	Fase I/II
ARO-VHB	Silenciadores de genes de ARNi	Fase I/II
AB-729	Silenciadores de genes de ARNi	Fase I
DCR-VHBS	Silenciadores de genes de ARNi	Fase I
BB-103	Silenciadores de genes de ARNi	Preclínica
Lunar-HBV	Silenciadores de genes de ARNi	Preclínica
Silenciadores de genes de ARNi inhibidor de entrada: impide que el VHB se introduzca en las células del hígado		
Bulevirtide (Myrcludex B)	Inhibidor de entrada	Fase IIb
Inhibidores de la cápsida: interfiere con el escudo de la proteína del ADN viral		

Morphothiadin	Inhibidor de la cápsida	Fase II
JNJ 56136379	Inhibidor de la cápsida	Fase II
ABI-H0731	Inhibidor de la cápsida	Fase II
ABI-H2158	Inhibidor de la cápsida	Fase I
RG7907	Inhibidor de la cápsida	Fase I
QL-007	Inhibidor de la cápsida	Fase I
EDP-514	Inhibidor de la cápsida	Fase I
GLP-26	Inhibidor de la cápsida	Preclínica
ABI-H3733	Inhibidor de la cápsida	Preclínica
CB-HBV-001	Inhibidor de la cápsida	Preclínica
Inhibidores de HBsAg: interfieren con la producción de antígeno de superficie del VHB (sAg)		
REP 2139	Inhibidor de sAg	Fase II
REP 2165	Inhibidor de sAg	Fase II
Moléculas antisentido: se unen al ARNm viral para evitar que se convierta en proteína viral		
IONIS-HBVRx	Inhibidor de la proteína viral	Fase II
IONIS-HBVLRx	Inhibidor de la proteína viral	Fase II
Antivirales de acción indirecta: se dirigen al sistema inmunitario humano para atacar el VHB		
Vacunas terapéuticas: tecnología de vacuna utilizada para estimular el sistema inmunitario como tratamiento		
AIC 649	Vacuna terapéutica	Fase I
INO-1800	Vacuna terapéutica	Fase I
HB-110	Vacuna terapéutica	Fase I
TG1050	Vacuna terapéutica	Fase I
HepTcell	Vacuna terapéutica	Fase I
JNJ 64300535	Vacuna terapéutica	Preclínica
HBV	Vacuna terapéutica	Preclínica
VBI-2601	Vacuna terapéutica	Preclínica
Chimigen HBV	Vacuna terapéutica	Preclínica

CARG-201	Vacuna terapéutica	Preclínica
Vía de defensa inmune innata: compuestos que activan el sistema inmunitario innato		
Inarigivir	Agonista RIG-1 y NOD2	Fase II
GS9688	Agonista de TLR-8	Fase I

Antivirales de acción directa

Oligonucleótidos antisentido

Múltiples oligonucleótidos antisentido (ASO) están en desarrollo. Se cree que pueden producir una disminución en el ADNccc al bloquear la producción del núcleo y la formación de la cápsida. En un modelo de pato, se ha demostrado que el uso de ASO a base de polietilenimina produce reducciones significativas en la viremia, el ADN del VHB intrahepático, el ARN del VHB y las proteínas de la superficie y del núcleo.⁽²²⁾ Esto puede representar un efecto sobre el ADNccc en el núcleo. También se sabe que los ASO pueden regular negativamente el receptor 1 de asialoglicoproteína (ASGPR1) que regula el VHB, bloqueando así la replicación del VHB al inhibir la endocitosis hepática del VHB.

Inhibidores de la formación de ADNc y la transcripción

La represión del ADNccc puede ocurrir bloqueando su formación, expresión o estabilidad.⁽²¹⁾ Los estudios celulares han demostrado que podría haber agentes que podrían disminuir o eliminar el ADNccc. Se ha demostrado que dos sulfonamidas desustituidas (DSS) —CCC-0975 y CCC-0346—, inhiben la formación de ADNccc a partir de ADNrc al suprimir la desproteínización de ADNrc. Se demostró que CCC-0975 reduce la biosíntesis de ADNccc.⁽²³⁾ En otro enfoque, los estudios celulares han demostrado que la activación del receptor de linfotóxina β (LT β R) con un anticuerpo bioespecífico tetravalente superagonista (BS1) y un anticuerpo monoclonal anti-LT β R bivalente (CBE11) da como resultado una degradación no hepatotóxica del ADNc de CCC.⁽²⁴⁾ La inhibición de la formación de ADNc también se ha logrado atacando el genoma viral del VHB con endonucleasas que incluyen meganucleasas, activadoras de la transcripción como nucleasas efectoras (TALEN),

nucleasas de dedos de zinc (ZFN) y la herramienta CRISPR de edición genómica⁽²⁵⁾ (agrupada, regularmente entre espacios, repetición palindrómica corta) / Cas 9.

Inhibidores del núcleo/cápsida

Se han desarrollado varios agentes que contrarrestan la replicación del ADN del VHB al perturbar las cápsidas o contrarrestar el ensamblaje de las partículas del núcleo.⁽²⁶⁾ El resultado puede ser una disminución de los niveles de ADNc. Se incluyen en esta clase las heteroarildihidropirimidinas (HAP) Bay 41-4109, HAP-1, GLS-4, HAP-18 y NVR-010-001-E2.^(27,28)

Inhibidores de la liberación de HBsAg

En otro enfoque, los polímeros de ácido nucleico (NAP) se han estudiado debido a su capacidad para inhibir las interacciones de proteínas involucradas en la replicación viral. Su posible efecto sobre el ADNccc es hipotético a través de reducciones en los niveles de HBcrAg y HBV RNA en la sangre. En un pequeño estudio de 12 pacientes tratados con el inhibidor de la liberación de NAP HBsAg REP 2139-Ca seguido, en los respondedores, de peginterferón alfa-2a y timosina alfa-1, hubo una disminución sustancial en los niveles de ADN de VHB y HBsAg, pero continuó la disminución del ADN del VHB fuera del tratamiento antes del rebote posterior.⁽⁶⁷⁾ Este agente se encuentra actualmente en ensayos clínicos de fase I y II en combinación con Peg-IFN y TDF.

Inhibidores de la transcriptasa inversa

Debido a que los inhibidores de la transcriptasa inversa (RT) análogos de nucleósidos (NUC) no suprimen directamente la transcripción o traducción viral del ADNccc, no se consideran inhibidores principales del ADNccc. Sin embargo, se ha observado una reducción de 1-2 log en el ADNccc en algunos estudios en tejido hepático donde podrían medirse los niveles de ADNccc. La clevidina, un NUC aprobado para el tratamiento del VHB en Corea del Sur y Filipinas,⁽²⁹⁾ ya no se usa como agente individual debido a los efectos adversos (miopatía) y la resistencia a los medicamentos, pero se usa en dosis más bajas en combinación con adefovir.⁽³⁰⁻³²⁾ La forma de clevidina que se cree que puede afectar los niveles de ADNccc a través de un nuevo mecanismo está entrando en los ensayos de fase I.

Aunque *Lai* y otros informaron que el tratamiento prolongado con NUC (mediana de 126 meses), redujo significativamente el ADNccc, también demostraron que, aunque reducido, los niveles séricos de HBsAg permanecieron detectables en 42 de 43 pacientes.⁽³³⁾ El tratamiento a largo plazo con NUC puede estar asociado con toxicidad y resistencia a los medicamentos.^(34,35) Por lo tanto, es necesario identificar compuestos que puedan conducir a la erradicación del virus.

Terapias de interferencia de ARN

Las terapias de interferencia de ARN (ARNi) se dirigen directamente a las transcripciones de ARNm del virus de la hepatitis B y se ha demostrado que lo hacen con alta especificidad. Reducen la producción de HBsAg y HBcAg mediante el uso de pequeños ARN no codificantes que regulan la expresión de información genética.⁽³⁶⁾ Esto puede restaurar la inmunidad del huésped⁽³⁷⁾ y disminuir la reposición de ADNccc.

Agentes de destino de *host*

En esta categoría se incluye una amplia variedad de agentes que modifican varios aspectos de la función de la célula huésped de manera que inhiben la replicación viral. Estos agentes pueden subdividirse en términos generales en inmunomoduladores y agentes que se dirigen a otras funciones del huésped.⁽²¹⁾ Tales agentes dirigidos al huésped pueden ser capaces de aumentar la inmunidad innata y adaptativa, lo que ayuda a eliminar los hepatocitos infectados con el VHB.

Genomanipulación de las células T

La genomanipulación de las células T está proyectada para aumentar la atracción de los receptores de células T para antígenos específicos. Los estudios preclínicos han sido prometedores. En ratones transgénicos con VHB, se demostró que las células T CD8 (+) diseñadas para expresar los receptores de antígeno quimérico (VCA) específicos del VHB reconocen múltiples subtipos de VHB y pueden injertarse y expandirse, localizándose en el hígado y disminuyendo rápidamente la replicación del VHB.⁽³⁸⁾ En un importante estudio reciente realizado por *Protzer* y otros, en células de hepatoma infectadas con VHB, el cocultivo con células T diseñadas para expresar receptores de células T de alta afinidad

específicos para proteínas del núcleo o envoltura del VHB condujo a niveles indetectables de ADNccc y antígenos virales.⁽³⁹⁾

En ratones humanizados infectados con VHB, la transferencia adoptiva de células T injertadas en receptores de células T condujo a la eliminación de los hepatocitos infectados con VHB y a una disminución importante en la carga viral de VHB y el ADNc del ADN.⁽³⁹⁾ También se planea un ensayo clínico de terapia con células T modificadas en pacientes con CHC asociado al VHB. Aunque prometedor, el alto costo de esta terapia individualizada y los graves efectos adversos observados en otras enfermedades en las que se ha estudiado sin duda limitarán su uso, especialmente en el mundo en desarrollo.

Inhibidores de entrada

Los inhibidores de entrada podrían bloquear la entrada del VHB en los hepatocitos, incluso antes de que se forme ADNc.⁽⁴⁰⁾ Funcionan bloqueando la unión del VHB al receptor o receptores de células o la unión del VHB a los hepatocitos.⁽⁴¹⁾ El Myrcludex B es un péptido sintético N-miristoilado que se une competitivamente al receptor del polipéptido cotransportador de taurocolato de sodio (NTCP), evitando así que el VHB ingrese a los hepatocitos.⁽⁴²⁾ En un estudio se demostró que Myrcludex B previene la propagación del virus intrahepático en ratones humanizados y dificulta la amplificación del ADNccc intrahepático al bloquear la conversión de ADNrc a ADNccc.⁽⁴²⁾

Agentes inmunomoduladores

Se ha trabajado mucho en los enfoques para alterar la respuesta inmunitaria al VHB con el fin de restaurar las respuestas inmunes antivirales efectivas. Hoy se están evaluando muchos agentes inmunomoduladores, incluidas vacunas terapéuticas, células T modificadas, agonistas de receptores tipo Toll, inhibidores del punto de control inmunológico y otros.

Agonistas de los receptores tipo Toll

Se sabe que el VHB reduce la actividad antiviral del receptor de peaje (TLR) de las células hepáticas.⁽⁴³⁾ Estos receptores son puntos clave en las respuestas inmunes porque detectan patógenos y estimulan la liberación de citocinas inflamatorias y las respuestas inmunes

adaptativas que siguen.⁽⁴⁴⁾ La estimulación TLR7 media una respuesta de interferón endógeno tipo I que es clave para desarrollar una inmunidad efectiva contra el VHB.⁽⁴⁵⁾ En estudios preclínicos, se ha demostrado la activación de respuestas inmunes innatas intrahepáticas con TLR 3/7/8/9 o agonistas STING suprime el VHB.⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾ Se probó que las dosis múltiples del agonista TLR7 GS-9620 administrado a los chimpancés dan como resultado reducciones significativas en la carga viral, HBsAg y HBeAg⁽⁵¹⁾, pero, después de que los ensayos de fase I no mostraron reducciones en los niveles de HBsAg o ADN del VHB con monoterapia,⁽⁵²⁾ su utilidad en combinación con TDF ahora se está estudiando en ensayos de fase II.⁽⁴⁴⁾

Otros moduladores inmunes y terapias asociadas

Los estudios actuales evalúan la restauración inmunitaria y los efectos coadyuvantes de la vacuna de ciertas citocinas y agonistas de los receptores de citocinas, que se cree que podrían eliminar el ADNccc. La SB 9200 es una terapia novedosa que puede no solo tener propiedades antivirales directas, sino también tener la capacidad de provocar respuestas inmunitarias endógenas mediadas por interferón (IFN) en células infectadas con VHB. Esto último se logra mediante la activación del gen 1 inducible por ácido retinoico (RIG-I) y la proteína que contiene el dominio de oligomerización de unión a nucleótidos 2 (NOD2). En marmotas, la dosificación diaria de SB 9200 durante 12 semanas dio como resultado reducciones sustanciales en la carga viral y en el antígeno de superficie, lo que se pensó que era el resultado de la supresión de la síntesis o transcripción de ADNccc.⁽⁵³⁾

Debido a que la efectividad de algunos inmunomoduladores puede verse reducida por los altos niveles de antígeno,⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾ se ha estudiado la herramienta de edición del genoma CRISPR (clúster, regularmente espaciada, repetición palindrómica corta) / Cas9 que se ha llamado un tipo de tijeras moleculares como un enfoque para eliminar el ADNc del VHB, tanto en los estudios celulares^(57,58) como en el uso de un modelo de ratón.⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ Aunque se espera que esta técnica finalmente pueda usarse para eliminar directamente el ADNccc, mejorando así la eficacia de ciertos inmunomoduladores,⁽⁴⁴⁾ estudios recientes muestran que puede dañar el ADN ubicado lejos del ADN objetivo,^(62,63) lo que ha llevado a los investigadores a tomar medidas de precaución adicionales según se desarrollan estas terapias.

Conclusiones

Aunque está claro que las terapias actuales contra el VHB reducen la progresión a la enfermedad hepática crónica y sus secuelas, se están estudiando muchos tratamientos diferentes con múltiples objetivos, incluidos los enfoques virológicos y los enfoques inmunitarios del huésped, para lograr el objetivo final: la eliminación del ADNccc.⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾ Casi todos estos enfoques se encuentran en ensayos preclínicos o de fase I o II. Hasta que se pueda lograr una verdadera cura esterilizante en la que se eliminen todos los ADNccc y los virus integrados, los enfoques que funcionan mejor contra la HBC pueden ser una combinación de terapias antivirales eficaces y agentes dirigidos al huésped. Los avances de la investigación han demostrado que este enfoque combinado puede conducir a lo que se ha denominado una cura funcional para la HBC en un futuro no muy lejano.

Referencias bibliográficas

1. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018;3:383-403.
2. Gust ID. Epidemiology of hepatitis B infection in the Western Pacific and South East Asia. *Gut* 1996;38 Suppl 2:S18-23.
3. Kowdley KV, Wang CC, Welch S, *et al.* Prevalence of chronic hepatitis B among foreign-born persons living in the United States by country of origin. *Hepatology.* 2012;56:422-433.
4. Marlen Ivon CF, Zaily DG, Conde-Eduardo Leda Patricia DS, *et al.* Current Condition of Chronic Hepatitis B Virus Infection in Cuban Adults. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2017;85:15-19.
5. Dirección de Registros Médicos y Estadísticas de Salud. Anuario estadístico de salud. La Habana: MINSAP; 2018. Disponible en: <http://www.sld.cu/sitios/dne/>
6. Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B: Update 2009. *Hepatology.* 2009;50:661-662.
7. Rijckborst V, ter Borg MJ, Cakaloglu Y, *et al.* A randomized trial of peginterferon alpha-2a with or without ribavirin for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:1762-1769.

8. Sung JJ, Tsoi KK, Wong VW, *et al.* Meta-analysis: Treatment of hepatitis B infection reduces risk of hepatocellular carcinoma. *Aliment Pharmacol Ther.* 2008;28:1067-1077.
9. Buster EHCJ, Janssen HLA. Antiviral treatment for chronic hepatitis B virus infection - immune modulation or viral suppression. *Neth J Med.* 2006;64:175-185.
10. Lampertico P. The royal wedding in chronic hepatitis B: The haves and the have-nots for the combination of pegylated interferon and nucleos(t)ide therapy. *Hepatology.* 2015;61:1459-1461.
11. Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, *et al.* Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology.* 2010;51:422-430.
12. Buti M, Tsai N, Petersen J, *et al.* Seven-year efficacy and safety of treatment with tenofovir disoproxil fumarate for chronic hepatitis B virus infection. *Dig Dis Sci.* 2015;60:1457-1464.
13. Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, *et al.* Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology.* 2006;131:1743-1751.
14. Pan CQ, Tong M, Kowdley KV, *et al.* High rates of viral suppression after long-term entecavir treatment of Asian patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2012;10:1047-1050 e1041.
15. Warner N, Locarnini S. Replication of hepatitis B virus. In: Boyer TD, Manns MP, Sanyal AJ, eds. *Zakim and Boyer's Hepatology: A Textbook of Liver Disease.* 6 ed. Philadelphia: Elsevier; 2012.
16. Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, *et al.* Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106:19975-19979.
17. Ohno M, Otsuka M, Kishikawa T, *et al.* Novel therapeutic approaches for hepatitis B virus covalently closed circular DNA. *World J Gastroenterol.* 2015;21:7084-7088.
18. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, *et al.* Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2009;51:581-592.
19. Zhu Y, Yamamoto T, Cullen J, *et al.* Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol.* 2001;75:311-322.
20. Gish RG, Given BD, Lai CL, *et al.* Chronic hepatitis B: Virology, natural history, current management and a glimpse at future opportunities. *Antiviral Res.* 2015;121:47-58.

21. Block TM, Rawat S, Brosgart CL. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. *Antiviral Res.* 2015;121:69-81.
22. Robaczewska M, Guerret S, Remy JS, *et al.* Inhibition of hepadnaviral replication by polyethylenimine-based intravenous delivery of antisense phosphodiester oligodeoxynucleotides to the liver. *Gene Ther.* 2001;8:874-881.
23. 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. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:4277-4288.
24. Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, *et al.* Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science.* 2014;343:1221-1228.
25. Cox DB, Platt RJ, Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nat Med.* 2015;21:121-131.
26. Wu G, Liu B, Zhang Y, *et al.* Preclinical characterization of GLS4, an inhibitor of hepatitis B virus core particle assembly. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57:5344-5354.
27. Deres K, Schroder CH, Paessens A, *et al.* Inhibition of hepatitis B virus replication by drug-induced depletion of nucleocapsids. *Science.* 2003;299:893-896.
28. Cole AG. Modulators of HBV capsid assembly as an approach to treating hepatitis B virus infection. *Curr Opin Pharmacol.* 2016;30:131-137.
29. Jang JH, Kim JW, Jeong SH, *et al.* Clevudine for chronic hepatitis B: antiviral response, predictors of response, and development of myopathy. *J Viral Hepat.* 2011;18:84-90.
30. Seok JI, Lee DK, Lee CH, *et al.* Long-term therapy with clevudine for chronic hepatitis B can be associated with myopathy characterized by depletion of mitochondrial DNA. *Hepatology.* 2009;49:2080-2086.
31. Kim SB, Song IH, Kim YM, *et al.* Long-term treatment outcomes of clevudine in antiviral-naive patients with chronic hepatitis B. *World J Gastroenterol.* 2012;18:6943-6950.
32. Tak WY, Yang JM, Kim BI, *et al.* A randomized, open-label study comparing low-dose clevudine plus adefovir combination therapy with clevudine monotherapy in naive chronic hepatitis B patients. *Hepatol Int.* 2014;8:375-381.
33. Lai CL, Wong D, Ip P, *et al.* Reduction of covalently closed circular DNA with long-term nucleos(t)ide analogue treatment in chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2017;66:275-281.

34. Scaglione SJ, Lok AS. Effectiveness of hepatitis B treatment in clinical practice. *Gastroenterology*. 2012;142:1360-1368 e1361.
35. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology*. 2009;137:1593-1608 e1591-1592.
36. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 2009;136:642-655.
37. Schlupe T, Lickliter J, Hamilton J, *et al*. Safety, tolerability and pharmacokinetics of ARC-520 Injection, an RNA interference-based therapeutic for the treatment of chronic hepatitis B virus infection, in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Drug Dev*. 2016:[Epub ahead of print].
38. Krebs K, Bottinger N, Huang LR, *et al*. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology*. 2013;145:456-465.
39. Wisskirchen K, Kah J, Malo A, *et al*. T cell receptor grafting allows virological control of Hepatitis B virus infection. *J Clin Invest*. 2019;129:2932-2945.
40. Kaneko M, Watashi K, Kamisuki S, *et al*. A novel tricyclic polyketide, vanitaracin A, specifically inhibits the entry of hepatitis B and D viruses by targeting sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol*. 2015;89:11945-11953.
41. Ye X, Zhou M, He Y, *et al*. Efficient inhibition of hepatitis B virus infection by a preS1-binding peptide. *Sci Rep*. 2016;6:29391.
42. Volz T, Allweiss L, Ben MM, *et al*. The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus. *J Hepatol*. 2013;58:861-867.
43. Wu J, Meng Z, Jiang M, *et al*. Hepatitis B virus suppresses toll-like receptor-mediated innate immune responses in murine parenchymal and nonparenchymal liver cells. *Hepatology*. 2009;49:1132-1140.
44. Pham EA, Perumpail RB, Fram BJ, *et al*. Future therapy for hepatitis B virus: role of immunomodulators. *Curr Hepatol Rep*. 2016;15:237-244.
45. Funk E, Kottlilil S, Gilliam B, *et al*. Tickling the TLR7 to cure viral hepatitis. *J Transl Med*. 2014;12:129.
46. Chang J, Guo JT. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure. *Antiviral Res*. 2015;121:152-159.

47. Menne S, Tumas DB, Liu KH, *et al.* Sustained efficacy and seroconversion with the Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 in the Woodchuck model of chronic hepatitis B. *J Hepatol.* 2015;62:1237-1245.
48. Wu J, Huang S, Zhao X, *et al.* Poly(I:C) treatment leads to interferon-dependent clearance of hepatitis B virus in a hydrodynamic injection mouse model. *J Virol.* 2014;88:10421-10431.
49. Jo J, Tan AT, Ussher JE, *et al.* Toll-like receptor 8 agonist and bacteria trigger potent activation of innate immune cells in human liver. *PLoS Pathog.* 2014;10:e1004210.
50. Huang LR, Wohlleber D, Reisinger F, *et al.* Intrahepatic myeloid-cell aggregates enable local proliferation of CD8(+) T cells and successful immunotherapy against chronic viral liver infection. *Nat Immunol.* 2013;14:574-583.
51. Lanford RE, 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;144:1508-1517, 1517 e1501-1510.
52. Gane EJ, Lim YS, Gordon SC, *et al.* The oral toll-like receptor-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2015;63:320-328.
53. Korolowicz KE, Iyer RP, Czerwinski S, *et al.* Antiviral efficacy and host innate immunity associated with SB 9200 treatment in the woodchuck model of chronic hepatitis B. *PLoS One.* 2016;11:e0161313.
54. Barnes E. Therapeutic vaccines in HBV: lessons from HCV. *Med Microbiol Immunol.* 2015;204:79-86.
55. Weng M, Zeng WZ, Wu XL, *et al.* Quantification of serum hepatitis B surface antigen in predicting the response of pegylated interferon alfa-2a in HBeAg-positive chronic hepatitis B with prior lamivudine exposure. *Virol J.* 2013;10:277.
56. Reignat S, Webster GJ, Brown D, *et al.* Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med.* 2002;195:1089-1101.
57. Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e216.
58. Karimova M, Beschorner N, Dammermann W, *et al.* CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep.* 2015;5:13734.
59. Dong C, Qu L, Wang H, *et al.* Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.* 2015;118:110-117.

60. Lin SR, Yang HC, Kuo YT, *et al.* The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2014;3:e186.
61. White MK, Hu W, Khalili K. The CRISPR/Cas9 genome editing methodology as a weapon against human viruses. *Discov Med.* 2015;19:255-262.
62. Haapaniemi E, Botla S, Persson J, *et al.* CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nat Med.* 2018;24:927-930.
63. Ihry RJ, Worringer KA, Salick MR, *et al.* p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells. *Nat Med.* 2018;24:939-946.
64. Lin CL, Yang HC, Kao JH. Hepatitis B virus: new therapeutic perspectives. *Liver Int.* 2016;36 Suppl 1:85-92.
65. Coffin CS, Lee SS. New paradigms in hepatitis B management: only diamonds are forever. *Br Med Bull.* 2015;116:79-91.
66. Petersen J, Thompson AJ, Levrero M. Aiming for cure in HBV and HDV infection. *J Hepatol.* 2016;65:835-848.
67. Al-Mahtab M, Bazinet M, Vaillant A, *et al.* Safety and Efficacy of Nucleic Acid Polymers in Monotherapy and Combined with Immunotherapy in Treatment-Naive Bangladeshi Patients with HBeAg+ Chronic Hepatitis B Infection. *PLoS One.* 2016;11:e0156667.