

## Τα *in vitro* συστήματα πολλαπλασιασμού του HCV και οι νεότερες θεραπείες της χρόνιας ηπατίτιδας C

Φ. Ντζιώρα,  
Γ. Μαγιορκίνης,  
Α. Χατζάκης

Εθνικό Κέντρο Αναφοράς Ρετροϊών,  
Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας,  
Ιατρική Σχολή, Εθνικό και Καποδιστριακό  
Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα

*In vitro* hepatitis C virus replication systems and novel therapeutic agents for chronic hepatitis C

Abstract at the end of the article

Η μελέτη και ο σχεδιασμός νέων θεραπευτικών παραγόντων για τη θεραπεία της ηπατίτιδας C δυσχεραίνονταν μέχρι πρόσφατα από την έλλειψη αποτελεσματικού συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας του ιού της ηπατίτιδας C (HCV). Η πρόοδος στη μοριακή ιολογία του HCV έχει δημιουργήσει τις προϋποθέσεις για την ανάπτυξη των *in vitro* συστημάτων πολλαπλασιασμού του ιού και επιτρέπει έρευνες που δεν θα ήταν δυνατές με άλλα συστήματα. Τα πρώτα συστήματα πολλαπλασιασμού αντιγράφων του ιού (replicons) ήταν υπογενωμικά, σήμερα όμως υπάρχουν διαθέσιμα και replicons πλήρους αλληλουχίας. Η δημιουργία ενός γονιδιώματος του HCV πλήρους αλληλουχίας, που πολλαπλασιάζεται και παράγει μοθυματικά ιικά τμήματα σε κυτταρικές καλλιέργειες του ιού (HCV cell-culture ή HCVcc), επέτρεψε τη μελέτη των φυσικών χαρακτηριστικών του ιού, με άμεσο επακόλουθο την ανακάλυψη νέων αντι-ιικών φαρμάκων. Προς το παρόν, η χρήση ανασυνδυασμένης ιντερφερόνης (IFN) α-2α, α-2β και πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης (PEG-IFN) ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη είναι η μόνη εγκεκριμένη διαθέσιμη θεραπεία. Με δεδομένα τις σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες και τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών, καθώς και τον υψηλό επιπολασμό της λοίμωξης σε παγκόσμια κλίμακα, καθίσταται αναγκαία η ανακάλυψη νέων θεραπειών. Εν δυνάμει στόχους για την ανακάλυψη νέων θεραπειών αποτελούν η NS3 πρωτεάση, που είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση ορισμένων μη δομικών πρωτεϊνών του ιού, καθώς και η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase ή RdRp) της NS5B. Εκτός όμως από τους αναστολείς των NS πρωτεασών, έχουν ανιχνευθεί και άλλοι παράγοντες που φαίνεται να παίζουν ρόλο στη θεραπεία της λοίμωξης από HCV. Τέτοιοι παράγοντες είναι η κυκλοσπορίνη A, η αλμποφερόνη (albuferon), η μεριμεποδίβη (merimepodib, VX-497), η βιραμιδίνη (virmidine), το τριοξειδιο του αρσενικού (arsenic trioxide, ATO), το σιβογλυκονικό νάτριο (sodium stibogluconate, SSG) και οι ιντερλευκίνες 28 (IL-28) και 29 (IL-29).

Λέξεις ευρετηρίου

Ηπατίτιδα C  
Νεότερα θεραπευτικά δεδομένα  
Συστήματα πολλαπλασιασμού

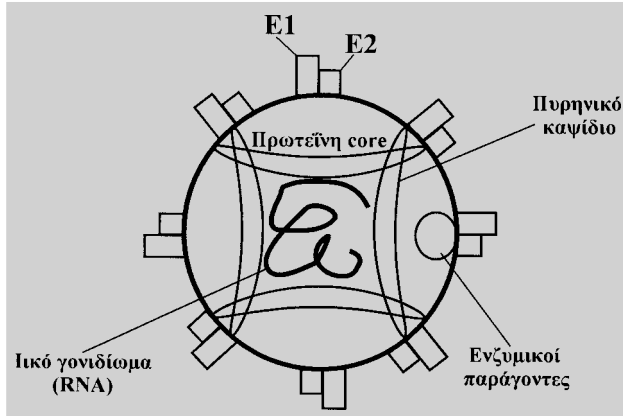
Υποβλήθηκε 7.10.2005  
Εγκρίθηκε 28.11.2005

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ιός της ηπατίτιδας C (HCV) είναι ένας RNA ιός θετικής αλυσίδας, που ανήκει στην οικογένεια των φλαβοϊών (εικ. 1). Το γονιδίωμα του HCV έχει μήκος περίπου 9600 νουκλεοτίδια και μεταγράφεται σε μία πολυπρωτεΐνη περίπου 3000 αμινοξέων. Αυτή η πολυπρωτεΐνη τεμαχίζεται μέσω ενός συνδυασμού πρωτεασών του ξενιστή και του ιού σε δομικές και μη δομικές πρωτεΐνες, κάποιες από τις οποίες τροποποιούνται μετα-μεταγραφικά.<sup>1</sup> Όπως και στους υπόλοιπους φλαβοϊούς, οι τρεις πρωτεΐνες του αμινοτελικού άκρου του HCV (core,

envelope 1, envelope 2) είναι πιθανόν δομικές, ενώ οι τέσσερις πρωτεΐνες του καρβοξυτελικού άκρου (nonstructural ή NS 2, 3, 4, 5) φαίνεται να παίζουν ρόλο στον πολλαπλασιασμό του ιού.<sup>2</sup>

Οι σύγχρονες θεραπείες για την ηπατίτιδα C βασίζονται σε σχήματα που περιλαμβάνουν ριμπαβιρίνη και ιντερφερόνη-α (IFN-α) ή μια τροποποιημένη μορφή της ιντερφερόνης με πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG-IFN).<sup>3-5</sup> Ο σχεδιασμός νέων θεραπευτικών παραγόντων δυσχεραίνονταν μέχρι πρόσφατα από την έλλειψη αποτελεσματικού συστήματος κυτταρικής καλλιέργειας και εξακολουθεί να είναι δύσκολος, καθώς το μοναδικό πιστοποιη-



Εικόνα 1. Η δομή του ιού.

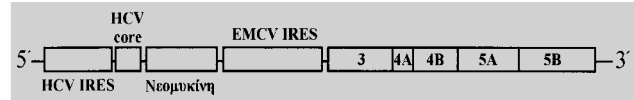
μένο ζωικό μοντέλο είναι ο χιμπαντζής. Τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ένα πλήθος κυτταρικών συστημάτων καλλιέργειας, που υποστηρίζουν τον πολλαπλασιασμό του HCV μετά από *ex vivo* μόλυνση. Ωστόσο, αυτός ο πολλαπλασιασμός είναι χαμηλού επιπέδου και διαλείπων, καθότι σε όλες τις περιπτώσεις η ανίχνευση του ιικού RNA πρέπει να βασιστεί στην αντίστροφη μεταγραφή-αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (RT-PCR).

## 2. IN VITRO ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ HCV

Η πρόσφατη πρόοδος στη μοριακή ιολογία του HCV έχει δημιουργήσει τις προϋποθέσεις για την ανάπτυξη των *in vitro* συστημάτων πολλαπλασιασμού, τα οποία φαίνεται να είναι το κλειδί για σταθερή, υψηλού επιπέδου έκφραση και αντιγραφή του HCV στα κύτταρα. Η διάθεση κυτταρικών σειρών, που υποστηρίζουν την αντιγραφή υπογενωμικών HCV RNA, καθώς και πλήρους μήκους γονιδιώματος σε ένα επίπεδο εύκολα ανιχνεύσιμο με Northern blot, επιτρέπει έρευνες που δεν ήταν δυνατές με άλλα συστήματα. Τα *in vitro* συστήματα πολλαπλασιασμού του ιού, που έχουν αναπτυχθεί σχετικά πρόσφατα, είναι γνωστά ως συστήματα replicons (εικ. 2). Τα πρώτα replicons που αναπτύχθηκαν ήταν υπογενωμικά, σήμερα όμως υπάρχουν διαθέσιμα και replicons πλήρους αλληλουχίας.<sup>6</sup>

### 2.1. Υπογενωμικά συστήματα πολλαπλασιασμού αντιγράφων (replicons)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η παρουσία των δομικών πρωτεϊνών του ιού και η σύζευξη του νουκλεϊκού πολλαπλασιασμού με την παραγωγή ιών δεν απαιτούνται για την αποτελεσματική παραγωγή του ιικού RNA, τουλάχιστον στην κυτταρική σειρά Huh-7. Αποδεικνύεται,



Εικόνα 2. Δομή ενός κλασικού replicon. Τα κλασικά replicons είναι δισιστρονικά: Στο πρώτο σιστρόνιο περιέχουν τις 5' και 3' μη μεταφραζόμενες περιοχές και χρησιμοποιούν το IRES (internal ribosome entry site) για να εκφράσουν το γονίδιο της φωσφοτρανσφεράσης της νεομυκίνης στη θέση των δομικών πρωτεϊνών. Στο δεύτερο σιστρόνιο μεταφράζουν τις μη δομικές περιοχές χρησιμοποιώντας το IRES από τον 1ο της εγκεφαλομυοκαρδίτιδας.

λοιπόν, ότι τα υπογενωμικά συστήματα αντιγραφής μιμούνται αξιόπιστα τουλάχιστον κάποια τμήματα του πολλαπλασιασμού του HCV.<sup>7-11</sup>

Από πολύ νωρίς φάνηκε ότι μια σειρά προσαρμοστικών μεταλλάξεων στο μεγαλύτερο τμήμα της πολυπρωτεΐνης οδηγεί στη δημιουργία προσαρμοσμένων replicons, τα οποία επιτρέπουν τον πλέον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό και εκφράζουν το HCV RNA σε αυξημένα επίπεδα. Ωστόσο, μερικές μεταλλάξεις είναι σαφώς ασύμβατες μεταξύ τους και όταν συνδυαστούν οδηγούν σε ελαττωματικά replicons,<sup>12</sup> ενώ ακόμα και οι προσαρμοστικές μεταλλάξεις είναι πιθανό να μην είναι συμβατές με τον *in vivo* πολλαπλασιασμό του ιού.<sup>13</sup>

Από την ανακάλυψη του πρώτου υπο-γενωμικού replicon έχουν αναπτυχθεί αρκετές παραλλαγές βασισμένες στο αρχικό αυτό μοντέλο. Ορισμένα replicons φέρουν το γονίδιο ανοχής της νεομυκίνης για επιλογή με G418 (Geneticin), όπως το πρωτότυπο replicon.<sup>14</sup> Άλλα replicons περιέχουν το γονίδιο λουσιφεράσης, διευκολύνοντας με αυτόν τον τρόπο την ανίχνευση του πολλαπλασιασμού του RNA.<sup>15</sup> Σε μια μελέτη, που είχε ως σκοπό τη μέτρηση της βιολογικά ενεργού ιντερφερόνης στο αίμα, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς ένα replicon με λουσιφεράση για την παρακολούθηση των επιπέδων της ιντερφερόνης σε ασθενείς που βρίσκονταν σε θεραπεία με ιντερφερόνη.<sup>16</sup>

Εκτός από τις προσαρμοστικές μεταλλάξεις, ένα άλλο φαινόμενο που έχει παρατηρηθεί είναι η επιτρεπτική ικανότητα των κυττάρων στον πολλαπλασιασμό. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι κάποιοι υποπληθυσμοί των κυτταρικών σειρών επιτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των replicons σε υψηλότερα επίπεδα.<sup>17,18</sup> Πρόσφατα, κατασκευάστηκε ένα replicon που μολύνει τη νεφρική κυτταρική σειρά 293 και παρουσιάζει διαφορετικές ιδιότητες από τα replicons της Huh-7 σειράς, καθότι φέρει ένα πλήθος διαφορετικών προσαρμοστικών μεταλλάξεων.<sup>19</sup> Συστήματα πολλαπλασιασμού του HCV έχουν αναπτυχθεί και σε μη ανθρώπινες κυτταρικές σειρές, όπως είναι

τα κύτταρα του ηπατώματος του ποντικού, αλλά και σε μη ηπατικά επιθηλιακά κύτταρα.<sup>20</sup>

Παρόλα τα πλεονεκτήματα των replicons, υπάρχουν τα ακόλουθα σημεία που χρήζουν ιδιαίτερης προσοχής:

- Η αντιγραφή του RNA είναι ισχυρά συζευγμένη με τον πολλαπλασιασμό του ξενιστή,<sup>21</sup> με αποτέλεσμα ουσίες που αναστέλλουν την ανάπτυξη των κυττάρων του ξενιστή να μειώνουν και τα επίπεδα του RNA replicon. Γι' αυτόν το λόγο, προκειμένου να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με ειδική αναστολή του πολλαπλασιασμού του HCV, θα πρέπει να έχει αποκλειστεί η κυτταροτοξική ή η κυτταροστατική τους δράση.
- Δεν μπορεί να αποκλειστεί ότι οι δομικές πρωτεΐνες επηρεάζουν την αντι-ιική δράση μιας ουσίας ή ότι συνεισφέρουν στην αντι-ιική αντοχή. Συνεπώς, ουσίες ανασταλτικές, που ταυτοποιήθηκαν από έλεγχο διαλογής (screening) φαρμάκων χρησιμοποιώντας υπογενωμικά replicons, θα πρέπει να αξιολογούνται σε κυτταρικές σειρές που φέρουν αναπαραγόμενο το πλήρους μήκους γονιδίωμα του HCV.
- Οι προσαρμοστικές μεταλλάξεις για τις καλλιέργειες μπορεί να επηρεάζουν τις βιοχημικές ιδιότητες μιας πρωτεΐνης αλλάζοντας την ευαισθησία σε ένα αντι-ιικό φάρμακο. Ωστόσο, έχουν αναπτυχθεί συστήματα σε >20 κυτταρικές σειρές, η καθεμιά από τις οποίες φέρει διαφορετικές προσαρμοστικές μεταλλάξεις.

## 2.2. Πλήρους αλληλουχίας συστήματα πολλαπλασιασμού του ιού

Τα replicons είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την εκτίμηση της αντι-ιικής δραστηριότητας ενός δεδομένου φαρμάκου, για τη βελτίωσή του, την εκτίμηση της αντι-ιικής αντοχής και την ταυτοποίηση των μεταλλάξεων αντοχής.<sup>22</sup> Ωστόσο, τα μέχρι σήμερα χρησιμοποιούμενα πλήρους μήκους γενωμικά replicons, αν και έχουν ικανοποιητική πολλαπλασιαστική ικανότητα, πολλαπλασιάζονται σε περίπου 5 φορές χαμηλότερα επίπεδα απ' ό,τι τα υπογενωμικά replicons. Τα πλήρους αλληλουχίας γονιδιώματα, που περιέχουν προσαρμοστικές μεταλλάξεις, δεν παράγουν μολυσματικά τμήματα του ιού στην καλλιέργεια και είναι σοβαρά εξασθενημένα *in vivo*. Τα φυσικά χαρακτηριστικά των τμημάτων του HCV είναι δύσκολο να μελετηθούν απουσία ενός μολυσματικού κυτταρικού συστήματος. Είναι απαραίτητο, επομένως, ένα σύστημα που θα παράγει πλήρη ιικά σωματίδια και θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μοντέλο για τη λοίμωξη. Για την επίλυση του τελευταίου, πολλά υποσχόμενες φαίνεται να είναι νεότερες ανακαλύψεις, σύμφωνα με

τις οποίες έγινε εφικτός ο πολλαπλασιασμός του HCV σε χιμαιρικά ποντίκια, δίνοντας ελπίδες για τη δημιουργία ενός ικανοποιητικού μοντέλου μικρών ζώων.<sup>23,24</sup>

Πρόσφατα, ανακοινώθηκε η δημιουργία ενός γονιδιώματος του HCV πλήρους αλληλουχίας, που πολλαπλασιάζεται και παράγει ιικά τμήματα μολυσματικά σε κυτταρικές καλλιέργειες του ιού (HCVcc ή HCV cell-culture).<sup>25</sup> Ο πολλαπλασιασμός του ιού στο σύστημα αυτό είναι έντονος, παράγοντας σχεδόν  $10^5$  μολυσματικές μονάδες/mL μέσα σε 48 ώρες. Για τη δημιουργία της κυτταρικής σειράς χρησιμοποιήθηκε το υπογενωμικό replicon του γονοτύπου 2a (subgenomic replicon JFH1, SGR-JFH1), το οποίο αναπαράγεται ικανοποιητικά σε κυτταρικές καλλιέργειες χωρίς προσαρμοστικές μεταλλάξεις. Δύο πλήρους αλληλουχίας χιμαιρικά γονιδιώματα δημιουργήθηκαν χρησιμοποιώντας τις core-NS2 γονιδιακές περιοχές από τις ιικές αλυσίδες των μολυσματικών στελεχών J6 (γονότυπος 2a) και H77 (γονότυπος 1a). Τα δύο πλήρους αλληλουχίας χιμαιρικά προϊόντα (full length ή FL-J6/JFH και FL-H77/JFH) και το υπογενωμικό (SGR-JFH1) RNA είναι ικανά για τον πολλαπλασιασμό του RNA, όπως φαίνεται από τη συσσώρευση NS5A πρωτεΐνης και ιικού RNA μέσα σε 48 ώρες.

Μέσα στα επιμολυσμένα κύτταρα και τα δύο πλήρους αλληλουχίας γονιδιώματα εκφράζουν τις πρωτεΐνες core, E2 και NS5A. Αντίθετα, το υπογενωμικό replicon JFH1 εκφράζει την NS5A, αλλά όχι τις core και E2. Παρόλο που μόνο το 30% των κυττάρων ήταν επιμολυσμένα με RNA από τα δύο πλήρους αλληλουχίας χιμαιρικά προϊόντα (FL-J6/JFH και FL-H77/JFH) ή το υπογενωμικό replicon (SGR-JFH1), μέσα σε 96 ώρες >95% των FL-J6/JFH επιμολυσμένων κυττάρων ήταν θετικά για NS5A, γεγονός που δείχνει ότι το FL-J6/JFH εξαπλώνεται μέσα στις επιμολυσμένες κυτταρικές καλλιέργειες. Ο χιμαιρικός γονότυπος 2a (FL-J6/JFH) σχετίζεται, επομένως, με την απελευθέρωση HCV RNA και core πρωτεΐνης και είναι μολυσματικός. Η ικανότητα του χιμαιρικού γονοτύπου 1a/2a (FL-H77/JFH) να πολλαπλασιάζεται αλλά όχι να εξαπλώνεται προτείνει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ δομικών και μη δομικών γονιδιακών προϊόντων μπορεί να είναι σημαντικές για τη δημιουργία του συστήματος καλλιέργειας HCVcc. Το δεδομένο αυτό επιβεβαιώνει την ιική φύση της μολυσματικότητας του HCVcc και δείχνει ότι οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στην E2 και την CD81, μια πρωτεΐνη της κυτταρικής επιφάνειας, είναι σημαντικές για την είσοδο του HCV στα κύτταρα. Τέλος, έχει βρεθεί ότι η μολυσματικότητα του HCVcc μπορεί να δεσμευτεί με μια διαλυτή ανασυνδυασμένη μορφή της CD81, γεγονός που καταδεικνύει νέους εν δυνάμει αντι-ιικούς στόχους.

Αυτό το σύστημα καλλιέργειας του ιού έχει χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας των θεραπειών με ιντερφερόνη-α και άλλων αντι-ϊικών συμπλόκων στους ασθενείς με γονότυπο 1. Ο πολλαπλασιασμός του HCVcc μπορεί να ανασταλεί από την ιντερφερόνη-α και ορισμένα HCV-ειδικά αντι-ϊικά σύμπλοκα. Η ειδικότητα των συμπλόκων δείχνει ότι η μόλυνση με HCVcc οδηγεί σε πολλαπλασιασμό τα κύτταρα-στόχους, αναδεικνύοντας αυτό το *in vitro* ιικό σύστημα σε σημαντικό εργαλείο για τον έλεγχο και την αξιολόγηση τόσο των τρεχόντων όσο και των μελλοντικών συμπλεγμάτων, καθώς και για την έρευνα για βελτιωμένα αντι-ϊικά φάρμακα.<sup>25</sup>

### 3. ΝΕΟΤΕΡΕΣ ΑΝΤΙ-ΪΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ

Με τα ως τώρα υπάρχοντα δεδομένα δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια θεραπεία αποτελεσματική για όλους τους υποτύπους του HCV. Προς το παρόν, η χρήση ανασυνδυασμένης ιντερφερόνης (IFN) α-2α, α-2b και πεγκυλιωμένης ιντερφερόνης (PEG-IFN) ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη είναι η μόνη εγκεκριμένη διαθέσιμη θεραπεία.<sup>26</sup> Οι υπάρχουσες θεραπείες σχετίζονται με σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες, λόγος για τον οποίο πολλοί ασθενείς οδηγήθηκαν σε διακοπή της θεραπείας. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών και το υψηλό ποσοστό της λοίμωξης ανά τον κόσμο, καθιστά αναγκαία την ανακάλυψη νέων θεραπειών.<sup>27</sup>

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ο HCV είναι ένας μικρός RNA ιός, που κωδικοποιεί μια πολυπρωτεΐνη 3000 αμινοξέων. Οι δομικές πρωτεΐνες επεξεργάζονται από τις πρωτεάσες του ξενιστή, ενώ οι μη δομικές πρωτεΐνες χρειάζονται για τη λειτουργία τους δύο πρωτεάσες, που κωδικοποιούνται από τον ίδιο τον ιό, τις NS2/3 και NS3. Η NS2/3 πρωτεάση είναι υπεύθυνη για τη διαίρεση των πρωτεϊνών NS2 και NS3 του ιού μεταξύ τους, ενώ η NS3 είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση των υπολοίπων μη δομικών πρωτεϊνών.<sup>28</sup> Βασικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό του ιού φαίνεται να διαδραματίζει και η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase ή RdRp) της NS5B.<sup>29</sup> Γι' αυτό, τα ένζυμα αυτά αποτελούν εν δυνάμει στόχους για την ανακάλυψη νέων θεραπειών.

#### 3.1. Αναστολείς της NS3 πρωτεάσης

Η NS3 πρωτεάση, που βρίσκεται στα 80 αμινοτελικά αμινοξέα της NS3 πρωτεΐνης, είναι μια πρωτεάση σερί-

νης ομοιάζουσα με χυμοθρυψίνη και θρυψίνη.<sup>30</sup> Πολλοί τύποι αναστολέων της NS3 πρωτεάσης έχουν βρεθεί<sup>31,32</sup> και είναι σημαντικό να αναγνωριστούν τα δομικά χαρακτηριστικά που συμμετέχουν στην κλινική αποτελεσματικότητα. Λόγω του μεγάλου αριθμού πρωτεασών που υπάρχουν στο ανθρώπινο σώμα, η εκλεκτικότητα είναι ένας από τους βασικούς παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη κατά το σχεδιασμό ενός νέου φαρμάκου. Η διαφορά στην εκλεκτικότητα των συμπλεγμάτων εξαρτάται από το αν τα καρβοξυτελικά άκρα είναι ηλεκτρόφιλα ή μη.<sup>33</sup> Παρόλο που πολλά από τα ηλεκτρόφιλα συμπλέγματα είναι δυνητικοί αναστολείς της NS3 πρωτεάσης, τους λείπει το σημαντικό χαρακτηριστικό της εκλεκτικότητας, το οποίο μειώνει το δυναμικό τους ως πιθανά φάρμακα. Αντίθετα, οι μη ηλεκτρόφιλοι αναστολείς μπορούν να είναι ιδιαίτερα εκλεκτικοί για την NS3 πρωτεάση. Παρόλα αυτά, οι διάφορες καρβοξυλομάδες δεν είναι συχνά κατάλληλες για το μεταβολισμό ενός φαρμακευτικού μορίου και μπορεί να περιορίσουν την απορρόφηση του φαρμάκου.

Δύο από τους καλύτερα μελετημένους αναστολείς της NS3 είναι το BILN 2061 και το Compound A.

– Το BILN 2061 είναι ένας μικρός μοριακός αναστολέας της NS3 πρωτεάσης, βιολογικά διαθέσιμος μέσω της στοματικής οδού. Τα φαρμακοδυναμικά αποτελέσματα του BILN 2061 αξιολογήθηκαν με μια εμπειρική θεραπεία σε ασθενείς με HCV-λοίμωξη. Το BILN 2061 ήταν ιδιαίτερα αποτελεσματικό, προκαλώντας ταχεία μείωση του ιικού φορτίου με γεωμετρικό τρόπο σε όλους τους ασθενείς υπό θεραπεία, φθάνοντας μάλιστα σε ορισμένους ασθενείς σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα 24-48 ώρες μετά από τη χορήγηση.<sup>34</sup> Το αποτέλεσμα της θεραπείας με BILN 2061 έδειξε σημαντικά μεγαλύτερη και ταχύτερη μείωση του ιικού φορτίου σε σύγκριση με την αναμενόμενη, που υπολογίζεται με βάση τα δεδομένα από τη χρήση της IFN ως μονοθεραπεία ή σε συνδυασμό με ριμπαβιρίνη.<sup>35</sup> Άλλο πλεονέκτημα της θεραπείας με το BILN 2061 είναι η ειδική αναστολή της NS3 πρωτεάσης, όπως φαίνεται από την απουσία ανασταλτικής δράσης του BILN 2061 έναντι της ανθρώπινης λευκοκυτταρικής ελαστάσης και ανθρώπινης ηπατικής καθεψίνης, αντιπροσώπους πρωτεασών με σερίνη και κυστεΐνη, αντίστοιχα.

Το μειονέκτημα αυτής της θεραπευτικής προσέγγισης είναι ότι η χαμηλή πιστότητα της RdRp του HCV πιθανόν να οδηγήσει σε ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών του ιού στους υπό θεραπεία ασθενείς.<sup>36</sup> Συγκεκριμένα, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε μετά

από θεραπεία με BILN 2061, ελήφθησαν και καλλιεργήθηκαν ανεξάρτητες αποικίες κυττάρων, στις οποίες ανιχνεύθηκαν διάφορες μεταλλάξεις στο γονίδιο της NS3 πρωτεάσης. Οι μοριακοί κλώνοι περιείχαν υποκατάσταση ενός μόνο αμινοξέος A156T, A156V, D168V, που είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση της αποτελεσματικότητας του BILN 2061 κατά 390, 344 και 330 φορές, αντίστοιχα, σε σύγκριση με το μη μεταλλαγμένο τύπο. Επιπλέον, ένα πειραματικό σχήμα χορήγησης σε πιθήκους, που περιελάμβανε υψηλές δόσεις του συμπλόκου για 4 εβδομάδες, οδήγησε στην ανάπτυξη καρδιακών αλλοιώσεων. Αν και δεν έχει αναφερθεί καρδιοτοξικότητα στους ασθενείς που έχουν ήδη λάβει θεραπεία με BILN 2061, εντούτοις προς το παρόν το σύμπλοκο έχει αποσυρθεί από την ερευνητική δραστηριότητα.

- Το Compound A είναι ένας εξαπεπτιδομυμπτικός αναστολέας, ιδιαίτερα ειδικός για την NS3 πρωτεάση του HCV. Το Compound A δεν βρέθηκε να έχει κυτταροτοξική δράση. Η μείωση του ενδοκυττάρου RNA του HCV σε μη ανιχνεύσιμα επίπεδα μέσα από έναν επιβεβαιωμένο μηχανισμό δράσης του Compound A, σε συνδυασμό με την απουσία δράσης του συγκεκριμένου αναστολέα στο συνολικό RNA, καθιστά την τάξη των πεπτιδομυμπτικών αναστολέων πολλά υποσχόμενη, με θεραπευτική δυναμική για την αντιμετώπιση της HCV-λοίμωξης.<sup>37</sup>

### 3.2. Αναστολείς της RNA-εξαρτώμενης RNA πολυμεράσης

Η RNA-εξαρτώμενη RNA πολυμεράση (RNA dependent RNA polymerase, RdRp) της NS5B του HCV είναι ένα ένζυμο-κλειδί για τον ιικό πολλαπλασιασμό. Η NS5B περιέχει μια υδροφοβή περιοχή 21 αμινοξέων (αμινοξέα 571–591) στο καρβοξυτελικό άκρο, που αποτελεί διαμεμβρανικό τμήμα.<sup>38,39</sup> Ανασυνδυασμένες NS5B με έλλειψη του καρβοξυτελικού τμήματος των 21 αμινοξέων είναι ενζυμικά ανενεργές. Πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι διουκλεοτιδικά ανάλογα καθώς και διάφορα μη νουκλεοτιδικά σύμπλοκα μπορούν να λειτουργήσουν ως αναστολείς της σύνθεσης RNA, που κατευθύνεται από την NS5B του HCV.

**3.2.1. Νουκλεοτιδικά ανάλογα.** Έχει δείχθει ότι η σύνθεση του RNA που επάγεται από μονονουκλεοτιδικά και από διουκλεοτιδικά επηρεάζεται από διουκλεοτιδικά ανάλογα. Η παρουσία της 5'-φωσφορικής ομάδας στο διουκλεοτιδικό σύμπλοκο είναι απαραίτητη για την αποτελεσματική αναστολή της σύνθεσης. Η μέγιστη ανασταλτική δράση επίσης φαίνεται να εξαρτάται από

τη δυναμική συναρμογή των βάσεων μεταξύ των συμπλόκων και των τελικών βάσεων της μητρικής αλυσίδας.<sup>40</sup>

Έχουν περιγραφεί δύο υποκατεστημένα νουκλεοτιδικά ως αναστολείς του πολλαπλασιασμού του HCV. Σε μελέτες φαίνεται ότι η ταχύτητα σχηματισμού παραγώγου που καταλύεται από την NS5B μειώνεται επί παρουσίας είτε 5'-τριφωσφορικής-2'-C-μεθυλαδενοσίνης είτε 5'-τριφωσφορικής-2'-O-μεθυλκυτιδίνης. Επιπλέον, έρευνα στα διαθέσιμα νουκλεοτιδικά για αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού έδειξε ότι η 5'-τριφωσφορική-2'-C-μεθυλαδενοσίνη και η 5'-τριφωσφορική-2'-O-μεθυλκυτιδίνη εμπόδισαν την καταλυτική δράση της RNA πολυμεράσης,<sup>41</sup> με αποτέλεσμα την αναστολή της *in vitro* σύνθεσης του RNA. Γενικά, ενσωμάτωση του νουκλεοτιδικού αναλόγου στο 3'-άκρο του πολλαπλασιαζόμενου ιικού RNA οδηγεί σε τερματισμό της σύνθεσης του RNA, οφειλόμενο σε έλλειψη του 3'-υδροξυλίου, που είναι απαραίτητο για τη συνέχιση του πολυμερισμού.

Παρά την επιτυχή επιβεβαίωση της υπόθεσης ότι τα διουκλεοτιδικά ανάλογα είναι αποτελεσματικοί αναστολείς του εκ νέου πολλαπλασιασμού του RNA, σημαντικές προκλήσεις θα πρέπει να ξεπεραστούν πριν αυτή η τάξη των συμπλόκων μπορέσει να χρησιμοποιηθεί για άμεση θεραπευτική παρέμβαση. Πρώτον, τα διουκλεοτιδικά μόρια, κυρίως του RNA, είναι γενικά ασταθή. Η διαμοριακή νουκλεοφιλική παρέμβαση της 2-υδροξυλομάδας στο σακχαρικό δακτύλιο του φωσφορικού δεσμού προκαλεί αποικοδόμηση των διουκλεοτιδίων σε μονονουκλεοτιδικά και τελικά σε νουκλεοτιδικά. Τα διουκλεοτιδικά, επίσης, υδρολύονται και επηρεάζονται και από τα άλλα νουκλεόφιλα που υπάρχουν σε ένα βιολογικό σύστημα. Επιπρόσθετα, τα 5'-φωσφορικά διουκλεοτιδικά, που φαίνεται να είναι τα πλέον αποτελεσματικά στην παρεμπόδιση της έναρξης του πολλαπλασιασμού του RNA, είναι ακόμη λιγότερο σταθερά λόγω της παρουσίας μιας πρόσθετης φωσφορικής ομάδας. Επιπλέον, η πολυανιόνικη φύση των διουκλεοτιδικών μορίων παρεμποδίζει ισχυρά τη διέλευσή τους διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης λόγω της έντονης λιποφιλικότητας της κυτταρικής επιφάνειας. Τέλος, τα διουκλεοτιδικά μπορούν να συνδέονται και σε άλλα νουκλεϊκά οξέα με δεσμούς υδρογόνου, γεγονός που μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια εκλεκτικότητας για ένα δεδομένο στόχο *in vivo*.<sup>40</sup>

Χρειάζεται, επομένως, να διευκρινιστεί περαιτέρω εάν οι 5'-τριφωσφορική-2'-C-μεθυλαδενοσίνη και 5'-τριφωσφορική-2'-O-μεθυλκυτιδίνη έχουν φαρμακοκινητικά και ασφαλή χαρακτηριστικά, που να εγγυώνται την περαιτέρω χρησιμοποίησή τους στη θεραπεία της HCV-λοίμωξης.

**Πίνακας 1.** Νεότερες ουσίες στη θεραπεία της ηπατίτιδας C.

Όνομα αναστολέα	Κατηγορία αναστολέα
BILN 2061	Αναστολέας NS3 πρωτεάσης
Compound A	Αναστολέας NS3 πρωτεάσης
5'-τριφωσφορική-2'-C μεθυλαδενοσίνη	Δινουκλεοτιδικό ανάλογο - Αναστολέας RdRp της NS5B πρωτεάσης
5'-τριφωσφορική-2'-O μεθυλκυτιδίνη	Δινουκλεοτιδικό ανάλογο - Αναστολέας RdRp της NS5B πρωτεάσης
Βενζοθειαδιαζίνες	Μη νουκλεοτιδικός αναστολέας (NNIs) της RdRp της NS5B πρωτεάσης
Βενζιμιδαζόλες	Μη νουκλεοτιδικός αναστολέας (NNIs) της RdRp της NS5B πρωτεάσης
5BSL 3,2	Cis αλληλουχία κωδικοποιούσα την RdRp της NS5B πρωτεάσης
Κυκλοσπορίνη A	Ανοσοκατασταλτικό
Αλμπουφερόνη	IFN-α + λευκωματίνη
Μεριμπεοδίβη	Αναστολέας IMPDH
Βιραμιδίνη	Ανάλογο ριμπαβιρίνης
ATO	Τριοξειδίο του αρσενικού
SSG	Στιβογλυκονικό νάτριο
IL-28	Κυτταροκίνη τάξης II
IL-29	Κυτταροκίνη τάξης II

**3.2.2. Μη νουκλεοτιδικοί αναστολείς (NNIs).** Διάφοροι δομικά διακριτοί μη νουκλεοτιδικοί αναστολείς (NNIs) της RdRp του HCV έχουν αναφερθεί πρόσφατα.<sup>42</sup> Μεταξύ αυτών, η βενζοδιαζίνη, η κατανεμημένη φαινυλαλανίνη και δύο βενζιμιδαζολικά παράγωγα.<sup>43</sup> Οι τάξεις των βενζοθειαδιαζινών και βενζιμιδαζολών έχουν περιγραφεί επαρκώς και φαίνεται να εμποδίζουν αποτελεσματικά τον πολλαπλασιασμό του HCV, χωρίς ιδιαίτερη κυτταροτοξικότητα.

Και οι δύο τάξεις συμπλεγμάτων συνδέονται άμεσα με την ιική πολυμεράση NS5B και εμποδίζουν τη σύνθεση του RNA. Έχει επιβεβαιωθεί ότι δεσμεύουν τη δράση της RdRp της NS5B και ότι το συζευκτικό σημείο στο ιικό ένζυμο είναι διαφορετικό για καθεμιά από τις δύο αυτές τάξεις NNIs, καταδεικνύοντας πολλαπλές περιοχές της NS5B πρωτεάσης ως εν δυνάμει στόχο για αλλοστερική αναστολή.<sup>44,45</sup> Λαμβάνοντας αυτά υπόψη, η συνδυαστική θεραπεία με τη χρήση διαφόρων NNIs μπορεί να αποτελέσει μια μελλοντική προοπτική για αντιική θεραπεία, σε αντίθεση με την αντίστροφη μεταγραφή του HIV, στην οποία όλοι οι γνωστοί NNIs συνδέονται στην ίδια περιοχή.

Τα παράγωγα της βενζο-1,2,4-θειαδιαζίνης είναι ιδιαίτερα εκλεκτικά για τον HCV, όπως φαίνεται από την αδυναμία τους να αναστείλουν άλλες ιικές πολυμεράσες. Τα σύμπλοκα διατηρούν την εκλεκτικότητά τους έναντι της NS5B, ακόμα και για στενά σχετιζόμενες πολυμεράσες, όπως του ιού της ηπατίτιδας G (HGV/GBV-B) και του BVDV (bovine viral diarrhea virus),

καθώς και για τις DNA πολυμεράσες α και β του ξενιστή. Σύμφωνα με πρόσφατες μελέτες, επίσης, η συνέργεια στην αποτελεσματικότητα του Compound 4 (βενζο-1,2,4-τριαδιζίνη) με την IFN-α αποδεικνύει ότι έχουν διαφορετικό μηχανισμό δράσης.

**3.2.3. 5BSL 3,2.** Το 5BSL 3,2 είναι μια cis αλληλουχία, που κωδικοποιεί την RdRp της NS5B και είναι απαραίτητη για τον πολλαπλασιασμό του ιικού RNA. Το 5BSL 3,2 βρίσκεται μεταξύ των κωδικονίων 555–571 στην αλληλουχία που κωδικοποιεί την πολυπρωτεΐνη NS5B. Μένει να διευκρινιστούν ακόμα και να ανιχνευθούν πρωτεϊνικοί παράγοντες και άλλα RNA στοιχεία σημαντικά για τη λειτουργία της αλληλουχίας αυτής.<sup>46</sup>

### 3.3. Ανοσοκατασταλτικά

Εκτός όμως από τους αναστολείς των NS πρωτεασών, έχουν ανιχνευθεί και άλλοι παράγοντες που φαίνεται να παίζουν κάποιο ρόλο στη θεραπεία της HCV-λοίμωξης. Ενδεικτικά αναφέρονται τα αποτελέσματα από τη χρησιμοποίηση του ανοσοκατασταλτικού κυκλοσπορίνη A στον πολλαπλασιασμό του RNA και την έκφραση της HCV-πρωτεΐνης σε κύτταρα μολυσμένα από HCV. Συγκεκριμένα, η θεραπεία με 1 μg/mL κυκλοσπορίνης A και 100 U/mL IFN-α, που χρησιμοποιήθηκε ως έλεγχος για 7 ημέρες, μείωσε το ποσό των HCV-πρωτεϊνών σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα με ανοσολογική ανάλυση.<sup>47</sup> Αυτή η μείωση των HCV-πρωτεϊνών δεν παρατηρήθηκε σε θεραπεία με άλλα γνωστά ανοσοκατασταλτικά, όπως

το FK506. Η θεραπεία με κυκλοσπορίνη A, FK506 και IFN-α είχε πολύ μικρή επίδραση στην αύξηση των κυττάρων, υποδεικνύοντας έτσι ότι η δράση της κυκλοσπορίνης A δεν οφείλεται στην κυτταροτοξικότητα. Με real time RT PCR ανάλυση προσδιορίστηκε ότι η θεραπεία με κυκλοσπορίνη A μείωσε τον τίτλο του RNA στο 1/500 του αρχικού κατά δοσοεξαρτώμενο τρόπο, ενώ η θεραπεία με IFN-α στο 1/400 του αρχικού τίτλου. Η θεραπεία με το FK506 δεν επηρέασε καθόλου το ιικό φορτίο σε καμιά δόση.<sup>48</sup>

Είναι γενικά γνωστό ότι η κυκλοσπορίνη A ρυθμίζει τη λειτουργία δύο βασικών στόχων, συνδέεται με την κυκλοφυλίνη (cyclophilin, CyP) και αναστέλλει την καλσινευρίνη (calcineurin, CN/NF-AT οδός). Η ικανότητα σύνδεσης με την CyP παρά η αναστολή της CN/NF-AT οδού φαίνεται να είναι σημαντικότερη για την αντι-ϊκή δράση της κυκλοσπορίνης A.<sup>48</sup> Επιπρόσθετες μελέτες για την ανάλυση του μηχανισμού μπορεί να υποδείξουν όχι μόνο ένα νέο στόχο για τη θεραπεία έναντι του HCV, αλλά και κυτταρικούς παράγοντες που ελέγχουν τον πολλαπλασιασμό του HCV, άγνωστους προς το παρόν.

### 3.4. Άλλες θεραπευτικές ουσίες

**3.4.1. Αλμπουφερόνη (albuferon).** Η αλμπουφερόνη (albuferon) είναι μια νέα πρωτεΐνη 85,7 kDa, που αποτελείται από IFN-α γενετικά συντητηγμένη σε λευκωματίνη ανθρώπινου ορού. Μελέτες φάσης 1/2 αξιολόγησαν τη φαρμακοκινητική, την ασφάλεια, την ανοχή, την ανοσογενετική και τη φαρμακοδυναμική της αλμπουφερόνης σε ασθενείς στους οποίους έχει προηγούμενα αποτύχει θεραπευτική αγωγή με IFN-α, μόνη ή σε συνδυασμούς. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η αλμπουφερόνη ήταν καλά ανεκτή και είχε καλή αποτελεσματικότητα. Συγκεκριμένα, 57% των ασθενών εμφάνισαν μείωση του ιικού φορτίου του HCV κατά 0,5 log ή και παραπάνω μέσα στις πρώτες 2 εβδομάδες. Επιπλέον δεδομένα έδειξαν ότι και η διάρκεια της ιικής μείωσης ήταν στατιστικά σημαντική ( $P < 0,05$ ).<sup>49</sup>

**3.4.2. Μεριμεποδιβή (merimepodib, VX-497).** Η μεριμεποδιβή (merimepodib, VX-497) είναι ένας νέος, δυναμικός και εκλεκτικός αναστολέας της αφυδρογονάσης της μονοφωσφορικής ινοσίνης (inosine monophosphate dehydrogenase, IMPDH). Παρουσιάζει εν δυνάμει αντι-ϊκή δραστηριότητα έναντι του HCV και μειώνει τα επίπεδα των τρυσφωφωρικών του ορού, όταν χρησιμοποιείται ως μονοθεραπεία σε ασθενείς με χρόνια ηπατίτιδα C. Σε μελέτες φάσης 2b ο συνδυασμός IFN-α και μεριμεποδιβής ήταν καλά ανεκτός και πιθανόν να οδηγήσει σε πρόσθετη αντι-ϊκή δράση.<sup>50</sup> Μάλιστα, σε ασθενείς με

ηπατίτιδα C γονοτύπου 1, που δεν ανταποκρίνονταν στη θεραπεία με IFN-α και ριμπαβιρίνη, η χορήγηση θεραπείας με μεριμεποδιβή έδειξε καλή ανοχή και ενίσχυση του αντι-ϊκού αποτελέσματος.<sup>51</sup>

**3.4.3. Βιραμιδίνη (viramidine).** Η βιραμιδίνη (viramidine) συντέθηκε αρχικά ως ανάλογο της ριμπαβιρίνης, με συγκρίσιμες αντι-ϊκές ιδιότητες. Πρόσφατα, ανακαλύφθηκε ότι η βιραμιδίνη μετατρέπεται σε ριμπαβιρίνη μέσα από μια διαδικασία που καταλύεται από τη δεαμινάση της αδενοσίνης. Η μετατροπή αυτή πραγματοποιείται κυρίως στο ήπαρ μετά από *per os* χορήγηση, οδηγώντας έτσι σε ριμπαβιρίνη με καλύτερη στόχευση του ήπατος. Προκλινικές και κλινικές μελέτες έχουν δείξει ότι η βιραμιδίνη έχει ασφαλέστερο προφίλ και εμφανίζει μειωμένη προδιάθεση για αιμολυτική αναιμία. Κλινικές δοκιμές φάσης I έδειξαν ότι η βιραμιδίνη είναι καλά ανεκτή, τόσο από υγιείς όσο και από ασθενείς με ηπατίτιδα C. Η βιραμιδίνη βρίσκεται σε φάση δύο κλινικών δοκιμών, τα αποτελέσματα των οποίων θα χρησιμοποιηθούν για να καθορίσουν τη δόση σε επόμενη φάση δοκιμών. Τα αντι-ϊκά αποτελέσματα της βιραμιδίνης οφείλονται σε δύο μηχανισμούς, καθώς δρα ως προφάρμακο της ριμπαβιρίνης και ως αναστολέας για τον καταβολισμό της ριμπαβιρίνης.<sup>52</sup>

**3.4.4. Τριοξειδίο του αρσενικού (ATO) και στιβογλυκονικό νάτριο (SSG).** Χρησιμοποιώντας ένα σύστημα υπογονιδιωματικών αντιγράφων RNA του HCV, μια σειρά φαρμάκων που έχουν χρησιμοποιηθεί μέχρι πρόσφατα για την αντιμετώπιση άλλων ανθρώπινων νοσημάτων εξετάστηκαν για να διαπιστωθεί κατά πόσο εμφανίζουν αντι-ϊκές ιδιότητες και έναντι του HCV. Το τριοξειδίο του αρσενικού (arsenic trioxide, ATO),<sup>53</sup> ένα σύμπλοκο που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της οξείας προμυελοκυτταρικής λευχαιμίας, και το στιβογλυκονικό νάτριο (sodium stibogluconate, SSG),<sup>54</sup> που χρησιμοποιείται στην αντιμετώπιση της λείσμανιάσης, βρέθηκε ότι είναι ικανά να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό του HCV σε αυθεντικά HCV-συστήματα πολλαπλασιασμού. Συγκεκριμένα, 300 nM ATO πέτυχαν να αναστείλουν τον πολλαπλασιασμό μερικά σε δύο και πλήρως σε ένα από τα πέντε μελετώμενα συστήματα. Σχεδόν πλήρης αναστολή πολλαπλασιασμού του ιού διαπιστώθηκε σε 4 από τα 6 συστήματα με 100 ng/mL SSG, δόση χαμηλότερη από αυτή που απαιτείται για τη θεραπεία της λείσμανιάσης. Μένει πλέον να αξιολογηθεί ο ρόλος των φαρμάκων αυτών στη θεραπευτική της HCV-λοίμωξης με κλινικές δοκιμές.

**3.4.5. Κυτταροκίνες.** Οι ιντερλευκίνες 28 (IL-28) και 29 (IL-29), μια πρόσφατα εντοπισμένη οικογένεια της

τάξης II των κυτταροκινών, που έχουν στο παρελθόν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση του ιού της εγκεφαλοπάθειας, δοκιμάστηκαν για την αντι-ιική τους δραστηριότητα έναντι του HCV. Με μια σειρά πειραμάτων φάνηκε ότι οι IL-28 και IL-29 έχουν αντι-ιική δράση έναντι ενός μεγάλου αριθμού ιών, μεταξύ των οποίων και οι ιοί της οικογένειας των φλαβοϊών.<sup>55</sup>

Συμπερασματικά, με την εφαρμογή των νέων συστημάτων πολλαπλασιασμού του ιού διευρύνονται διαρκώς οι δυνατότητες για την ανακάλυψη και την αξιολόγηση νέων ουσιών στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας C. Με δεδομένα τις σημαντικές ανεπιθύμητες ενέργειες

και τη μειωμένη αποτελεσματικότητα των διαθέσιμων θεραπειών καθίσταται αναγκαία η στροφή προς νεότερες προσεγγίσεις αντιμετώπισης της λοίμωξης. Ωστόσο, δεν έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι σήμερα σε ευρεία κλίμακα κλινικές δοκιμές, που να κατοχυρώνουν όλες τις νεότερες θεραπευτικές προσεγγίσεις και να ισχυροποιούν την εφαρμογή τους στην καθημέρα πράξη. Επί του παρόντος, για τις ουσίες αυτές μένει να εξεταστεί σε βάθος η ασφάλεια, η αντοχή, η αντι-ιική δραστηριότητα και η φαρμακοκινητική συμπεριφορά πριν από την εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για τη χρησιμοποίησή τους στη θεραπευτική της HCV-λοίμωξης.

## ABSTRACT

### ***In vitro* hepatitis C virus replication systems and novel therapeutic agents for chronic hepatitis C**

F. NTZIORA, G. MAGIORKINIS, A. HATZAKIS

*National Retrovirus Reference Center, Department of Hygiene and Epidemiology, Medical School, University of Athens, Athens, Greece*

*Archives of Hellenic Medicine 2006, 23(4):341–350*

Until recently, due to the lack of an effective cell culture system for the Hepatitis C Virus (HCV), the design of novel therapeutic agents was difficult. The recent progress in the molecular virology of HCV has created the appropriate conditions for the development of *in vitro* viral replication systems and has led to research that was previously impossible. The first viral replication systems (replicons) were subgenomic, while currently full-length replicons are available. A full-length HCV genome that replicates and produces virus particles that are infectious in cell culture (HCVcc) has allowed the study of the natural characteristics of HCV. Up until the present, recombinant interferon (IFN)  $\alpha$ -2a,  $\alpha$ -2b and pegylated interferon (PEG-IFN) alone or in combination with ribavirin have been the only approved available treatments. Serious side-effects and low efficacy of the current treatments, along with high prevalence of the infection worldwide mandate that new therapeutic agents need to be developed. NS3 protease, responsible for the release of non-structural viral proteins, and RNA-dependent-RNA-polymerase (RdRp) of NS5B are potential targets. Apart from the NS protease inhibitors other compounds play a significant role in the treatment of HCV infection, among which cyclosporin A, albuferon, merimepodib or VX-497, viramidin, arsenic trioxide (ATO), sodium stibogluconate (SSG) and interleukins 28 (IL-28) and 29 (IL-29) are examples.

**Key words:** Hepatitis C, Novel therapeutic agents, Replicons

## Βιβλιογραφία

1. REED KE, XU J, RICE CM. Phosphorylation of the hepatitis C virus NS5A protein *in vitro* and *in vivo*: Properties of the NS5A-associated kinase. *J Virol* 1997, 71:7187–7197
2. NOLTE FS. Hepatitis C virus genotyping: Clinical implications and methods. *Mol Diagn* 2001, 6:265–277
3. GLUE P, ROUZIER-PANIS R, RAFFANEL C, SABO R, GUPTA SK, SALFI M ET AL. A dose-ranging study of pegylated interferon  $\alpha$ -2b and ribavirin in chronic hepatitis C. The Hepatitis C Intervention Therapy Group. *Hepatology* 2000, 32:647–653
4. HU KQ, VIERLING JM, REDEKER AG. Viral, host and interferon-related factors modulating the effect of interferon therapy for hepatitis C virus infection. *J Viral Hepat* 2000, 8:1–18
5. REDDY KR, WRIGHT TL, POCKROS PJ, SHIFFMAN M, EVERSON G, REINDOLLAR R ET AL. Efficacy and safety of pegylated (40-kd) interferon  $\alpha$ -2a compared with interferon  $\alpha$ -2a in noncirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001, 33:433–438



6. BLIGHT KJ, McKEATING JA, MARCOTRIGIANO J, RICE CM. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J Virol* 2003, 77:3181–3190
7. PIETSCHMANN T, LOHMANN V, KAUL A, KRIEGER N, RINCK G, RUTTER G ET AL. Persistent and transient replication of full-length hepatitis C virus genomes in cell culture. *J Virol* 2002, 76:4008–4021
8. BARTENSCHLAGER R, AHLBORN-LAAKE L, MOUS J, JACOBSEN H. Kinetic and structural analyses of hepatitis C virus polyprotein processing. *J Virol* 1994, 68:5045–5055
9. GRAKOU I, WYCHOWSKI C, LIN C, FEINSTONE SM, RICE CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993, 67:1385–1395
10. HONDA M, KANEKO S, KAWAI H, SHIROTA Y, KOBAYASHI K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology* 2001, 120:955–966
11. SELBY MJ, CHOO QL, BERGER K, KUO G, GLAZER E, ECKART M ET AL. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 1993, 74:1103–1113
12. LOHMANN V, KORNER F, DOBIERZEWSKA A, BARTENSCHLAGER R. Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* 2001, 75:1437–1449
13. BUKH J, PIETSCHMANN T, LOHMANN V, KRIEGER N, FAULK K, ENGLE RE ET AL. Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, 99:14416–14421
14. LOHMANN V, KORNER F, KOCH J, HERIAN U, THEILMANN L, BARTENSCHLAGER R. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999, 285:110–113
15. KRIEGER N, LOHMANN V, BARTENSCHLAGER R. Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* 2001, 75:4614–4624
16. VROLIJK JM, KAUL A, HANSEN BE, LOHMANN V, HAAGMANS BL, SCHALM SW ET AL. A replicon-based bioassay for the measurement of interferons in patients with chronic hepatitis C. *J Virol Methods* 2003, 110:201–209
17. BLIGHT KJ, McKEATING JA, RICE CM. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2002, 76:13001–13014
18. MURRAY EM, GROBLER JA, MARKEL EJ, PAGNONI MF, PAONESSA G, SIMON AJ ET AL. Persistent replication of hepatitis C virus replicons expressing the beta-lactamase reporter in subpopulations of highly permissive Huh-7 cells. *J Virol* 2003, 77:2928–2935
19. ALI S, PELLERIN C, LAMARRE D, KUKOLJ G. Hepatitis C virus subgenomic replicons in the human embryonic kidney 293 cell line. *J Virol* 2004, 78:491–501
20. ZHU Q, GUO JT, SEEGER C. Replication of hepatitis C virus subgenomes in non-hepatic epithelial and mouse hepatoma cells. *J Virol* 2003, 77:9204–9210
21. PIETSCHMANN T, LOHMANN V, RUTTER G, KURPANIK K, BARTENSCHLAGER R. Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J Virol* 2001, 75:1252–1264
22. TROZZI C, BARTHOLOMEW L, CECCACCI A, BIASIOL G, PACINI L, ALTAMURA S ET AL. *In vitro* selection and characterization of hepatitis C virus serine protease variants resistant to an active-site peptide inhibitor. *J Virol* 2003, 77:3669–3679
23. LABONTE P, MORIN N, BOWLIN T, MOUNIR S. Basal replication of hepatitis C virus in nude mice harboring human tumor. *J Med Virol* 2002, 66:312–319
24. MERCER DF, SCHILLER DE, ELLIOTT JF, DOUGLAS DN, HAO C, RINFRET A ET AL. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat Med* 2001, 7:927–933
25. LINDENBACH BD, EVANS MJ, SYDER AJ, WOLK B, TELLINGHUISEN TL, LIU CC ET AL. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 2005, 309:623–626
26. MORENO-OTERO R. Therapeutic modalities in hepatitis C: Challenges and development. *J Viral Hepat* 2005, 12:10–19
27. WANG M, NG KK, CHERNEY MM, CHAN L, YANNOPOULOS CG, BEDARD J ET AL. Non-nucleoside analogue inhibitors bind to an allosteric site on HCV NS5B polymerase. Crystal structures and mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 2003, 278:9489–9495
28. BEAULIEU P, LLINAS-BRUNET M. Therapies for hepatitis C infection: Targeting the non structural proteins of HCV. *Curr Med Chem Anti-Infect Agents* 2002, 1:163–176
29. LLINAS-BRUNET M, BAILEY MD, BOLGER G, BROCHU C, FAUCHER AM, FERLAND JM ET AL. Structure-activity study on a novel series of macrocyclic inhibitors of the hepatitis C virus NS3 protease leading to the discovery of BILN 2061. *J Med Chem* 2004, 47:1605–1608
30. LESK AM, FORDHAM WD. Conservation and variability in the structures of serine proteinases of the chymotrypsin family. *J Mol Biol* 1996, 258:501–537
31. NARJES F, KOCH U, STEINKUHLER C. Recent developments in the discovery of hepatitis C virus serine protease inhibitors: towards a new class of antiviral agents? *Expert Opin Investig Drugs* 2003, 12:153–163
32. BIANCHI E, PESSI A. Inhibiting viral proteases: Challenges and opportunities. *Biopolymers* 2002, 66:101–114
33. POLIAKOV A, JOHANSSON A, AKERBLOM E, OSCARSSON K, SAMUELSSON B, HALLBERG A ET AL. Structure-activity relationships for the selectivity of hepatitis C virus NS3 protease inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 2004, 1672:51–59
34. LAMARRE D, ANDERSON PC, BAILEY M, BEAULIEU P, BOLGER G, BONNEAU P ET AL. An NS3 protease inhibitor with antiviral effects in humans infected with hepatitis C virus. *Nature* 2003, 426:186–189
35. REISER M, HINRICHSSEN H, BENHAMOU Y, REESINK HW, WEDEMEYER H, AVENDANO C ET AL. Antiviral efficacy of NS3-serine protease inhibitor BILN-2061 in patients with chronic genotype 2 and 3 hepatitis C. *Hepatology* 2005, 41:832–835
36. LU L, PILOT-MATIAS TJ, STEWART KD, RANDOLPH JT, PITHAWALLA R, HE W ET AL. Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48:2260–2266
37. PAUSE A, KUKOLJ G, BAILEY M, BRAULT M, DO F, HALMOS T ET AL. An NS3 serine protease inhibitor abrogates replication of subgenomic hepatitis C virus RNA. *J Biol Chem* 2003, 278:20374–20380

38. IVASHKINA N, WOLK B, LOHMANN V, BARTENSCHLAGER R, BLUM HE, PENIN F ET AL. The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase membrane insertion sequence is a transmembrane segment. *J Virol* 2002, 76:13088–13093
39. SCHMIDT-MENDE J, BIECK E, HUGLE T, PENIN F, RICE CM, BLUM HE ET AL. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001, 276:44052–44063
40. ZHONG W, AN H, BARAWKAR D, HONG Z. Dinucleotide analogues as novel inhibitors of RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47:2674–2681
41. CARROLL SS, TOMASSINI JE, BOSSERMAN M, GETTY K, STAHLHUT MW, ELDRUP AB ET AL. Inhibition of hepatitis C virus RNA replication by 2'-modified nucleoside analogs. *J Biol Chem* 2003, 278:11979–11984
42. SARISKY RT. Non-nucleoside inhibitors of the HCV polymerase. *J Antimicrob Chemother* 2004, 54:14–16
43. CHAN L, REDDY TJ, PROULX M, DAS SK, PEREIRA O, WANG W ET AL. Identification of N,N-disubstituted phenylalanines as a novel class of inhibitors of hepatitis C NS5B polymerase. *J Med Chem* 2003, 46:1283–1285
44. NGUYEN TT, GATES AT, GUTSHALL LL, JOHNSTON VK, GU B, DUFFY KJ ET AL. Resistance profile of a hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase benzothiadiazine inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother* 2003, 47:3525–3530
45. TOMEI L, ALTAMURA S, BARTHOLOMEW L, BISBOCCI M, BAILEY C, BOSSERMAN M ET AL. Characterization of the inhibition of hepatitis C virus RNA replication by non nucleosides. *J Virol* 2004, 78:938–946
46. YOU S, STUMP DD, BRANCH AD, RICE CM. A cis-acting replication element in the sequence encoding the NS5B RNA-dependent RNA polymerase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* 2004, 78:1352–1366
47. KIANI A, RAO A, ARAMBURU J. Manipulating immune responses with immunosuppressive agents that target NFAT. *Immunity* 2000, 12:359–372
48. WATASHI K, HIJIKATA M, HOSAKA M, YAMAJI M, SHIMOTOHNO K. Cyclosporin A suppresses replication of hepatitis C virus genome in cultured hepatocytes. *Hepatology* 2003, 38:1282–1288
49. BALAN V, SULKOWSKI M, NELSON D, EVERSON G, DICKSON R, LAMBIASE L ET AL. Albuferon – A novel therapeutic agent for hepatitis C: Interim results of a phase 1/2 study and molecular profiles of drug response. In: *Hep Dart Hawaii*, 2003
50. McHUTCHISON JG, SHIFFMAN ML, CHEUNG RC, GORDON SC, WRIGHT TL, POTTAGE JC Jr ET AL. A randomized, double-blind, placebo-controlled dose-escalation trial of merimepodib (VX-497) and interferon-alpha in previously untreated patients with chronic hepatitis C. *Antivir Ther* 2005, 10:635–643
51. MARCELLIN P, HORSMANS Y, NEVENS F, GRANGER JD, BRONOWICKI JP, VETTER D ET AL. A phase II, placebo-controlled study of merimepodib (VX-497), pegylated interferon-alfa, and ribavirin in patients with chronic hepatitis C non-responsive to therapy with interferon-alfa and ribavirin: Week 24 results. In: *HepDart Hawaii*, 2003
52. WU JZ, LARSON G, HONG Z. Dual-action mechanism of viramidine functioning as a prodrug and as a catabolic inhibitor for ribavirin. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48:4006–4008
53. HWANG DR, TSAI YC, LEE JC, HUANG KK, LIN RK, HO CH ET AL. Inhibition of hepatitis C virus replication by arsenic trioxide. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48:2876–2882
54. YEH CT, HWANG DR, LAI HY, HSU JT. Inhibition of authentic hepatitis C virus replication by sodium stibogluconate. *Biochem Biophys Res Commun* 2003, 310:537–541
55. SHEPPARD P, KINDSVOGEL W, XU W, HENDERSON K, SCHLUTSMEYER S, WHITMORE TE ET AL. IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R. *Nat Immunol* 2003, 4:63–68

*Corresponding author:*

A. Hatzakis, Department of Hygiene and Epidemiology, Medical School, University of Athens, 75 Mikras Asias street, GR-115 27 Athens, Greece  
e-mail: ahatzak@cc.uoa.gr

---