UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra genetiky a mikrobiologie

Je interní vazebné místo pro ribozóm u viru hepatitidy typu C vhodný cíl pro léčbu?

(Internal ribosome entry site of the hepatitis C virus as a possible target for therapy)

Bakalářská práce

Vypracovala: Kristina Roučová

Školitel: RNDr. Martin Pospíšek, Ph.D.

Praha 2010

1 Obsah

1 Obsah ... 2
2 Abstrakt a klíčová slova ... 3
3 Seznam zkratek ... 4
4 Úvod ... 5
5 HCV IRES ... 7
6 Buněčné RNA interagující s HCV IRES ... 8
6.1 miRNA-122 ... 9
6.2 miRNA-199a* ... 10
7 Uměle připravené RNA a DNA interagující s HCV IRES ... 11
7.1 Antisense oligonukleotidy ... 11
7.1.1 ISIS 14803 ... 11
7.2 Ribozymy ... 12
8 Nízkomolekulární látky interagující s IRES ... 12
8.1 Vitamin B12 ... 13
8.2 Phenazinové deriváty ... 15
8.3 Biaryl guanidiny ... 17
8.4 Peptidové aptamery ... 18
8.5 Mifepriston ... 19
9 Závěr ... 20
10 Seznam literárních zdrojů ... 21

2 Abstrakt

Infekcí virem žloutenky typu C jsou postižena asi 3 % světové populace. Pokroky v molekulární biologii a lepší znalost životního cyklu viru žloutenky typu C přispívají k vývoji specificky cílené léčby hepatitidy C. Nově vyvíjená léčba se zaměřuje mimo jiné na vnitřní vazebné místo pro ribozóm (IRES), které je pro svou vysokou sekvenční a strukturní konzervovanost atraktivním cílem terapie. Navíc by inhibice funkce IRES znemožnila časný a zásadní krok v životním cyklu viru, translaci virové RNA, a zabránila tak propagaci viru. Přístupy vedoucí k inhibici translace jsou cíleny jak na strukturu, tak i na nukleotidovou sekvenci HCV IRES. Jako potencionální budoucí terapeutické látky jsou testovány jednak syntetické nukleové kyseliny, antisense oligonukleotidy a ribozymy, a také nízkomolekulární látky. V této práci je věnována pozornost především nízkomolekulárním látkám interagujícím s IRES sekvencí.

Klíčová slova: virus žloutenky typu C, vnitřní vazebné místo pro ribozóm, translace, léčba žloutenky typu C, inhibitory IRES

Abstract

Hepatitis C virus infects about 3 % of world's population. Progress in molecular biology and better knowledge of hepatitis C virus life cycle contribute to the development of specifically targeted antiviral therapies for HCV. This new treatment also targets the internal ribosome entry site (IRES), which is highly conserved and therefore an attractive target for intervention. In addition, inhibition of IRES function could disable the propagation of the virus early in the HCV life cycle. Novel therapeutics are aimed both at the HCV IRES structure and its nucleotide sequence. Small molecules and synthetic nucleic acids, e.g. antisense oligonucleotides and ribozymes, have been tested as potential therapeutic substances. In this paper particular attention is paid to small molecules interacting with HCV IRES.

Keywords: hepatitis C virus, internal ribosome entry site, translation, hepatitis C therapies, IRES inhibitors

3 Seznam zkratek

ALT	Alanine transaminase;	alaninaminotransferáza
CSFV	Classical swine fever virus;	virus klasického moru prasat
eIF	eukaryotic Initiation Factor;	eukaryotický iniciační faktor
EMCV	Encephalomyocarditis virus;	virus encefalomyokarditidy
ETR	End of Treatment Response;	odpověď dosažená na konci léčby
HCV	Hepatitis C Virus;	virus žloutenky typu C
IC	Inhibitory concentration;	inhibiční koncentrace
IRES	Internal Ribosome Entry Site;	vnitřní vazebné místo pro ribozóm
RNA	Ribonucleic acid;	ribonukleová kyselina
SVR	Sustained Viral Response;	setrvalá virová odpověď
UTR	Untranslated region;	nepřekládaná oblast

4 Úvod

Virus žloutenky typu C je obalený (+)RNA virus řazený do rodu *Hepacivirus* čeledi *Flaviviridae*. Genom viru žloutenky typu C je dlouhý přibližně 9600 nukleotidů. Obsahuje jeden otevřený čtecí rámec a dvě nepřekládané oblasti (UTR). Čtecí rámec kóduje jediný polyprotein, jenž je štěpen hostitelskými a virovými enzymy na 10 produktů se strukturní i nestrukturní funkcí. UTR na 3´ i 5´ konci genomu HCV hrají důležitou roli během translace a replikace virové RNA. Po vstupu viru do buňky a následném rozbalení dochází nejdříve k translaci virové RNA. Iniciace translace probíhá na speciální struktuře v 5´UTR, jež je velmi strukturně a sekvenčně konzervovaná. Díky své funkci byla struktura pojmenována vnitřní vazebné místo pro ribozóm (Internal Ribosome Entry Site; IRES) a bude podrobněji popsána níže (pro přehled viz Joyce a Tyrrell 2010). Pro translaci a tím i životní cyklus viru je existence a funkčnost IRES sekvence naprosto klíčová. Většina mutací v oblasti IRES způsobuje buď nižší účinnost translace, nebo úplnou ztrátu schopnosti vázat ribozóm, pokud není následována kompenzační mutací pro zachování struktury. Z toho vyplývá, že všechny životaschopné viry musí obsahovat IRES sekvenci maximálně strukturně zachovalou (Pestova *et al.* 1998).

Genom HCV je vysoce sekvenčně heterogenní díky vysoké chybovosti virové replikázy, která postrádá 3´ -> 5´ opravnou aktivitu. K chybnému zařazení nukleotidu dochází jednou za 10 000 – 100 000 nukleotidů, což při dané délce virové RNA znamená přibližně jednu bodovou mutaci ve virovém genomu během každého replikačního cyklu. Vzhledem k faktu, že se v chronicky nemocném jedinci vytvoří až bilion nových virových partikulí denně, nevyskytují se tedy v hostiteli sekvenčně zcela identické viry (pro přehled viz Thimme a Roggendorf 2007). Takto vysoká mutační rychlost představuje velký problém v léčbě.

Virus žloutenky typu C vykazuje diverzitu do té míry, že se jeho varianty popisují pojmem „kvazidruhy“. Známé virové genomy HCV se dělí do 6 hlavních genotypů a v rámci nich do dalších 52 subtypů. Mezi genotypy je sekvenční identita po celé délce genomu asi 66 - 69 %, mezi subtypy 77 - 80 % a 91 - 99 % v rámci jednoho subtypu. Celosvětové rozšíření jednotlivých genotypů se výrazně liší. Zatímco genotypy 1b, 2a a 2b se vyskytují celosvětově, ostatní genotypy převládají v určitých geografických oblastech: genotyp 1a je běžný v severní Evropě a USA, genotyp 3 je převážně zastoupený na Indickém subkontinentu, genotyp 4 v Africe a na Středním východě, genotyp 5 v jižní Africe a genotyp 6 v jihovýchodní Asii (pro přehled viz Fishman a Branch 2009, Joyce a Tyrrell 2010).

Virem hepatitidy C jsou v současné době infikována asi 3 % světové populace. Pokud není infekce léčena, postoupí asi 70 % nakažených do stádia chronické infekce, která může vést až k cirhóze jater nebo vzniku hepatocelulárního karcinomu. Žádná účinná vakcína proti HCV doposud nebyla vyvinuta. Účinnost dosavadní léčby pomocí pegylovaného interferonu a ribavirinu je průměrně asi 50 %, z čehož vyvstává snaha o vývoj nové, efektivnější léčby. Takto nízké procento účinnosti je dáno různou citlivostí genotypů na současnou léčbu. Zatímco pacienti infikovaní genotypy 2-6 pozitivně odpovídají na léčbu v 70 - 80 % případů, pacienti nakažení genotypem 1 pouze v 45 % případů. Nejběžnější současné léčebné schéma sestává z pegylovaného interferonu-α2b (případně PEG-IFN-α2a) aplikovaného podkožně jednou týdně a ribavirinu podávaného ústně každý den (Hügle a Cerny 2003).

Léčba je často špatně tolerována pacienty, u nichž dochází k výrazným projevům vedlejších účinků. Mezi vedlejší účinky léčby interferonem patří únava, symptomy podobné chřipce a deprese někdy vedoucí až k sebevraždám. Pro kompenzaci těchto efektů bývají pacientům podávána antidepresiva. Podávání ribavirinu může vést k vyvolání hemolytické anémie, jejíž důsledky jsou zmírňovány pomocí erythropoetinu. Navíc je léčba kontraindikována v těhotenství, při depresích, anémii a onemocněních poškozujících játra. Pro velkou část infikovaných jedinců se tak léčba stává buď nevhodnou nebo ji sami odmítají v obavách ze snížení kvality života (Kwong *et al.* 2006).

Z důvodu nízké účinnosti dosavadní léčby se usiluje o vývoj nové, tolerovatelnější a specifičtější léčby žloutenky typu C (Speciffically Targeted Antiviral Therapies for HCV; STAT-C). Tato je zaměřena na charakteristické kroky v životním cyklu viru žloutenky typu C, jako např. vstup do buňky, nebo na inhibici virových enzymů, jako jsou virová proteáza a virová polymeráza, ale také na inhibici funkce IRES (Kwong *et al.* 2006). Kvůli vysoké mutační rychlosti je však inhibice virových enzymů obtížná. V případě IRES sekvence, která je vysoce strukturně a sekvenčně konzervovaná, by však potencionální lék nemusel podstupovat složité úpravy při každé změně sekvence. Navíc jsou všechny další kroky v životním cyklu viru žloutenky typu C závislé na předchozí translaci virových enzymů, která by při úspěšném bloku IRES sekvence nebyla možná. Tyto poznatky tak dělají z IRES sekvence velmi atraktivní cíl budoucí terapie (Jubin 2003, Gallego a Varani 2002).

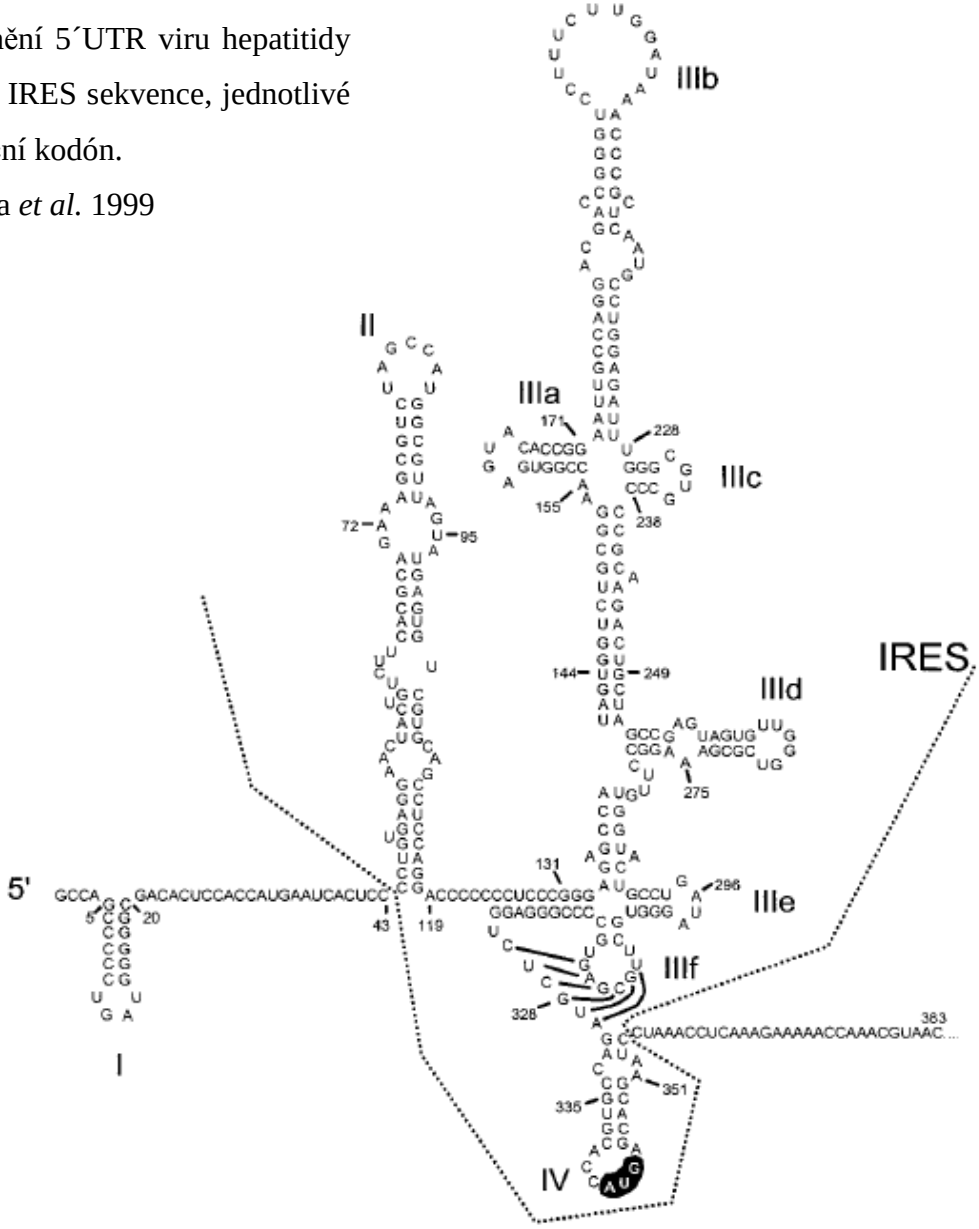
Cílem této práce je obeznámit čtenáře s dosavadními výsledky výzkumu látek interagujících s HCV IRES a s případnými pokusy o jejich využití v léčbě infekce virem hepatitidy C.

5 HCV IRES

Virová RNA postrádá na svém 5´ konci methyl-guanosinovou čepičku, která by zajišťovala nasednutí ribozómu a tím produkci virových proteinů. K nasednutí ribozómu dochází mimo samotný 5´ konec virové RNA, v oblasti, která byla díky své funkci pojmenována vnitřní vazebné místo pro ribozóm (IRES). IRES sekvence v genomu HCV byla identifikována již v roce 1992 (Tsukiyama-Kohara *et al.* 1992).

IRES sekvence HCV se rozkládá téměř po celém 5´UTR a zasahuje i do kódující oblasti genomu HCV (viz Obr. 1). Začátek IRES sekvence se nachází kolem čtyřicátého nukleotidu 5´UTR (Rijnbrand 1995). Součástí IRES je i iniciační kodón ^{342}AUG a asi 12-30 prvních nukleotidů otevřeného čtecího rámce (Reynolds *et al.* 1995).

Obr. 1: Znázornění 5´UTR viru hepatitidy C. Vyznačena je IRES sekvence, jednotlivé domény a iniciační kodón.
Převzato z Honda *et al.* 1999



Vnitřní vazebné místo pro ribozóm HCV je vysoce strukturované. RNA této sekvence vytváří díky komplementaritě svých úseků četné vlásenky, které lze rozčlenit do jednotlivých domén II-IV. Vlásenka v doméně II zahrnuje nukleotidy 44-118 a má nevětvenou strukturu s několika smyčkami, které jsou způsobeny krátkými nepárujícími úseky. Doména III obsahuje složitě větvenou vlásenku, jejíž části se popisují písmeny a-f. Párováním mezi smyčkou IIIf a nukleotidy 325-330 a párováním nukleotidů 126-134 a 315-323 se vytváří pseudouzel. Vlásenka v doméně IV obsahuje iniciační kodón a k párování 5´UTR s kódující oblasti dochází až do nukleotidu 354 (Lukavsky *et al.* 2000, Honda *et al.* 1996, Honda *et al.* 1999, Wang *et al.* 1995).

Všechny výše zmíněné strukturní prvky jsou důležité pro efektivní iniciaci translace řízené HCV IRES. Malá podjednotka ribozómu (40 S) interaguje svou vnější částí především se spodní částí domény III tvořené vlásenkami IIIc-IIIf. 40 S je také v kontaktu s doménou II, která obsazuje místo E ribozomální podjednotky a umožňuje správné navázání domény IV, kdy je iniciační kodón umístěn přímo do P místa. Vrchní část domény III, vlásenky IIIa-IIIc jsou zodpovědné za vazbu eIF3, jenž umožňuje efektivní vytvoření 48 S komplexu navázáním $tRNA^{Met}$-eIF2-GTP komplexu. Následným připojením velké ribozomální podjednotky (60S) pomocí eIF5b vzniká celý 80 S komplex ribozómu připravený na translaci (Pestova *et al.* 1998, Kieft *et al.* 2001, Boehringer *et al.* 2005, Lukavsky 2009).

Na úspěšné translaci virové RNA a produkci virových proteinů závisí celý životní cyklus virů. Elegantnímu zneužití translačního aparátu hostitelské buňky jedinečnou IRES sekvencí HCV by se však dalo zabránit využitím právě její unikátnosti. Inhibice IRES sekvence viru hepatitidy C by umožňovala zásah proti virové infekci již v rané fázi životního cyklu HCV.

6 Buněčné RNA interagující s HCV IRES

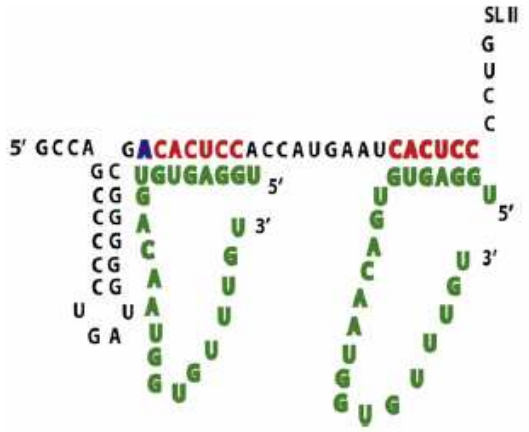
MicroRNA (miRNA, miR) jsou malé, 21-25 nukleotidů dlouhé, nekódující molekuly RNA, které se v buňce podílí na posttranskripční, sekvenčně specifické regulaci genové exprese (Pillai 2005). Podle míry komplementarity s cílovou sekvencí je mRNA buď degradována, nebo je zabráněno její translaci. Rozeznávaná sekvence se nejčastěji nachází blízko 3´ konce mRNA. Cílem pro miRNA však nejsou pouze buněčné mRNA. Ukázalo se, že určité buněčné miRNA jsou schopné párovat i s virovými RNA. Mohou tak sloužit jako antivirová obrana buňky (Lecellier *et al.* 2005). Zároveň ale bylo zjištěno, že některé viry využívají těchto molekul ve svém životním cyklu, ba co víc, určité DNA viry kódují vlastní miRNA (Pietschmann 2009).

6.1 miRNA-122

Jako první z miRNA interagujících s HCV byla popsána miRNA-122, která je specificky přepisována v játrech, kde tvoří až 70 % z celkového počtu miRNA (Lagos-Quintana *et al.* 2002). Kromě regulace buněčných mRNA se váže tato miRNA na dvě vazebná místa v 5´UTR genomu HCV (viz Obr. 2). K prvnímu Watson-Crickovskému párování dochází mezi 5´ koncem miRNA-122 a nukleotidy 22-30 HCV RNA, k druhému pak opět mezi 5´ koncem miRNA-122 a nukleotidy 38-43 HCV RNA (Jopling *et al.* 2008). Právě druhé vazebné místo, jež z části překrývá začátek IRES sekvence, by teoreticky mohlo ovlivňovat účinnost virové translace.

Účinek vazby miRNA-122 na HCV RNA byl však překvapující. Zatímco vazba miRNA-122 na cílovou sekvenci umístěnou v 3´UTR mRNA působila represi translace, jak se očekávalo, interakce s 5´UTR HCV neměla na translaci žádný vliv. Naopak bylo pozorováno, že vazba miRNA-122 umožňuje zvýšenou akumulaci virové RNA. V buňkách, ve kterých nebyla miRNA-122 detekována nebo byla vyvázána pomocí antisense oligonukleotidu, docházelo ke ztrátě virové RNA (Jopling *et al.* 2005). Mutační analýzou bylo také prokázáno, že pro efektivní působení miRNA-122 musí být obsazena obě vazebná místa, tzn. musí být navázány dvě molekuly miRNA-122 na jedné virové RNA (Jopling *et al.* 2008).

Pokud se prokáže role miRNA-122 v replikaci viru jako zásadní, mohlo by využití těchto poznatků v boji proti žloutence typu C spočívat ve vývoji terapeutik cílených právě na miRNA-122 (Jopling 2008). Efektivní, vratná inhibice aktivity miRNA-122 by se tak mohla stát novým nástrojem proti žloutence typu C.



Obr. 2: Znázornění dvou vazebných míst pro miRNA-122 v 5´UTR viru hepatitidy C. Zeleně jsou znázorněny dvě molekuly miRNA-122, červeně komplementární sekvence v genomu HCV.

Převzato z Jopling *et al. 2008*

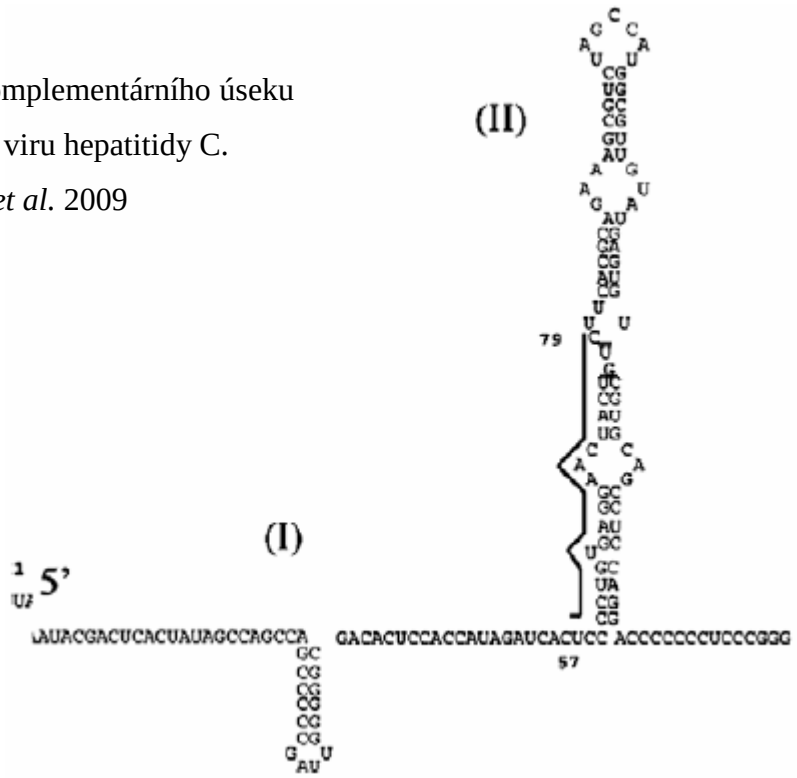
6.2 miRNA-199a*

Murakami *et al.* pojali hledání možných vazebných míst miRNA v genomu HCV z jiného konce. Pomocí analýzy *in silico* identifikovali cílovou sekvenci pro miRNA-199a* přímo v IRES sekvenci (Murakami *et al.* 2009). K párování zde dochází mezi 39 až 62 nukleotidem v závislosti na genotypu HCV, tedy na začátku domény II HCV IRES (viz Obr. 3).

Vazba miRNA-199a* na HCV RNA účinně snižuje replikaci virové RNA. Usuzuje se, že příčinou je znemožnění translace virového polyproteinu nebo navození degradace virové RNA (Pietschmann 2009). Jednalo by se tedy o stejný mechanismus, kterým jsou regulovány buněčné mRNA. Bohužel přesný mechanismus nebyl doposud prozkoumán.

miRNA-199a* se v jaterní tkáni, která je přítomností HCV v infikovaných jedincích nejvíce postižena, vyskytuje pouze v nízkých koncentracích. Alternativně lze právě hojnost viru v jaterní tkáni vysvětlit nedostatkem miRNA-199a*, jejíž negativní vliv na replikaci HCV je zcela „převálcován“ opačným vlivem miRNA-122 (Pietschmann 2009).

V experimentálních podmínkách se miRNA-199a* osvědčila jako agens cílené na IRES sekvenci a mající negativní účinek na HCV. Využití této molekuly nebo molekul od ní odvozených je však třeba zvážit kvůli její roli v buňce. Bylo identifikováno několik genů, jejichž expresní úroveň byla změněna nadměrnou přítomností miRNA-199a* (Murakami *et al.* 2009). Vliv miRNA-199a* na celý organismus i na buňku samotnou by měl být dobře zmapován před úvahami o jejím terapeutickém využití.



Obr. 3: Znázornění komplementárního úseku miRNA-199a* s IRES viru hepatitidy C. Převzato z Murakami *et al.* 2009

7 Uměle připravené RNA a DNA interagující s HCV IRES

Na sekvenční komplementaritě HCV RNA a potencionálního terapeutika je založena i technologie antisense oligonukeotidů a ribozymů. Otázkou však zůstává, jestli sekvenčně zaměřené agens by bylo schopno udržet svoji efektivitu po nezbytně dlouhou dobu pro zajištění účinného antivirového působení. Velká heterogenita genomu HCV spolu s vysokou mutační rychlostí jsou v tomto případě značnou překážkou. Cílení terapie na vysoce konzervovaný úsek genomu, jako je právě IRES sekvence, by snad mohlo umožnit úspěšnou realizaci této metody. I přes vysokou konzervovanost však k mutacím v této sekvenci dochází a je možné, že po několika replikacích za působení selekčního tlaku tímto agens dojde k selekci rezistentních klonů HCV.

7.1 Antisense oligonukleotidy

V této metodě je využito nukleových kyselin, obvykle asi 25 nukleotidů dlouhých, pro narušení translace díky Watson-Crickovskému párování s cílovou RNA (Scherer a Rossi 2003). Podobně jako u miRNA může docházet po této interakci k znemožnění translace nebo i k degradaci cílové mRNA.

Výhodou oligonukleotidů je možnost jejich snadné úpravy pro vylepšení selektivity a efektivity vazby na cílovou RNA. Nevýhodou je možná interakce s dalšími buněčnými komponentami, jako jsou proteiny a mRNA molekuly, a nízká životnost v plazmě ($t_{1/2}$ = 40 - 70 min) (McHutchinson *et al.* 2006).

7.1.1 ISIS 14803

ISIS 14803 je antisense oligodeoxynukleotid odvozený od ISIS 6547, cíleného na IRES HCV (Zhang *et al.* 1999). Původní cytidin ISIS 6547 je v ISIS 14803 nahrazen 5-methylcytidinem, čímž zvyšuje afinitu oligonukleotidu vůči cílové RNA a snižuje jeho prozánětlivou povahu. ISIS 14803 je 20 nukleotidů dlouhá molekula komplementární k HCV RNA v úseku mezi 330 a 349 nukleotidem. Při vazbě tedy dochází k překrytí iniciačního kodónu a jeho blízkého okolí, a tím i k inhibici translace virové RNA. Inhibiční účinek na translaci závislou na HCV IRES, prokázaný ve studii *in vivo*, dosahoval až 50 % při dávkování 6 mg/kg váhy zvířete. Translace závislá na čepičce nebyla ovlivněna až do vysokých dávek ISIS 14803 (Zhang *et al.* 1999).

Vliv ISIS 14803 na virovou nálož (počet kopií virové RNA na ml séra) byl zkoumán v klinické studii prováděné McHutchinsonem *et al.,* 2006. Tři z osmadvaceti pacientů infikovaných HCV vykazovali výrazný pokles virové nálože (o více než jeden řád) po léčbě intravenózně či subkutánně podávaným ISIS 14803 v dávkách 2 mg/kg tělesné hmotnosti třikrát týdně po dobu 4 týdnů. Nejzávažnějším nežádoucím účinkem během léčby bylo zvýšení sérové hodnoty ALT, při subkutánním podání léčiva pak reakce v místě podání (McHutchinson *et al.* 2006).

Podávání ISIS 14803 po dobu 4 týdnů nevedlo k výrazné selekci mutovaných variant HCV, které by byly vůči tomuto oligonukleotidu rezistentní (Soler 2003). Další studie tohoto agens však byly zrušeny (Franciscus 2010).

7.2 Ribozymy

Ribozymy jsou molekuly schopné rozeznat specifickou RNA sekvenci a enzymaticky ji štěpit. Uměle syntetizované ribozymy mohou být navrženy pro štěpení téměř jakékoliv sekvence prostou změnou párující sekvence jejich vazebného místa pro substrát (Dash *et al.* 2005). Samozřejmě je této metody využíváno i při hledání antivirových agens. Ribozymy konstruované proti HCV jsou většinou cílené do nekódujících oblastí, především do 5´UTR a IRES sekvence, neboť je tato část genomu HCV vysoce konzervovaná (Hügle a Cerny 2003). Štěpení virové RNA v oblasti IRES by pak znamenalo znemožnění translace, a tím produkce virového polyproteinu.

Jedním z vyvíjených kandidátů pro klinické využití byl Hepatozyme (Ribozyme Pharmaceuticals Inc.), který prokázal účinnou antivirovou aktivitu a selektivitu v buněčných kulturách. Účinnost při léčbě infikovaných pacientů však byla nižší než 10 % (Hügle a Cerny 2003). Kvůli nízké účinnosti, horší toleranci a vedlejším účinkům byla studie zrušena (Franciscus 2010).

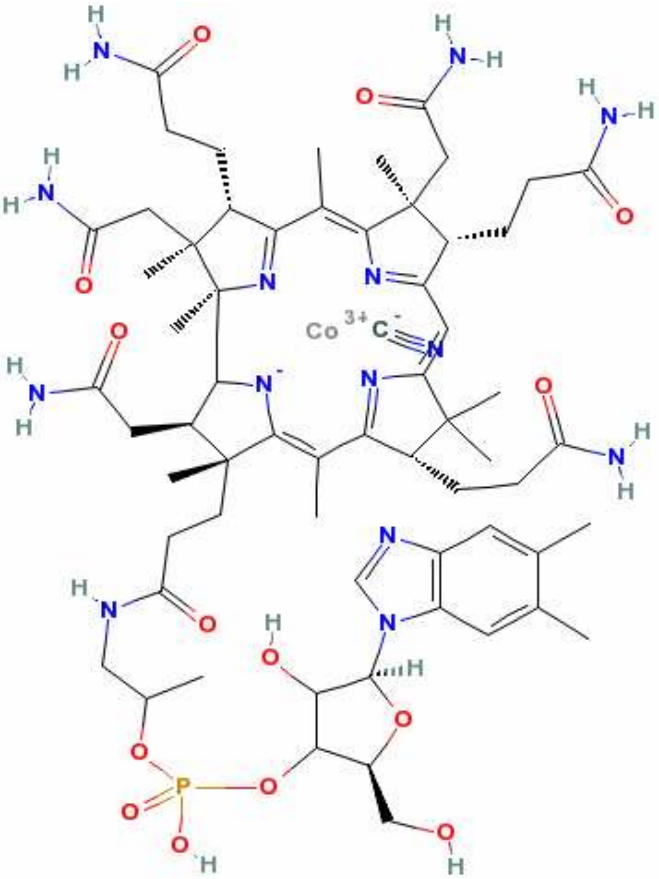
8 Nízkomolekulární látky interagující s IRES

Novým přístupem v boji proti žloutence typu C je snaha o nalezení nízkomolekulární látky, která by ovlivňovala a pokud možno inhibovala funkci HCV IRES, postrádala nepříznivé vedlejší účinky a byla dobře tolerovaná pacienty (Jefferson *et al.* 2004). Taková látka by pak byla použitelná jako doplněk nebo dokonce náhrada interferon-ribavirinové léčby. Žádoucí je, aby antivirové agens interagovalo specificky s HCV IRES na základě jeho

struktury a ne na základě jeho sekvence, neboť je to zejména struktura, jež uděluje IRES účinnost při translaci. Překonal by se tím také problém rychlé mutageneze a vzniku klonů rezistentních vůči sekvenčně specifickým léčivům.

Hledání takových látek by se však dalo přirovnat k hledání „jehly v kupce sena“. Několik studií se již s většími nebo menšími úspěchy o identifikaci takových látek pokoušelo. Prozatím se však žádná z popisovaných látek nepropracovala ke kýženému cíli stát se léčivem proti žloutence typu C.

Následující kapitola bude probrána podrobněji, neboť si myslím, že právě nízkomolekulární látky mají největší potenciál stát se specifickým inhibitorem HCV IRES.



Obr. 4: Struktura kyanokobalaminu.
Převzato z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
SID 46509031

8.1 Vitamin B12

Kobalamin a jeho formy – kyanokobalamin, methylkobalamin, adenosylkobalamin, hydroxokobalamin – patří do komplexu vitaminu B12. Základ jejich struktury je corrinový kruh, složený z propojených heterocyklů, s koordinačně vázaným atomem kobaltu (viz Obr. 4). V lidském těle je potřebný hlavně pro správnou funkci nervového systému a krvetvorbu.

Afinitní chromatografií byla prokázána schopnost vitaminu B12 specificky se vázat na RNA molekuly tvořící pseudouzly (Lorsch & Szostak 1994). Jelikož IRES obsahuje i tento

útvar a kobalaminy se hojně vyskytují v játrech, byl testován účinek vitaminu B12 na IRES (Lott *et al.* 2001). Bylo zjištěno, že v přítomnosti vitaminu B12 dochází k snížení míry translace závislé na HCV IRES až o 60 %.

Dále Lott *et al.* zkoumali selektivitu inhibičního účinku kyanokobalaminu na translaci v experimentu *in vitro* (Lott *et al.* 2001). Translace závislá na čepičce byla ovlivněna až výrazným nadbytkem vitaminu B12, pravděpodobně z důvodu nespecifické inhibice. Inhibiční účinek vitaminu B12 nebyl pozorován ani u konstruktů obsahující EMCV IRES či CSFV IRES, což poukazuje na vysokou specifitu vazby vitaminu B12 právě na HCV IRES.

Mechanismus, jímž vitamin B12 inhibuje translaci z HCV IRES, nebyl doposud detailně prozkoumán. Možnost vyvázání jednoho nebo více nezbytných translačních faktorů nelze vyloučit, ale je velmi nepravděpodobná, neboť translace z HCV IRES je poměrně nenáročná na translační faktory a žádný faktor využívaný pouze IRES HCV nebyl identifikován. Usuzuje se tedy, že jde o přímou interakci mezi vitaminem B12 a RNA IRES sekvence nebo o stabilizaci komplexu IRES sekvence a ribozómu (Li *et al.* 2004). Ze strany IRES sekvence se na citlivosti k vitaminu B12 podílí doména IV, jak zjistil Li *et al.*, 2004. Ve svém experimentu přenesli doménu IV z HCV IRES (inhibovatelného vitaminem B12) do odpovídající pozice v IRES CSFV (neinhibovatelného vitaminem B12). Výsledkem bylo funkční chimerické IRES, které bylo možno inhibovat vitaminem B12, opět s poklesem míry IRES-závislé translace o 60%.

Fáze translace, během níž vitamin B12 působí jako IRES inhibitor, byla určena pomocí metody toeprint a centrifugací v sacharózovém gradientu (Takyar, Gowans a Lott 2002). Metoda toeprint stanovuje pozici translatujících ribozómů na testované RNA. K tomu využívá primerů hybridizujících níže od IRES sekvence, které jsou prodlužovány reverzní transkriptázou do té doby, než se setká s nasednutým ribozomálním komplexem. Několikanásobně větší ribozóm zabraňuje další syntéze nového vlákna cDNA. Při zvýšeném výskytu ribozómu v určité poloze na templátu dochází ve směsi k akumulaci nově syntetizovaných vláken určité délky. Zastoupení vláken různých délek odpovídá intenzitě jim příslušného signálu na separačním gelu. Zvýšení intenzity signálu, odpovídajícího poloze ribozómu s iniciačním kodónem v P místě, dokazuje, že k inhibici translace pomocí vitaminu B12 dochází již ve fázi iniciace. Následnou centrifugací v sacharózovém gradientu bylo zjištěno, že takto inhibované ribozomální komplexy jsou zastoupeny převážně ve formě 80 S (Takyar, Gowans a Lott 2002). Za přítomnosti vitaminu B12 tedy dojde k normálnímu, kompletnímu složení ribozómu, který je však zadržen na počátku translatované oblasti.

Možným vysvětlením takto specifické vazby a účinku vitaminu B12 pouze na HCV IRES je využití této látky virem jako regulátoru vlastní translace a replikace (Lott *et al.* 2001). Polymeráza postupující od 3´ k 5´ konci virového templátu nemůže soupeřit s ribozómem translatujícím opačným směrem. Zastavení ribozómu během iniciace translace by tak poskytlo čas k vyčištění templátu, a tím jej zpřístupnilo pro replikaci. Tuto hypotézu také potvrzuje fakt, že existuje vztah mezi virovou náloží a koncentrací kobalaminu v krevním séru. Závislost logaritmu virové nálože na koncentraci sérového kobalaminu má sigmoidální tvar s ostrým přechodem mezi hodnotami 150 pM a 250 pM. V tomto úseku dochází k prudkému nárůstu o dvě jednotky tzn. stonásobné zvýšení virové nálože (Lott *et al.* 2001).

Nedávná studie se zabývala dalším vztahem mezi vitaminem B12 a HCV. Prokázala, že pacienti s vyšší hladinou kobalaminu v krvi lépe odpovídají na současně probíhající interferon-ribavirinovou léčbu (Rosenberg a Hagen 2010). Z první skupiny jedinců, jejichž koncentrace sérového kobalaminu byla před zahájením léčby vyšší než 360 pM, došlo u 96 % ke snížení množství viru v organismu pod detekovatelnou hranici po ukončení léčby (ETR). Z jedinců s koncentrací kobalaminu nižší než 360 pM dosáhlo ETR jen 68 %. Přes takto odlišný výsledek na úrovni ETR, rozdíl mezi oběmi skupinami se po šesti měsících od ukončení léčby (SVR) podstatně zmenšil. Přítomnost viru zůstala nezjistitelná u 65 % pacientů první skupiny, v druhé skupině dosáhlo tohoto stavu 52 % pacientů.

Ze všech těchto poznatků je očividné, že existuje jistý vztah mezi B12 a HCV. Určení části vitaminu B12, která je zodpovědná za inhibiční účinek na HCV IRES, a přesného mechanismu inhibice by se dalo využít při konstrukci antivirového agens s vysokou efektivitou a zároveň specificitou na HCV (Lott *et al.* 2001).

8.2 Phenazinové deriváty

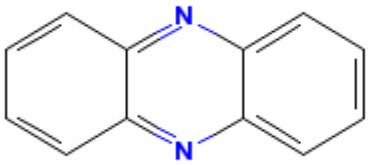
Měřením úrovně translace reportérového genu *in vitro* byla prověřována knihovna 132 000 sloučenin na inhibiční účinek na translaci závislou na HCV IRES (Wang et al. 2000). Látky, které inhibiční účinek prokázaly, byly dále testovány na cytotoxicitu. Jako výsledek zůstalo několik tříd látek aktivních v potlačení translace závislé na HCV IRES při současné nízké úrovni toxicity. Deriváty phenazinu byly vybrány pro další testování jako HCV IRES inhibitory.

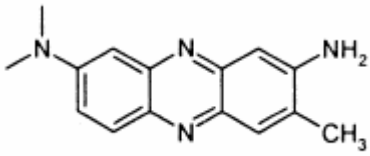
Phenazin (dibenzopyrazin) je planární molekula podobající se anthracenu, avšak místo uhlíků 9 a 10 se v jeho struktuře nacházejí atomy dusíku (viz Obr. 5A). Jeho derivát, neutrální červeň (viz Obr 5B), se ukázal jako velmi účinný inhibitor HCV IRES, jehož inhibiční

koncentrace IC_{50} byla 0,02 μg/ml (IC_{50} je veličina vyjadřující koncentraci látky, při níž je dosaženo poloviny maximálního inhibičního účinku) (Wang et al. 2000). Neutrální červeň byla v experimentech podrobena strukturním modifikacím, aby byl odstraněn její barvící účinek. Vzniklé analogy byly opět testovány jako inhibitory HCV IRES.

Analogy s tzv. „otevřeným“ centrálním kruhem, tj. se záměnou centrálního cyklu za NH či CO linker, vykazovaly řádově nižší aktivitu při inhibici translace závislé na HCV IRES. Pokles v aktivitě pravděpodobně zapříčinilo zvětšení úhlu mezi postranními arylovými skupinami způsobené uvedenou záměnou. Centrální kruh ve struktuře neutrální červeně tedy hraje zásadní roli v inhibici HCV IRES. Záměna funkčních skupin vázaných na phenazinové jádro ve většině případů vedla k výraznému poklesu aktivity nebo k nárůstu toxicity látky, stejně jako modifikace centrálních atomů dusíku (Wang et al. 2000).

Jeden z derivátů phenazinu, látka I70, byl testován jako antivirové agens zaměřené proti HCV *in vivo* (Ilan *et al*. 2002). Do imunosuprimované myši, byl transplantován štěp lidských jater, infikovaný virem hepatitidy C *ex vivo*. Takto bylo úspěšně infikováno až 95 % zvířat. Ve dnech následujících po transplantaci byla u myši měřena virová nálož. Zpočátku došlo k prudkému poklesu virové nálože, což odpovídá vyčištění séra od virové RNA, která byla do zvířete přenesena spolu s transplantátem. Během pátého dne ovšem začala virová nálož stoupat a přibližně 18. den po transplantaci dosáhla maxima. Poté virová nálož začala opět klesat, až se kolem 35. dne dostala pod detekovatelnou hranici. Na základě toho, že ve štěpu byla přítomna i (-)vlákna HCV usoudili autoři, že byl nárůst virové nálože způsoben replikací viru v infikovaném štěpu (Ilan *et al*. 2002). Výsledkem léčby 1 mg I70 podávaného intraperitoneálně po 4 dny, tedy 0,25 mg/den, byl pokles virové nálože v HCV-pozitivních zvířatech z $3{,}6 \times 10^4$ na $5{,}7 \times 10^3$ HCV RNA kopií/ml séra. Zároveň došlo léčbou ke snížení procenta HCV-pozitivních zvířat z 95 % na 71 %, měřeno den po ukončení léčby. Ačkoli během pěti dnů po ukončení léčby obě hodnoty opět značně stouply, nedosáhly hodnot pro neléčenou kontrolní skupinu. Redukční účinek látky I70 přitom pravděpodobně nebyl způsoben poškozením štěpu, neboť bylo použito množství výrazně nižší než maximální tolerovatelná dávka.

A. 

B. 

Obr. 5: A: Struktura phenazinu. Převzato z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov SID 85088569

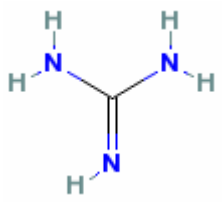
B: Struktura neutrální červeně. Převzato z Wang *et al.* 2000

8.3 Biaryl guanidiny

Biaryl guanidiny byly identifikovány jako inhibitory translace závislé na HCV IRES *in vitro* (Jefferson *et al.* 2004). Míra inhibice translace závislé na HCV IRES byla asi 2,5krát větší než inhibice translace závislé na čepičce. Jako základní struktura pro další studii byl vybrán guanidin, v jehož obou NH_2 skupinách byl nahrazen vždy jeden vodíkový atom (druhý byl nezbytný pro zachování inhibiční aktivity) - v jedné NH_2 skupině 2-fenyletylovou skupinou, v druhé NH_2 skupině pyrimidinovým kruhem spojeným s guanidinem přes C^2 pyrimidinu.

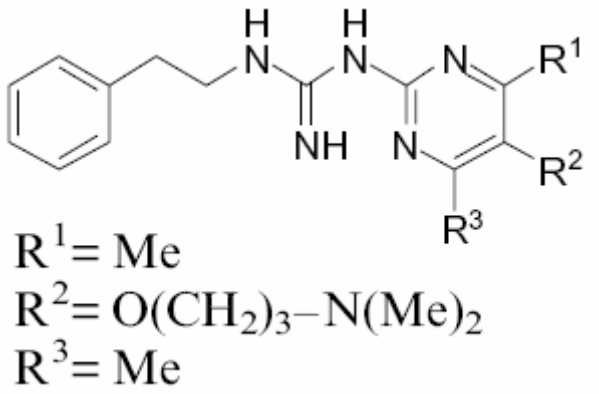
Následná studie zabývající se vlivem modifikací vybrané základní struktury na inhibiční účinek látek prokázala nezbytnost přítomnosti guanidinu (viz Obr. 6) jako centrální složky struktury, neboť její nahrazení zcela odstranilo inhibiční účinek látky. Také většina dalších modifikací – substitucí, adicí, eliminací – vedla buď k poklesu inhibičního účinku na HCV IRES-závislou translaci, nebo ke snížení selektivity inhibice (Jefferson *et al.* 2004).

Jako nejúčinnější inhibitor se ukázala látka, v jejíž struktuře byly na pyrimidinový kruh navázány dva methylové zbytky a skupina $-O(CH_2)_3N(CH_3)_2$ (viz Obr. 7). Pro tuto látku byla zjištěna hodnota IC_{50} 2,1 μM. Translace závislá na HCV IRES byla inhibována dvakrát účinněji než translace závislá na čepičce (Jefferson *et al.* 2004).



Obr. 6: Struktura guanidinu

Převzato z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov SID 46507543



Obr. 7: Struktura biaryl guanidinu.

Převzato z Jefferson *et al.* 2004

8.4 Peptidové aptamery

Další skupinou potencionálních ihibitorů aktivity HCV IRES jsou peptidové aptamery. Peptidy či proteiny jsou schopny se vázat na RNA. Tato vazba však není vždy selektivní. Může být způsobena pouze elektrostatickými silami vznikajícími mezi kladně nabitými aminokyselinami a záporně nabitou cukr-fosfátovou kostrou molekuly RNA. Taková interakce je samozřejmě v hledání specifického HCV IRES inhibitoru nežádoucí. Jelikož je HCV IRES vysoce strukturované, bylo by záhodno využít právě této vlastnosti jako cíle budoucích terapeutik.

Aby nedocházelo k nespecifické vazbě mezi zkoumanou látkou a RNA IRES sekvence, byla knihovna cyklických peptidů (čítající enormní množství – 10 bilionů různých peptidů) podrobena několika selekčním krokům (Litovchick a Szostak 2008). Během nich se zkoumal poměr účinnosti vazby peptidu na HCV IRES a konkurenční RNA. Postupně došlo k vytřídění peptidu stokrát účinněji se vážícího na HCV IRES.

Dále byla zkoumána schopnost toho peptidu inhibovat translaci závislou na HCV IRES *in vitro*. IC_{50} byla naměřena 95 nM pro lineární formu a 64 nM pro formu cyklickou (při koncentraci mRNA 50 nM). Translace závislá na čepičce přitom nebyla přítomností peptidu inhibována až do koncentrace 5 μM, což dokazuje, že šlo o vysoce specifickou inhibici translace závislé na HCV IRES (Litovchick a Szostak 2008).

Sekvence vybraného peptidu byla MKCSRGIRCAGVLCGSVGHHHHHHHRL, z čehož poly-H úsek představuje histidinový tag sloužící k jeho purifikaci. Cyklické formy bylo dosaženo reakcí peptidu s m-dibromoxylenem, jehož prostřednictvím došlo k dvojímu propojení peptidu přes dva benzenové kruhy – Cys1 s Cys2 a Cys3 s His1. Při zkoumání minimální aktivní struktury peptidu se zjistilo, že N-koncový úsek KCSRGIRC je schopen se v lineární i cyklické formě vázat na HCV IRES i inhibovat translaci závislou na HCV IRES *in vitro*, s IC_{50} 125 nM pro lineární formu a 76 nM pro formu cyklickou. Tento fragment neměl inhibiční účinek na translaci přes čepičku až do koncentrace 2 μM. Pokles inhibiční aktivity vůči původnímu 27meru nejspíš odrážel podíl histidinového tagu na vazbě k RNA. Celkově lepší vazebná schopnost a specificita cyklických forem pravděpodobně odrážela entropickou výhodu jejich přirozené struktury (Litovchick a Szostak 2008).

Velice slibné výsledky Litovchicka a Szostaka však byly záhy odvolány, neboť se uvedenou inhibici IRES-závislé translace pomocí výše zmíněných látek nepodařilo reprodukovat ani K. Berrymu z laboratoře J. A. Doudnové ani autorům samotným (Litovchick

a Szostak 2009). Tento neúspěch však neznamená, že inhibice translace závislé na HCV IRES pomocí peptidových aptamerů není možná.

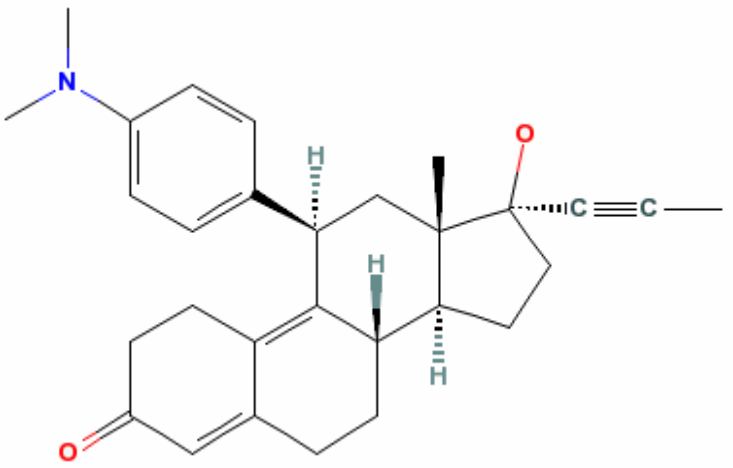
8.5 Mifepriston

Mifepriston (také VGX-410, RU-486, nebo 11β-[4-(dimethylamino)fenyl]-17β-hydroxy-17β-(prop-1-ynyl)estra-4,9-dien-3-on, viz Obr. 8) je látka steroidní povahy působící jako antagonista glukokortikoidového receptoru. Patří mezi hormony indukující menstruaci a má abortivní účinky. Výhodou je, že mifepriston byl již dříve v klinické praxi používán.

V nedávné studii byl také prokázán antivirový účinek mifepristonu *in vitro* (Kim 2007). Ovlivněním funkce či struktury proteinu mov34, který je členem eIF3 komplexu, brání interakci mezi eIF3 a HCV IRES, a tím vzniku 43S komplexu eIF3-IRES-40S, který je nezbytný pro zahájení translace. Mifepriston tedy neinteraguje přímo s HCV IRES, přesto je řazen mezi inhibitory funkce HCV IRES (Kim 2007).

Přítomnost 10 μM mifepristonu v médiu účinně snížila množství intracelulárních HCV RNA na asi 310 kopií, což byl výrazný pokles vůči „neléčené“ kontrole, kde se vyskytovalo asi 850 kopií na buňku (Kim 2007). Ukázalo se, že tato látka inhibuje translaci závislou na HCV IRES při koncetraci 1-2 μM, a to asi z 50 % (Litovchick a Szostak 2008). Translace závislá na čepičce není při těchto koncentracích mifepristonu ovlivněna.

Díky předchozí zkušenosti s mifepristonem z klinické praxe se rychle dostal do druhé fáze klinických testů jako HCV IRES inhibitor. Bohužel v této fázi i skončil z důvodu nízké efektivity. Studie byla proto zrušena (Franciscus 2010).



Obr. 8: Struktura mifepristonu.
Převzato z pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
SID 56313765

9 Závěr

Inhibice translace závislé na HCV IRES bez negativních účinků na buňku je velmi lákavým cílem vývoje nových léčiv proti žloutence typu C. Znamenala by zastavení propagace viru ve velmi časné fázi životního cyklu HCV, což je samozřejmě žádoucí.

Podle modelu regulace exprese buněčných mRNA byly identifikovány miRNA interagující s HCV IRES. Specificita jejich účinku se však neomezuje pouze na HCV IRES, nýbrž se podílí také na regulaci exprese určitých buněčných mRNA. Ovlivnění jejich množství popř. funkce se tak projeví na expresním profilu celé buňky. Možnost využití miRNA je tedy velice diskutabilní, jelikož by mohlo mít fatální důsledky pro organismus nakaženého.

V dosavadním výzkumu nejdále pokročil vývoj látek cílených na HCV IRES pomocí sekvenční komplementarity syntetických RNA. Oba nejslibnější přípravky, antisense oligonukleotid ISIS 14803 i Hepatozyme, však neobstály v klinických testech z důvodů nízké účinnosti. Prosté sledování sekvencí u viru s tak vysokou mutační rychlostí, dle mého názoru, zřejmě nepovede k významným objevům, jež by byly dlouhodobě aplikovatelné.

Experimentálně byly identifikovány nízkomolekulární látky interagující selektivně s IRES strukturou. Tento přístup se mi jeví jako slibnější, neboť struktura IRES musí být vysoce konzervovaná, aby mohla zajistit účinnou vazbu translačního aparátu buňky. Jedinečnosti HCV IRES by se tak dalo využít v boji proti hepatitidě C. Budoucí výzkum by měl tedy být zaměřen spíše na odhalení látek ovlivňujících strukturu a dynamiku IRES, a tím i její funkčnost.

Molekulárně biologické přístupy odhalují nové možnosti cílení specifické léčby žloutenky typu C. Snad se v budoucnu podaří i díky HCV IRES inhibitorům dostat toto závažné onemocnění pod kontrolu.

10 Seznam literárních zdrojů

Boehringer D., R. Thermann, A. Ostareck-Lederer, J. D. Lewis, and H. Stark; 2005; Structure of the Hepatitis C Virus IRES Bound to the Human 80S Ribosome: Remodeling of the HCV IRES; *Structure* 13: 1695-1706

Dash S., S. Haque, V. Joshi, R. Prabhu, S. Hazari, C. Fermin, R. Garry; 2005; HCV-Hepatocellular Carcinoma: New Findings and Hope for Effective Treatment; *MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE* 68: 130-148.

Fischman S. L. & A. D. Branch; 2009; The quasispecies nature and biological implication of the hepatitis C virus; *Infectio, Genetics and Evolution* 9: 1158-1167

Franciscus A.; 2010; Hepatitis C Treatments in Current Clinical Development; http://www.hcvadvocate.org

Gallego J. & G. Varani; 2002; The hepatitis C virus internal ribosome-entry site: a new target for antiviral research; *Biochemical Society Transactions* 30: 140-145.

Honda M, L. H. Ping, R. C. A. Rijnbrand, E. Amphlett, B. Clarke, D. Rowlands, S. M. Lemon; 1996; Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA; *Virology* 222: 31-42.

Honda M., M. R. Beard, L. H. Ping, and S. M. Lemon; 1999; A Phylogenetically Conserved Stem-Loop Structure at the 5´ Border of the Internal Ribosome Entry Site of Hepatitis C Virus Is Required for Cap-Independent Viral Translation; *Journal of Virology* 73: 1165-1174.

Hügle T. & A. Cerny; 2003; Current therapy and new molecular approaches to antiviral treatment and prevention of hepatitis C; *REVIEWS IN MEDICAL VIROLOGY* 13: 361-371.

Ilan E., Arazi J., Nussbaum O., Zauberman A., Eren R., Lubin I., Neville L., Ben-Moshe O., Kischitzky A., Litchi A., Margalit I., Gopher J., Mounir S., Cai W., Daudi N., Eid A., Jurim O., Czerniak A., Galun E., Dagan S.; 2002; The hepatitis C virus (HCV)-Trimera mouse: a model for evaluation of agents against HCV; *J. Infect. Dis.* 185: 153-161.

Jefferson E. A., P. P. Seth, D. E. Robinson, D. K. Winter, A. Miyaji, S. A. Osgood, E. E. Swayze, and L. M. Risen; 2004; Biaryl guanidine inhibitors of in vitro HCV-IRES activity; *Bioorg Med Chem Lett* 14: 5139–5143.

Jopling C. L.; 2008; Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122; *Biochemical Society Transactions* 36: 1220-1223.

Jopling C.L., M. Yi, A. M. Lancaster, S. M. Lemon, and P. Sarnow; 2005; Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA; *Science* 309: 1577-1581

Jopling C.L., S. Schütz, and P. Sarnow; 2008; Position-Dependent Function for a Tandem MicroRNA miR-122-Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome; *Cell Host & Microbe* 4: 77-85.

Joyce M. A. & D. L. J. Tyrrell; 2010; The cell biology of hepatitis C virus; *Microbes and Infection* (2010); doi:10.1016/j.micinf.2009.12.012

Jubin R.; 2003; Targeting hepatitis C virus translation: Stopping HCV where it starts; *Current Opinion in Investigational Drugs* 4(2): 162-167

Kieft J. S., K. Zhou, R. Jubin, and J. A. Doudna; 2001; Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA; *RNA* 7: 194-206.

Kim J. J.; 2007; Antiviral composition and methods of using the same; US patent application 20070259844.

Kwon A. D., S. Cowherd, and P. Mueller; 2006; Beyond interferon and ribavirin: Antiviral therapies for hepatitis C virus; *Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies* 3: 211-220

Lagos-Quintana M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl; 2002; Identification of Tissue-Specific MicroRNAs from Mouse; *Current Biology* (12): 735-739.

Lecellier C. H., P. Dunoyer, K. Arar, J. Lehmann-Che, S. Eyquem, C. Himber, A. Saib, O. Voinnet; 2005; A cellular MicroRNA mediates antiviral defense in human cells; *Science* 308: 557-560.

Li D., W. B. Lott, J. Martyn, G. Haqshenas, and E. J. Gowans; 2004; Differential Effects on the Hepatitis C Virus (HCV) Internal Ribosome Entry Site by Vitamin B12 and the HCV Core Protein; *Journal of Virology* 78(21): 12075–12081.

Litovchick A. & J. W. Szostak; 2008; Selection of cyclic peptide aptamers to HCV IRES RNA using mRNA display; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(40): 15293-8.

Litovchick A. & J. W. Szostak; 2009; Selection of cyclic peptide aptamers to HCV IRES RNA using mRNA display (Retraction of 105, pg 15293, 2008); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106(17): 7263-7263.

Lorsch J. R. & J. W. Szostak; 1994; In Vitro Selection of RNA Aptamers Specific for Cyanocobalamin; *Biochemistry* 33**:** 973–982.

Lott W. B., S. S. Takyar, J. Tuppen, D. H. Crawford, M. Harrison, T. P. Sloots and E. J. Gowans; 2001; Vitamin B12 and hepatitis C: Molecular biology and human pathology; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 4916–4921.

Lukavsky P. J., A. O. Geoff, A. M. Lancaster, P. Sarnow, and J. D. Puglisi; 2000; Structures of two RNA domains essential for hepatitis C virus internal ribosome entry site function; *Nature Structural Biology* 7: 1105-1110.

Lukavsky P. J.; 2009; Structure and function of HCV IRES domains; *Virus Research* 139: 166-171.

McHutchinson J. G., K. Patel, P. Pockros, L. Nyberg, S. Pianko, R. Z. Yu, F. A. Dorr, T. J. Kwoh; 2006; A phase I trial of an antisense inhibitor of hepatitis C virus (ISIS 14803), administered to chronic hepatitis C patients; *Journal of Hepatology* 44: 88-96.

Murakami Y., H. H. Ally, A. Tajima, I. Inoue, K. Shimotohno; 2009; Regulation of the hepatitis C virus genome replication by miR-199a*; *Journal of Hepatology* 50: 453-460.

Pestova T. V., I. N. Shatsky, S. P. Fletcher, R. J. Jackson, and C. U. T. Hellen; 1998; A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs; *Genes & Development* 12: 67-83.

Pietschmann T.; 2009; Regulation of hepatitis C virus by microRNAs; *Journal of Hepatology* 50: 441-444

Pillai R. S.; 2005; MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?; *RNA* 11: 1753-1761.

Reynolds J. E., A. Kaminski, H. J. Kettinen, K. Grace, B. E. Clarke, A. R. Carroll, D. J. Rowlands, R. J. Jackson; 1995; Unique features of internal initiation od hepatitis C virus RNA translation; *The EMBO Journal* 14: 6010-6020.

Rijnbrand R., P. Bredenbeek, T. van der Straaten, L. Whetter, G. Inchauspé, S. Lemon, W. Spaan; 1995; Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation; *FEBS Letters* 365: 115-119.

Rosenberg P., and K. Hagen; 2010; Serum B12 levels predict response to treatment with interferon and ribavirin in patients with chronic HCV infection; *Journal of Viral Hepatitis*; doi:10.1111/j.1365-2893.2010.01288.x

Scherer L. J. & J. J. Rossi; 2003; Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA; *Nature Biotechnology* 21: 1457-1465.

Soler M., J. G. McHutchinson, T. J. Kwoh, F. A. Dorr, J. M. Pawlotsky; 2003; HCV resistance to ISIS 14803, an antisense oligonucleotide inhibitor of HCV. Effect of target region sequence on antiviral efficacy; *Journal of Hepatology* 38: 18-18.

Takyar S. S., E. J. Gowans, and W. B. Lott; 2002; Vitamin B12 Stalls the 80 S Ribosomal Complex on the Hepatitis C Internal Ribosome Entry Site; J. Mol. Biol. 319: 1–8.

Thimme J. & M. Roggendorf; 2007; Sequence diversity of hepatitis C virus: Implications for immune control and therapy; *WorldJournal of Gastroenterology* 13: 4808-4817.

Tsukiyama-Kohara K., N. Iizuka, M. Kohara, and A. Nomoto; 1992; Internal Ribosome Entry Site within Hepatitis C Virus RNA; *Journal of Virology* 66, 1476-1483.

Wang C. Y., Le S. Y., Ali N., Siddiqui A.; 1995; An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region; *RNA* 1: 526-537.

Wang W., P. Preville, N. Morin, S. Mounir, W. Cai, M.A. Siddiqui; 2000; Hepatitis C viral IRES inhibition by phenazine and phenazine-like molecules; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 10: 1151–4.

Zhang H., R. Hanecak, V. Brown-Driver, R. Azad, B. Conklin, M. C. Fox, K.P. Anderson; 1999; Antisense oligonucleotide inhibition of hepatitis C virus (HCV) gene expression in livers of mice infected with an HCV-vaccinia virus recombinant; *ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY* 43(2): 347-353.