

PRACA POGLĄDOWA

Historia i przyszłość immunoterapii wirusowego zapalenia wątroby typu B

History and future approaches of immunotherapy of chronic HBV-infection

Jerzy Jaroszewicz

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny,
Białystok, Polska

ADRES DO KORESPONDENCJI: dr hab. med. Jerzy Jaroszewicz, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok, tel./faks: +48 85 741 69 21, e-mail: jerzy.jaroszewicz@umb.edu.pl

STRESZCZENIE

Konsekwencją długotrwałego zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus* – HBV) jest wielopoziomowe zaburzenie odpowiedzi immunologicznych związanych ze zjawiskami tolerancji i/lub wycieńczenia immunologicznego. Wynika to m.in. z wpływu antygenów wirusa, w tym HBsAg produkowanego w znacznym nadmiarze. Dotychczasowe próby immunomodulacji wykazywały ograniczoną efektywność wynikającą prawdopodobnie ze znacznego oddziaływania HBV na układ odpornościowy, a także zmienności wirusa. Istotnym przełomem ostatnich lat była obserwacja, że zmniejszenie stężenia HBV-DNA/HBsAg przed rozpoczęciem terapii immunomodulacyjnych (szczepionki terapeutyczne/IFN- α) zdecydowanie zwiększało ich skuteczność. Dało to początek skojarzonym terapiom sekwencyjnym złożonym z analogów nukleozydowych lub nukleotydydowych oraz pegylowanego interferonu (PEG-IFN), których skuteczność w zakresie eliminacji HBsAg sięga już około 20%. Wstępne wyniki badań nad nowymi lekami immunomodulującymi, takimi jak agoniści TLR-7, czy też nowe szczepionki terapeutyczne są obiecujące. Wydaje się jednak, że dopiero wprowadzenie inhibitorów cccDNA umożliwi eliminację HBV z organizmu. Przebieg przewlekłego zapalenia wątroby typu B jest złożony i wielofazowy, niezbędnym zatem jest również wieloczynnikowe podejście terapeutyczne. Podstawowymi elementami przyszłych schematów terapeutycznych, poza analogami nukleozydowymi lub nukleotydydowymi, będą leki immunomodulacyjne, inhibitory HBsAg oraz cccDNA. Dopiero tak kompleksowe podejście do leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu B pozwoli na eliminację HBV z organizmu.

SŁOWA KLUCZOWE: HBV, immunoterapia, interferon, antygen HBs, cccDNA.

ABSTRACT

Dysfunction of specific anti-HBV immune response (immune tolerance/exhaustion) is an important feature of persistent HBV infection. Among underlying factors the chronic effect of viral antigens exposure, especially HBsAg on lymphocytes should be stressed. Previous immunotherapies of chronic hepatitis B showed only modest efficacy, which was a consequence of significant influence of HBV on immune system as well as viral diversity. An important observation of last years was that decrease of HBV-DNA/HBsAg levels prior to start of immunotherapies (therapeutic vaccines/interferons) resulted in increasing efficacy. Such observation gave a basis for sequential therapies including nucleos(t)ide analogues and pegylatedinterferones with its effectiveness reaching 20% of HBsAg loss. Preliminary results of novel anti-HBV immunotherapies, including TLR-7 agonists or combined therapeutic vaccines are promising. However it seems that only introduction of cccDNA inhibitors should allow of complete elimination of HBV from infected hosts. The course of chronic hepatitis B is complex and dynamic, therefore our therapeutic strategies should also be multifactorial. Nucleos(t)ide analogues will be a backbone of future anti-HBV therapies but combined with immunomodulators, cccDNA and HBsAg inhibitors. Only such complex and broad approach will allow of complete eradication of HBV, therefore the cure of hepatitis B.

KEY WORDS: HBV, immunotherapy, interferon, HBs antigen, cccDNA.

WSTĘP

Głównymi cechami wirusa zapalenia wątroby typu B (*hepatitis B virus* – HBV) są łatwość przechodzenia zakażenia w formę przewlekłą, szczególnie u chorych z zaburzeniami odporności, oraz brak możliwości następczej eliminacji patogenu z organizmu. Wynika to z unikalnego cyklu replikacyjnego wirusa, którego polimeraza ma funkcję odwrotnej transkryptazy, co prowadzi do integracji materiału genetycznego wirusa, oraz przede wszystkim z wytwarzania stabilnego i odpornego na leczenie minichromosomu (*covalently closed circular DNA* – cccDNA), pozostającego w jądrze hepatocyta do końca jego życia. Pula cccDNA w hepatocytach pojawia się już w 24 godziny po zakażeniu. Nawet gdy antygen HBs i/lub HBV-DNA są już niewykrywalne w surowicy, cccDNA może pozostawać w wątrobie i w rezerwuarach pozawątrobowych [1]. W związku z tym aktualna sytuacja epidemiologiczna nie jest łatwa do określenia. Szacuje się, że u 360–400 milionów osób na świecie można wykryć HBsAg [2]. W Polsce liczbę osób zakażonych HBV ocenia się na 320 tysięcy, natomiast rokrocznie od 10 lat rozpoznaje się około 1,5 tysięcy zakażeń, w większości (> 96%) są to zakażenia przewlekłe [3]. Poważne przypadki ponownej aktywacji HBV u osób z niedoborami odporności wskazują, że obecność przeciwciał anti-HBc bez innych wykrywalnych markerów serologicznych sugeruje możliwość replikacji w wątrobie. Odsetek osób z obecnością przeciwciał anti-HBc szacuje się na około 15%. W jednej z polskich prac wśród 468 pacjentów z chorobami hematologicznymi aż u 21% stwierdzono obecność anti-HBc, która może wskazywać na potrzebę kontrolowania i profilaktyki reaktywacji HBV [4]. Dane te świadczą o tym, że zakażenie HBV w Polsce może być powszechniejsze, niż się obecnie uważa, a skuteczne metody terapii są istotne w kontroli zakażenia.

Obecnie w leczeniu przewlekłego zapalenia wątroby typu B (PZW typu B) w Polsce najczęściej stosuje się analogi nukleozydowe lub nukleotydydowe (AN) [5]. Preparaty te blokują polimerazę HBV, co prowadzi do supresji replikacji wirusa, jednak ich efekt utrzymuje się wyłącznie w trakcie przyjmowania leku. Przerwanie terapii w większości przypadków powoduje aktywację replikacji wirusa. Optymalny punkt docelowy terapii pozwalający na jej zaprzestanie, czyli serokonwersja HBsAg, występuje rzadko w przebiegu leczenia. Skutkuje to koniecznością wieloletniego, często dożywotniego, kontynuowania terapii [6]. W ostatnim badaniu obserwacyjnym obejmującym tysiące osób zakażonych HBV wykazano, że utrata HBsAg w przebiegu wieloletniego leczenia AN (lamiwudyna lub entekawir) występowała z częstością 0,33%

w ciągu 1. roku terapii [7]. Wpływ AN zarówno na zawartość cccDNA w wątrobie, jak i na rekonstrukcję swoistych odpowiedzi immunologicznych anti-HBV jest niepewny. Ponad 20% chorych w Polsce jest leczonych pegylowanym interferonem $\alpha 2a$ (PEG-IFN $\alpha 2a$). Leczenie to – co prawda obarczone działaniami niepożądanymi – jest określone czasowo i u części chorych może prowadzić do trwałej kontroli immunologicznej zakażenia, a w konsekwencji do serokonwersji HBsAg. Wykazano, że serokonwersję w układzie HBsAg osiąga do 15% leczonych chorych HBeAg-dodatnich w ciągu 5 lat po zakończeniu terapii [8]. Mechanizm działania interferonu jest złożony. Obejmuje nie tylko immunomodulację, lecz także niecytotolityczne niszczenie cccDNA, co zostało potwierdzone w najnowszych badaniach podstawowych [9]. W związku z niewątpliwym wpływem odpowiedzi immunologicznych na przebieg i możliwości leczenia przewlekłych zakażeń HBV immunoterapia jest pożądaną alternatywą dla obecnie stosowanych terapii supresyjnych. Istotne znaczenie ma jednak zrozumienie zależności pomiędzy aktywnością zakażenia HBV a funkcją układu odpornościowego.

WPŁYW ODPOWIEDZI IMMUNOLOGICZNYCH NA PRZEBIEG ZAKAŻENIA WIRUSEM ZAPALENIA WĄTROBY TYPU B

Dowody kliniczne wskazują na zależność pomiędzy aktywnością układu odpornościowego a chronicznością oraz przebiegiem zakażenia HBV. O ile ostre wirusowe zapalenie wątroby (WZW) typu B w wieku dorosłym ulega samoistnej eliminacji w 95–99% przypadków, o tyle zakażenia okołoporodowe oraz nabyte we wczesnym dzieciństwie zwykle przechodzą w fazę przewlekłą (> 90%). Zakażenia w tym okresie wiążą się z wysoką replikacją wirusa, brakiem aktywności zapalnej lub niewielką aktywnością oraz brakiem progresji włóknienia wątrobowego lub nieznaczną progresją. Jest to tzw. faza tolerancji immunologicznej (nosiicielstwa z wysokim HBV-DNA), w której przypadki spontanicznej eliminacji antygeny HBs są niezmiernie rzadkie [10]. W miarę dojrzewania układu odpornościowego u dorosłych chorych z HBeAg(+) (faza immunoreaktywacji) może nastąpić przełamanie tolerancji immunologicznej, serokonwersja HBeAg(+) oraz uzyskanie kontroli immunologicznej. Zwykle wiąże się to ze znaczną redukcją HBV-DNA, normalizacją aktywności aminotransferazy alaniny (AlAT) oraz małymi stężeniami antygeny HBs w surowicy. Naturalnie występująca serokonwersja HBeAg może być pierwszym etapem prowadzącym do fazy kontroli immunologicznej, tzw. stanu nosicielstwa HBsAg, oraz utraty HBsAg. Odsetek chorych osiągających serokonwersję

HBsAg wśród nieaktywnych nosicieli antygeny HBs wynosi 1–3% rocznie i przekracza ten obserwowany u chorych z supresją HBV-DNA uzyskany dzięki działaniu AN [11]. Stan nieaktywnego nosicielstwa antygeny HBs czy nawet serokonwersji w układzie HBsAg nie zawsze jest jednak trwały. Upośledzenie odporności wynikające z chorób współistniejących lub leczenia immunosupresyjnego często powoduje reaktywację wcześniej nieaktywnego zakażenia HBV. Warto tu wspomnieć o współzakażeniu HBV i wirusem zespołu nabytego braku odporności (*human immunodeficiency virus* – HIV) oraz reaktywacji HBV w czasie leczenia immunosupresyjnego. U chorych ze współinfekcją HBV i HIV częściej obserwuje się rozwój przewlekłego zakażenia HBV (do 25%), zwiększoną replikację HBV oraz szybszą progresję choroby, w tym rozwój marskości oraz raka wątrobowokomórkowego [12]. Podobnie u pacjentów z chorobami hematologicznymi, onkologicznymi oraz leczonych immunosupresyjnie częstość występowania reaktywacji HBV zależy od stopnia upośledzenia odporności i może sięgać 25–88%. Reaktywacje HBV stwierdza się częściej u pacjentów otrzymujących przeciwciała anti-CD20 (rytuksymab) oraz u biorców narządów, co jednoznacznie wskazuje na jatrogenną utratę kontroli immunologicznej nad replikacją HBV [13]. Jakie więc są wykładniki kontroli immunologicznej HBV?

KONTROLA IMMUNOLOGICZNA W PRZEWLEKŁYM ZAPALENIU WĄTROBY TYPU B

Analiza kliniczna oraz immunologiczna chorych, którzy osiągnęli stan kontroli immunologicznej, nosicieli HBsAg oraz osób po przebytych WZW typu B bez replikacji HBV dostarcza ważnych informacji pozwalających na zrozumienie mechanizmów kontroli oraz terapeutyczne próby ich odtworzenia. Skuteczna kontrola immunologiczna wiąże się z powstaniem limfocytów pomocniczych oraz cytotoksycznych skierowanych przeciwko antygenom wirusa oraz stałej syntezy przeciwciał anti-HBs. Limfocyty takich chorych wydzielają cytokiny Th1 (IFN- γ , TNF- α), namnażają się oraz mają aktywność cytotoksyczną w stosunku do hepatocytów zakażonych HBV. Taki stan kontroli obserwuje się jednak praktycznie wyłącznie po przebyciu ostrego WZW typu B. W przypadkach zakażeń przewlekłych dochodzi do dysfunkcji immunologicznej na różnych poziomach, nie tylko dotyczących limfocytów T, lecz także odporności wrodzonej, m.in. komórek NK, NKT oraz komórek prezentujących antygen [14].

Ostatnie badania, w tym prace własne autora, wskazują, że stan kontroli immunologicznej (nieaktywnego nosicielstwa HBsAg) wiąże się nie tylko z ni-

ską replikacją wirusa, lecz także z mniejszymi stężeniami antygeny powierzchniowego (HBs) w surowicy [15]. Chorzy, u których stężenia HBsAg są poniżej 1000 IU/ml, mają trwale obniżoną replikację wirusa, lecz także korzystne rokowanie oraz większą szansę na serokonwersję w układzie HBsAg [11]. Wydaje się, że duże stężenia antygenów wirusowych w surowicy mogą hamować odpowiedź immunologiczną, co jest jednym z mechanizmów ułatwiającym przetrwanie HBV w organizmie. W badaniach własnych stwierdzono m.in., że u chorych ze stabilnie niską replikacją HBV występuje nie tylko mniejsze stężenie antygeny HBs w surowicy, lecz także większe stężenie cytokiny IP-10 (CXCL-10, białka indukowanego interferonem γ), które może wskazywać na endogenną aktywację układu interferonu [16]. W najnowszych badaniach wykazano, że pacjenci z kontrolą immunologiczną mają także mniejsze stężenia interleukiny 10 (IL-10), która jest główną cytokiną immunoregulacyjną – hamującą odpowiedzi immunologiczne [17]. Wyniki te zostały potwierdzone przez innych autorów w badaniach, w których stężenie innego immunoregulatora – transformującego czynnika wzrostu β (*transforming growth factor*- β – TGF- β) – również było mniejsze u chorych ze skuteczną kontrolą replikacji [18]. Bardzo ważną rolę, szczególnie na wczesnych etapach zakażenia, odgrywa prawidłowa funkcja limfocytów NK, które indukują apoptozę zakażonych hepatocytów na szlaku zależnym od ekspresji TRAIL. Najnowsze prace, w tym u osób zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (*hepatitis C virus* – HCV), wskazują, że właśnie ekspresja TRAIL przez komórki NK stanowi główny mechanizm immunomodulacji po podaniu interferonu w wirusowych zapaleniach wątroby [19]. Zmniejszanie się stężenia HBsAg w ostrym WZW typu B również zależy od aktywności komórek NK [20]. Podsumowując – wydaje się, że uzyskanie kontroli immunologicznej w stosunku do HBV wymaga nie tylko prawidłowej aktywności limfocytów T, lecz także zmniejszenia ich supresji przez komórki regulatorowe (T-reg wydzielające IL-10 i TGF- β) oraz skutecznej aktywacji komórek NK. Właśnie takie przywrócenie „równowagi immunologicznej” prowadzi do systematycznego obniżania się replikacji wirusa, zmniejszania się stężenia HBsAg, a w konsekwencji serokonwersji w układzie HBs i bardzo dobrego rokowania.

WSPÓŁCZESNE MOŻLIWOŚCI I STRATEGIE IMMUNOMODULACJI (TERAPIE SKOJARZONE, SEKWENCYJNE)

Skoro znamy podstawowe wykładniki kontroli immunologicznej, to wydaje się, że opracowanie skutecznych metod immunoterapii jest osiągalne. Dotychczas-

sowe próby opracowania szczepionek terapeutycznych oraz immunomodulatorów w terapii PZW typu B nie przyniosły jednak zadowalających wyników. Pierwsze próby zastosowania szczepionek terapeutycznych w PZW typu B opartych na HBsAg były prowadzone w latach 80. XX wieku [21]. W pionierskiej pracy po szczepieniu 16 chorych nie stwierdzono przypadków utraty HBsAg. Tylko u 1 chorego zanotowano utratę HBeAg, co więcej, poprawę biochemiczną stwierdzono zaledwie u połowy chorych. Dalsze próby zwiększenia skuteczności takiego postępowania obejmowały wprowadzanie dodatkowych antygenów (antygeny rdzeniowego HBV, DNA wirusa), modyfikacje substancji adiuwantowych (IL-12) oraz schematów podawania szczepień. Wyniki tych badań nie są jednak jednoznaczne [22]. Przyczyn ograniczonej efektywności szczepień terapeutycznych można się dopatrywać w zmienności układu odpornościowego oraz wirusa (genotypów, subtypów). Jednym z czynników ograniczających doświadczenia immunologiczne jest znaczna zmienność osobnicza układu odpornościowego, która zależy od typu HLA, poprzednich ekspozycji na inne patogeny, wieku czy stanu immunosupresji. Wiadomo na przykład, że jedną z konsekwencji długotrwałej ekspozycji na patogen, m.in. HBV-DNA, HBsAg, jest tzw. wycieńczenie immunologiczne limfocytów T. Limfocyty poddawane ciągłej stymulacji antygenowej zaczynają wykazywać ekspresję białek inhibicyjnych wskazujących na ich zaburzenia. Są to takie białka, jak PD-1, CTLA-4, 2B4, TIM-3, które można blokować w warunkach *in vitro*. Rzeczywiście próby blokowania tych białek wiążą się z poprawą funkcji limfocytów T w PZW typu C, ale u poszczególnych chorych niezbędne są zindywidualizowane skojarzenia (PD-1 + CTLA-4 lub PD-1 + 2B4 itp.) [23]. Wydaje się, że taka heterogenność układu odpornościowego jest głównym czynnikiem, który utrudnia skuteczną immunomodulację.

Wydaje się, że ważną strategią jest redukcja HBV-DNA czy też stężeń antygenów HBV przed zastosowaniem immunomodulacji. I rzeczywiście, aktualne doniesienia wskazują na większą skuteczność immunomodulacji stosowanej w trakcie długoterminowego leczenia AN u chorych z niewykrywalną wiremią HBV [24]. Takie strategie mogą być także stosowane w praktyce klinicznej poprzez umiejętne kojarzenie PEG-INF- α oraz AN. W badaniu Boglione i wsp. [25] 20 chorych z wysokim HBV-DNA było leczonych entekawirem przez 12 tygodni, następnie etekawirem oraz PEG-IFN przez 12 tygodni, natomiast w dalszej kolejności tylko PEG-IFN przez 36 tygodni. Grupę kontrolną stanowiło 20 chorych leczonych PEG-IFN przez 48 tygodni. U osób leczonych sekwencyjnie obserwowano wyższy odsetek serokonwersji HBeAg (76,9% vs

15%) oraz serokonwersji HBsAg (20% vs 0%). Badanie to wykazuje, że początkowe zastosowanie AN w celu obniżenia replikacji wirusa jest skuteczną metodą pozwalającą na zwiększenie odsetka serokonwersji HBsAg nawet do 20%. W kolejnym badaniu z randomizacją przetestowano ponownie tę hipotezę, opierając się na dwóch schematach leczenia: terapia PEG-IFN przez 24 tygodnie oraz telbivudyną przez dalsze 24 tygodnie vs. leczenie telbivudyną przez 24 tygodnie oraz PEG-IFN przez kolejne 24 tygodnie. Chorzy, którzy w pierwszej kolejności otrzymywali telbivudynę, a następnie PEG-IFN, mieli lepsze wyniki leczenia z HBV-DNA < 2000 IU/ml pół roku po zakończeniu terapii (46,7% vs 13,3%) [26]. Obecnie toczą się duże badania z randomizacją nad zastosowaniem tenofoviru lub entekawiru w skojarzeniu z PEG-INF, których wstępne wyniki poznamy na przełomie lat 2014/2015. Wydaje się, że realne jest uzyskanie dwucyfrowego odsetka serokonwersji w układzie HBsAg, chociaż pewne wnioski będzie można wyciągnąć dopiero po opublikowaniu tych wyników.

PERSPEKTYWY IMMUNOTERAPII ANTY-HBV

Ze względu na złożony przebieg zakażenia HBV, jego dużą zmienność oraz związek z funkcją układu odpornościowego terapie immunomodulacyjne są wysoce pożądane. Wśród aktualnych kierunków badań warto wymienić doustne preparaty agonistów TLR-7 (*toll like receptor 7*). Aktywacja TLR-7 powoduje pobudzenie odporności wrodzonej i nabytej, w szczególności zwiększenie ekspresji wydzielania interferonu α przez komórki dendrytyczne, pobudzenie prezentacji antygeny oraz różnicowania limfocytów B. W badaniach na modelach zwierzęcych użycie agonisty TLR-7 (GS-9620) wiązało się z uzyskaniem niewykrywalnego stężenia antygeny HBs u 100% zwierząt po 4 tygodniach terapii. W badaniu klinicznym fazy 1b stwierdzono, że GS-9620 był lekiem bezpiecznym u 84 chorych z PZW typu B, ponadto zaobserwowano zależne od dawki pobudzenie genów indukowanych interferonem [27]. Uważa się, że agonisci TLR-7 mogą być w przyszłości alternatywą doustną dla IFN- α . Wśród innych preparatów obecnie opracowywane są szczepionki terapeutyczne zawierające rekombinowane antygeny, m.in. GS-4774 składająca się z rekombinowanego antygeny HBx, rdzeniowego i powierzchniowego HBV. Bezpieczeństwo tej szczepionki oceniono u zdrowych ochotników i stwierdzono, że preparat pobudzał odpowiedzi immunologiczne niezależnie od typu HLA gospodarza [28].

Warto wspomnieć o drugim kierunku badań nad nowymi terapiami zakażeń HBV. Jak wspomniano

wyżej, główną przeszkodą w eradykacji HBV jest występowanie w jądrach komórkowych zakażonych hepatocytów stabilnej matrycy replikacyjnej HBV, czyli cccDNA. Ta postać wirusowego DNA jest odporna na działanie dotychczasowych leków, m.in. AN. Od wielu lat trwają próby odkrycia terapii skierowanych przeciwko cccDNA, które pozwoliłyby na eliminację HBV z organizmu człowieka. W ostatnich dniach doszło do przełomu w tych badaniach. W prestiżowym czasopiśmie naukowym „Science” opublikowano obiecujące wyniki badań nad preparatami powodującymi niecytotolityczną eliminację cccDNA [9]. Ważnym elementem w uszkodzeniu cccDNA okazały się deaminazy z rodziny APOBEC3, które po połączeniu z antygenem rdzeniowym HBV związanym z cccDNA powodowały jego degradację. Klasycznie stosowany IFN- α działa również na drodze niecytotolitycznej, jednak taki efekt jego działania jest przejściowy. Nowe przeciwciała aktywujące białko LT β R (*lymphotoxin- β receptor*) indukujące APOBEC3B powodowały zmniejszenie się zawartości cccDNA o 95% w ciągu 30 dni leczenia. Terapia ta była bezpieczna, a efekt utrzymywał się również po jej zaprzestaniu w zwierzęcych modelach HBV. Dalsze badania kliniczne umożliwią ocenę skuteczności tej terapii u ludzi.

Podsumowując – tak jak różnorodny jest przebieg PZW typu B, tak podejście terapeutyczne powinno być złożone i wielofazowe. Niezbędnymi elementami w przyszłych schematach terapeutycznych poza AN będą leki immunomodulacyjne, inhibitory HBsAg i cccDNA. Dopiero tak kompleksowe podejście do leczenia PZW typu B pozwoli na całkowitą eliminację HBV z organizmu zakażonych osób.

PIŚMIENNICTWO

- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004; 126: 1750e8.
- European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2012; 57: 167-85.
- Stepień M, Czarkowski MP. Wirusowe zapalenie wątroby typu B w Polsce w 2011 roku. *Przegl Epidemiol* 2013; 67: 349-53.
- Kopacz A, Bielecka A, Mikulska M i wsp. Analiza występowania markerów wirusa HBV istotnych dla ryzyka reaktywacji zakażenia u osób z chorobami hematologicznymi. *Przegl Epidemiol* 2012; 66: 1-7.
- Simon K, Błudzin W, Dziambor A i wsp. Badanie nieinterwencyjne Al463-121 – leczenie pacjentów zakażonych HBV – charakterystyka wyjściowa i sposób postępowania terapeutycznego w wybranej kohorcie pacjentów polskich. *Przegl Epidemiol* 2013; 67: 709-13.
- Juszczak J, Kaczmarek-Boroń A, Cianciara J i wsp. Polska Grupa Ekspertów HBV; Zalecenia terapeutyczne na rok 2013. Leczenie przeciwwirusowe przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu B. *Przegl Epidemiol* 2013; 67: 383-93.
- Cornberg M, Höner Zu Siederdisen C. HBsAg seroclearance with NUCs: rare but important. *Gut* 2014 doi: 10.1136/gut-jnl-2013-306221.
- Moucari R, Korevaar A, Lada O, et al. High rates of HBsAg seroconversion in HBeAg-positive chronic hepatitis B patients responding to interferon: a long-term follow-up study. *J Hepatol* 2009; 50: 1084-92.
- Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science* 2014; 343: 1221-8.
- Lok AS, McMahon BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007; 45: 507-39.
- Brunetto MR, Oliveri F, Colombatto P, et al. Hepatitis B surface antigen serum levels help to distinguish active from inactive hepatitis B virus genotype D carriers. *Gastroenterology* 2010; 139: 483-90.
- Thio CL. Hepatitis B and human immunodeficiency virus coinfection. *Hepatology* 2009; 49: S138-45.
- Cornberg M, Jaroszewicz J, Manns MP, Wedemeyer H. Treatment of chronic hepatitis B. *Minerva Gastroenterol Dietol* 2010; 56: 451-65.
- Bertoletti A, Gehring AJ. The immune response during hepatitis B virus infection. *J Gen Virol* 2006; 87: 1439-49.
- Jaroszewicz J, Calle Serrano B, Wursthorn K, et al. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: a European perspective. *J Hepatol* 2010; 52: 514-22.
- Jaroszewicz J, Ho H, Markova A, et al. 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: 915-24.
- Jaroszewicz J, Parfieniuk-Kowarda A, Swiderska M, et al. Low serum IL-10 and HBsAg concentrations are associated with long-term immune control in persistent HBV-infection. *Hepatology* 2013; 58 (S1): 224A.
- Wiegand S, Wranke A, Falk C, et al. Serum cytokines and chemokines in patients with different phase of HBeAg negative chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2013; 58 (S1): 730A.
- Stegmann KA, Björkström NK, Veber H, et al. Interferon- α -induced TRAIL on natural killer cells is associated with control of hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; 138: 1885-97.
- Jaroszewicz J, Markova A, Schlaphoff V, et al. Association of HBsAg decline with innate and adaptive immune responses during acute hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2011; 54 (Suppl. 1): S119.
- Dienstag JL, Stevens CE, Bhan AK, et al. Hepatitis B vaccine administered to chronic carriers of hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med* 1982; 96: 575-9.
- Kutscher S, Bauer T, Dembek C, et al. Design of therapeutic vaccines: hepatitis B as an example. *Microb Biotechnol* 2012; 5: 270-82.
- Schlaphoff V, Lunemann S, Suneetha PV, et al. Dual function of the NK cell receptor 2B4 (CD244) in the regulation of HCV-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002045.
- Godon O, Fontaine H, Kahi S, et al. Immunological and antiviral responses after therapeutic DNA immunization in chronic hepatitis B patients efficiently treated by analogues. *Mol Ther* 2014; 22: 675-84.
- Boglione L, D'Avolio A, Cariti G, et al. Sequential therapy with entecavir and PEG-INF in patients affected by chronic hepatitis

- B and high levels of HBV-DNA with non-D genotypes. *J Viral Hepat* 2013; 20: e11-9.
26. Piccolo P, Lenci I, di Paolo D, et al. A randomized controlled trial of sequential pegylated interferon-alpha and telbivudine or vice versa for 48 weeks in hepatitis B antigen-negative chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2013; 18: 57-64.
 27. Gane EJ, Sicard E, Gordon SC, et al. Safety and pharmacodynamics of oral TLR-7 agonist GS-9620 in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2013; 58 (S1): 661A.
 28. Gaggar A, Coeshott C, Subramanian M, et al. Safety, tolerability and immunogenicity of GS-4774, an HBV-specific therapeutic vaccine, in healthy volunteers. *Hepatology* 2013; 58 (S1): 656A.