

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERSITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA GENETIKY A MIKROBIOLOGIE

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Hepatitida typu C a možnosti její léčby

Jana Puskarčíková

Školitel: RNDr Martin Pospíšek, PhD.

Školní rok: 2007/2008

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Martinu Pospíškovi, PhD. za cenné rady, trpělivost a obětavost při odborném vedení mé bakalářské práce.

Obsah

1 Abstrakt	4
2 Úvod	6
3 Epidemiologie	6
4 Možnosti nákazy	8
4.1. Krevní deriváty	8
4.2. Užívání drog intravenózně	8
4.3. Iátrogenní přenos	8
4.4. Profesionální riziko	8
4.5. Sexuální aktivita	9
4.6. Další způsoby přenosu HCV	9
4.7. Hemofilie jako virový faktor nákazy	9
5 Genetická charakterizace HCV	10
5.1 Životní cyklus	11
5.2 Nestrukturní proteiny	12
5.3 Strukturní proteiny	13
5.4 Genotypy a subtypy	14
5.5 Kvazidruhy	14
6 Klinický obraz HCV	15
7 Diagnostika HCV	15
8 Léčba	16
8.1 Protivirová léčba	17
8.2 Léčba interferony	17
8.2.1 Pegylovaný interferon alfa (PEG-IFN)	17
8.2.2 Konvenční interferon alfa (IFN)	18
8.2.3 Nežádoucí účinky IFN	18
8.3 Ribavirin	18
8.3.1 Nežádoucí účinky ribavirinu	19
9 Ekonomické aspekty léčby	19
10 Antivirová terapie	22
10.1 Inhibitory	23
10.1.1 BILN-2061	24
10.1.2 Telaprevir	24
10.1.3 RdRp inhibitory	25
11 Závěr	26
12 Seznam použité literatury	31

1 Abstrakt

Virem hepatitidy C (HCV) je v současné době infikováno více než 170 milionů lidí. Aktuální schválená antivirová terapie (kombinace pegylovaného interferonu alfa a ribavirinu) je efektivní přibližně u 50% nakažených pacientů. Léčba pegylovaným interferonem a ribavirinem je finančně náročná, zdlouhavá a má mnoho vedlejších účinků. Není vhodná pro každého nakaženého pacienta. Proto je zde jasná a naléhavá potřeba hledat alternativní nebo odlišné mechanismy působení antivirových léčiv. Tak aby léčba byla vhodná pro větší procento postižených osob. Podstatné pro pochopení dalších mechanismů replikace viru žloutenky typu C a tedy nalezení nových antivirových cílů, bylo objevení vhodné buněčné kultury. V popředí zájmu stojí životní cyklus HCV, je to proto, že každý jeho krok, ať už jde o vstup viru do buňky, virovou translaci nebo replikaci, lze inhibovat. Tímto směrem se dnes převážně ubírá vývoj nových antivirových léčiv. Je tedy nutné shromažďovat co nejvíce poznatků o charakteristice genomu, životním cyklu, rozšíření a způsobech přenosu viru hepatitidy C. Pomoci nám také může, při boji s touto chorobou, včasná diagnostika, zdokonalení a především striktní dodržování doporučených léčebných předpisů.

Klíčová slova: Virus hepatitidy C; Léčba; Interferon; Ribavirin;

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) infects approximately 170 million individuals worldwide. Current approved antiviral therapies - the combination of pegylated interferon alfa and ribavirin - are effective in eradicating the virus in approximately 50% of infected patients. However, pegylated interferon and ribavirin is costly, prolonged, associated with significant adverse effects, and not deemed suitable for many HCV-infected patients. As such, there is a clear and pressing need for the development of additional agents that act through alternate or different mechanisms, in the hope that such regimes could lead to enhanced response rates more broadly applicable to patients with hepatitis C infection. Recent basic science enhancements in HCV cell culture systems and replication assays have led to a broadening of our understanding of many of the mechanisms of HCV replication and, therefore to potential novel antiviral targets. Data that have accumulated on HCV proteins begin to provide a framework for understanding the molecular mechanisms involved in the major step of HCV life cycle – viral entry, viral RNA translation or HCV replication. Because each of these steps could be inhibited. Very important is almost a study on epidemiology of HCV, transmission, improvement of recent treatment and mainly strict doses of drugs too.

Key words: Hepatitis C virus; Treatment; Interferon; Ribavirin;

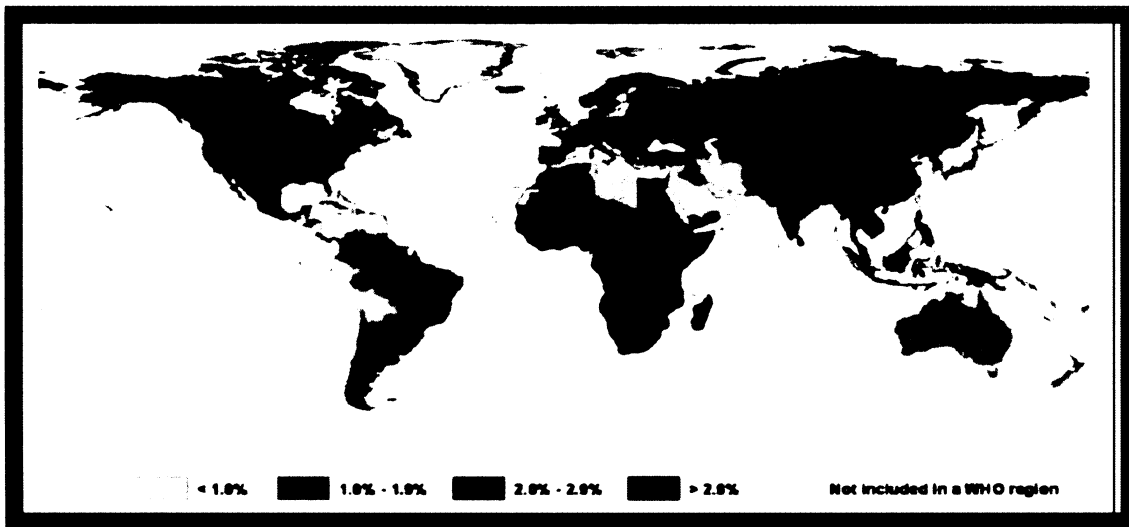
2 ÚVOD

Průběh virové hepatitidy typu C (HCV) je převážně bezpříznakový (asymptomatický). Zdá se být velmi pravděpodobné, že většina lidí chronicky infikovaných virem hepatitidy C není v naší populaci dosud objevena. Ve všech rozvinutých státech světa se jaterní cirhóza vzniklá v důsledku chronické hepatitidy C stává hlavní indikací k transplantacím jater. Podobně i hepatocelulární karcinom (HCC) vzniká převážně u osob chronicky infikovaných HCV. Z toho vyplývá i mimořádná „zákeřnost“ chronické hepatitidy C, která „není bolestivá“, léta svého hostitele nijak neomezuje a většinou se ani klinicky nijak neprojevuje. Lidé se jí tolik nebojí, protože mnohdy o ní nejsou tak podrobně informováni jako o AIDS, rakovině či infarktu. Přesto zabijí významnou část infikovaných lidí stejně spolehlivě jako ty nejobávanější choroby. Nesmíme zapomenout ani na finanční hledisko – prevence (nalezení vakcíny) je vždy levnější než drahá léčba nebo dokonce náročné chirurgické výkony. Proto stojí za to, věnovat úsilí zkoumání této choroby ve snaze objevit nová léčiva a spolehlivé vakcíny proti virové hepatitidě typu C.

3 EPIDEMIOLOGIE

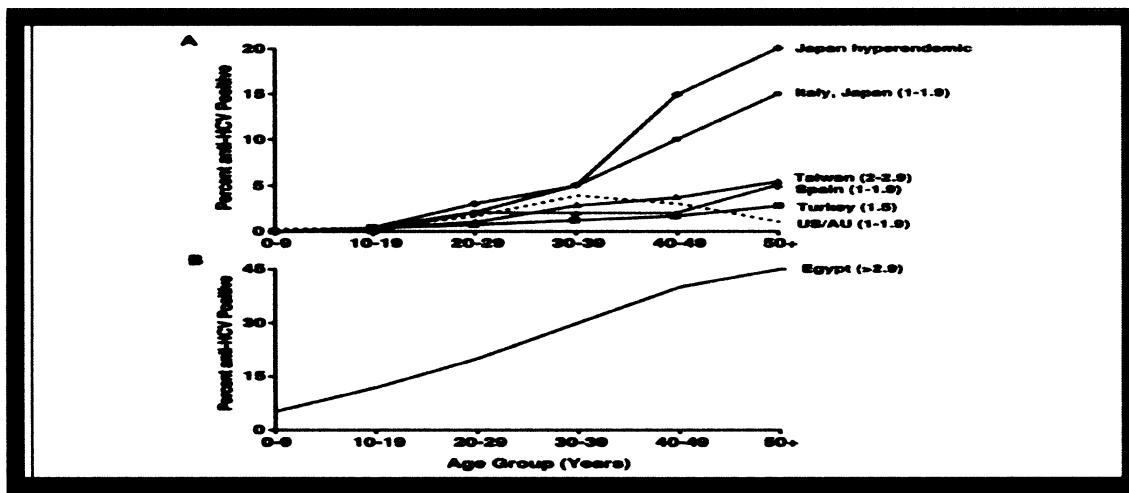
V současnosti je virem hepatitidy C infikováno okolo 170 - 200 milionů lidí, zhruba tedy asi 3% světové populace. V důsledku chronické infekce virem hepatitidy C každoročně umírá zhruba 250 000 to 350 000 lidí (Chevalie *et al.*, 2007). Z počtu nakažených dojde do stádia jaterní cirhózy asi 27%, z nichž onemocní 25% hepatocelulárním karcinomem (Perz *et al.*, 2006).

Prevalence je méně než 1% v severní Evropě, více než 2.9% v severní Africe. Nejvyšší prevalence je v UK a Skandinávii - 0,01 - 0.1%. Nejvyšší prevalence je v Egyptě - okolo 20% (Alter 2007), (viz. Obr. 1). Zde je to způsobeno velmi specifickým způsobem přenosu – iatrogenní přenos při parenterální antischistosomální terapii (PAT), ta byla v Egyptě prováděna v letech 1961-1986. Technika, kdy bez výměny instrumentária jsou parenterálně léčený desítky osob, je v dnešní době jen těžko představitelná (Frank *et al.*, 2000), (Memon *et al.*, 2002, přehledový článek).



Obr. 1: Séroprevalence infekce hepatitidy typu C v různých částech světa. Intenzita barvy koreluje s prevalencí infekce. Převzato z: Fields Virology, fifth edition (2007)

Průměrný věk nemocných se liší. V USA, Austrálii a S Evropa je věkový trend nemocných žloutenkou typu C mezi 20-40 lety. Oproti tomu v Japonsku, Číně, Španělsku a Itálii to je 40-60let (Alter 2007), (Viz. Obr. 2).



Obr. 2: Věkově specifická séroprevalence HCV infekce v různých zemích. Převzato z: Fields Virology, fifth edition (2007)

4 Možnosti nákazy

Zjišťování možností nákazy HCV je obtížné, protože akutní fáze infekce je asymptomatická.

4.1 Krevní deriváty:

Do počátku 90. let představovalo podání krevního derivátu největší riziko kontaktu s infekcí HCV. Po zavedení testů na vyšetření anti-HCV protilátek došlo počátkem 90. let k významnému poklesu infekcí HCV touto cestou. V České republice se začalo s testováním v roce 1993. Podle některých autorů se touto cestou nakazilo až 50% z celkového počtu infikovaných (Memon *et al.*, 2002, přehledový článek).

4.2 Užívání drog intravenózně:

Mezi dlouhodobě závislými intravenózními toxikomany je prevalence anti-HCV protilátek až 85%. Virem HCV se nakazí 70% všech toxikomanů během prvních tří měsíců užívání drog, lze to vysvětlit tím, že první kontakty s drogou jsou na společenských akcích, kde dochází ke kolování jehel mezi narkomany. Mezi touto skupinou osob je velká prevalence i duální infekce HCV/HBV a HCV/HIV (Urbánek 2004). Více než 30% všech HIV pozitivních je současně infikováno HCV (Edlin 2002).

4.3 Iátrogenní přenos:

Používání jehel a stříkaček na více použití je už minulostí, ale i to byla významná cesta pro přenos HCV. Virus HCV je poměrně termorezistentní, přežívá i několik hodin při pokojové teplotě. Rizikem pro přenos HCV jsou i nejrůznější chirurgické zákroky nebo endoskopická vyšetření (viz. PAT nesprávně prováděná v Egyptě). Za nejrizikovější jsou považovány gynekologické a porodnické zákroky, při kterých je traumatizována a poškozena kožní nebo slizniční bariéra (Mele *et al.*, 2001).

4.4 Profesionální riziko:

Pravděpodobnost poranění zdravotnického personálu infikovanou jehlou je poměrně nízká, pouze 2-5% (Memon *et al.*, 2002, přehledový článek). Infekce pacienta nakaženým lékařem nebo infekce přes slizniční bariéru - potřísnění oční spojivky je spíše kazuistikou.

V americké literatuře se někdy v této souvislosti hovoří o „pravidlu tří“, které zjednodušeně odhaduje pravděpodobnost přenosu infekce nejtýpčtějších parenterálně přenosných virových infekcí. Po jednorázovém poranění nástrojem kontaminovaným krví infikovaného pacienta je riziko přenosu HBV 30 %, HCV 3 % a HIV 0,3 %. Podle jiných zdrojů je toto nebezpečí u HCV ještě nižší - kolem 1.

4.5 Sexuální aktivita:

Tento způsob nakažení je nejasný a prozatím dostatečně neprokázaný. Musí být totiž vyloučen jiný možný způsob nákazy, osoby musí tedy být v akutní fázi infekce, toto splňuje například studie Molecular evidence of male to female sexual transmission of hepatitis C virus after vaginal and anal intercourse od Halfon *et al.*, 2001 - byl tento způsob infekce prokázán. Často se objevuje tvrzení, že možnost nákazy HCV prostřednictvím sexuálního styku se zvyšuje s více jak šesti sexuálními partnery. S tím nekoreluje například studie od Neumayr *et al.*, 1999 - zde byla prevalence anti-HCV protilátek korelována s věkem a tedy nepřímo s délkou vztahu a počtem sexuálních styků. Většina studií zabývajících se infekcí virem hepatitidy C během sexuálního styku operuje pouze s prevalencí anti-HCV protilátek, bez analýzy genomů hepatitidy C, to znamená, že výsledky nemusí být až tolik průkazné.

4.6 Další možnosti nákazy:

Z dalších možností nákazy především: **vertikální přenos infekce, hemodialýza, rodinný kontakt, tetování** – poslední z uvedených je hodně rozšířen především v Lybii, Tunisu a Alžírě, kde nejohroženější skupinou jsou ženy ve věku nad 50 let. Souvisí to s kulturními tradicemi.

4.7 Hemofilie jako virový faktor nákazy

Hemodialýzou, jako jednou z dalších možností nakažení virem hepatitidy C, byly v České republice do roku 1993 především ohroženy osoby trpící hemofilií. Po zavedení testů krevních derivátů na anti-HCV protilátky došlo počátkem 90. let k významnému poklesu infekcí virem hepatitidy C touto cestou a tedy i u hemofiliků. Léčba pacientů s hemofilií je velmi problematická.

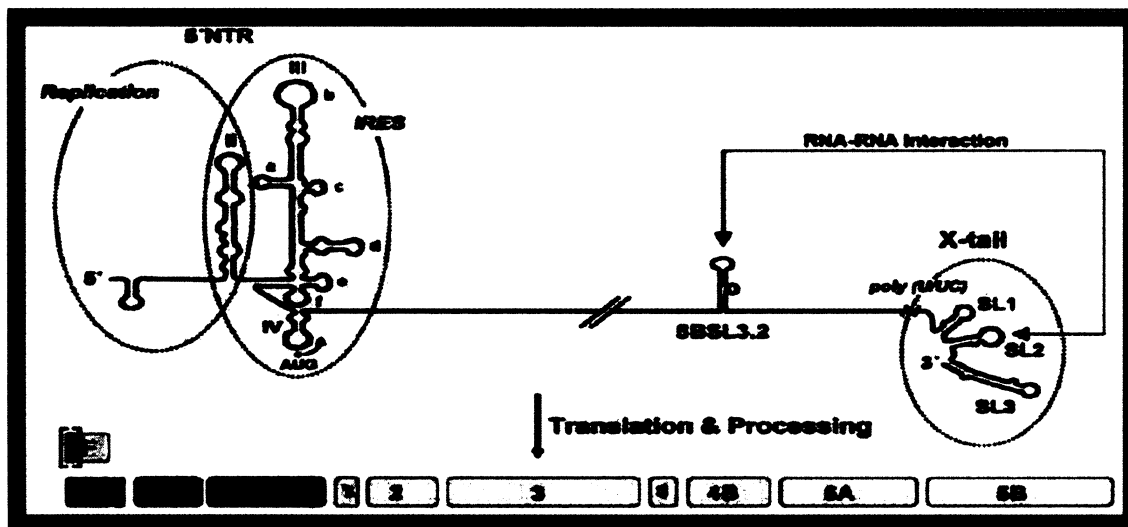
Vzhledem k riziku krvácení se u hemofiliků prakticky neprovádějí jaterní biopsie. Při léčbě hemofiliků je nutné sledovat hladinu inhibitoru faktoru VIII, což je další autoprotlátka, kterou může indukovat léčba interferonem. Vznik vysokých hladin inhibitoru je závažnou komplikací, protože zvyšuje riziko krvácení a vyžaduje finančně náročnou změnu antihemofilické léčby. (Husa *et al.*, 2005).

5 Genetická charakteristika viru hepatitidy C

Virus hepatitidy C (HCV) byl identifikován v roce 1989, jako původce hepatitid do té doby označovaných jako hepatitidy non-A, non-B (Choo *et al.*, 1989). V roce 1990 byla poprvé popsána technika PCR vhodná k detekci HCV v séru a v jaterní tkáni (Weiner *et al.*, 1990).

Virion HCV má velikost 55-65nm, a je řazen do čeledi Flaviviridae, člen rodu Hepacivirus (Simmonds *et al.*, 2005).

Virion HCV obsahuje jednovláknovou RNA pozitivní polarity (Choo *et al.*, 1989), je obsažen v ikosahedrální kapsidě (Penin *et al.*, 2004). Genom viru hepatitidy C sestává zhruba z 9600 nukleotidů v jednom dlouhém otevřeném čtecím rámci (ORF), kódujícím polyprotein o velikosti 3010-3033 aminokyselin. Prekursorový polyprotein je až sekundárně rozstříhán do strukturálních proteinů (kapsidový protein C a dva obalové glykoproteiny E1 a E2) a do nestrukturních proteinů (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B). ORF je ohraničený 5' a 3' nekódujícími oblastmi (NTR) o délce přibližně 340 a 230 nukleotidů. Sekundární a terciární struktura 5' a 3' NTR je vysoce konzervativní a je esenciální pro translaci virového polyproteinu a RNA replikaci. 5' NTR oblast sestává z vysoce konzervativní 341 nukleotidů dlouhé sekvence a obsahuje místo pro vstup ribozomu – IRES (Penin *et al.*, 2004). Je to struktura zodpovědná za nasednutí ribozomu, váže přímo a s vysokou afinitou 40S podjednotku ribozomu, a translaci polyproteinu (Otto *et al.*, 2004). Oblast 3' NTR obsahuje variabilní 40 nukleotidovou sekvenci, variabilní polyUC bohatou oblast a vysoce konzervativní 98 nukleotidů dlouhý region. 3' NTR je důležitý pro iniciaci replikace. Virus je obalen lipidickou dvojvrstvou složenou ze dvou odlišných glykoproteinů. (Penin *et al.*, 2004).

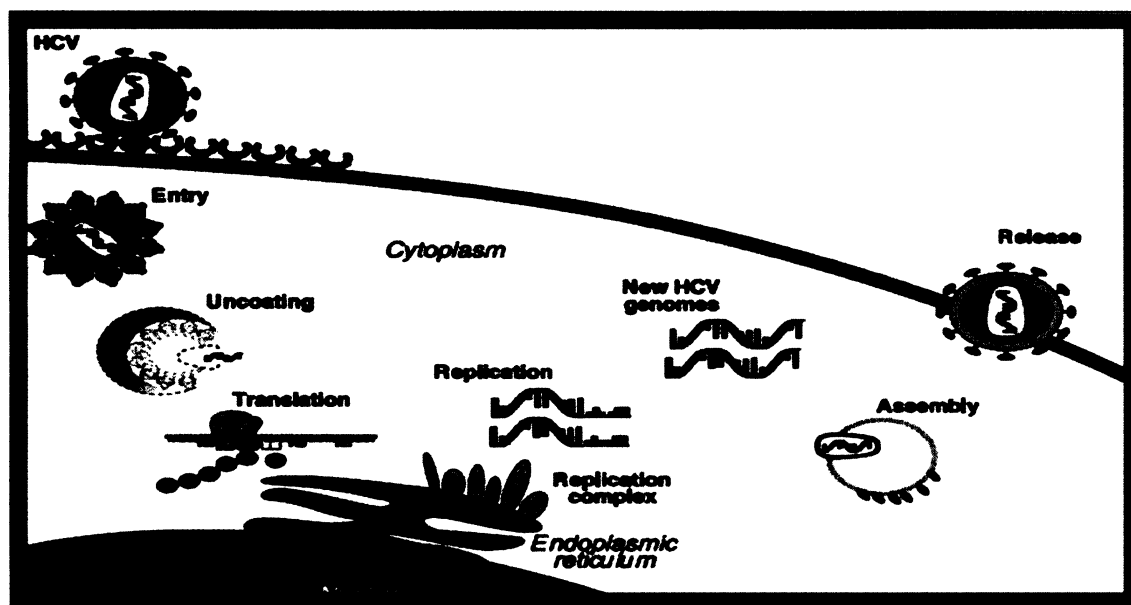


Obr. 3: Organizace virového genomu: Převzato z: APPEL *et al.*, 2006

5.1 Životní cyklus:

Životní cyklus HCV není zatím detailně prostudovaný, protože kultivační systém byl zdokonalen teprve nedávno. Předpokládá se, že je podobný ostatním Flaviviridům.

Životní cyklus HCV začíná vazbou viru na specifický receptor (tetraspanin CD81, scavengerový receptor B I (SR-BI), adhesivní molekuly DC-SIGN a L-SIGN, low-density lipoprotein (LDL), glykosaminoglykany - heparan sulfát, claudin-1, ICAM-3). Nukleokapsida se dostává do cytoplasmy, poté je virus dekapsován a genomická HCV RNA je použita pro okamžitou translaci polyproteinu a replikaci v cytoplasmě. Nestruturní proteiny NS3 a NS5B se skládají v asociaci s buněčnými faktory do formy replikačního komplexu, který je zodpovědný za replikaci RNA. Nachází se v těsné blízkosti perinukleární membrány. Enkapsidace se odehrává v endoplazmatickém retikulu. Nukleokapsidy jsou složeny a maturovány v Golgiho komplexu. Viriony se exocytosou dosávají ven z buňky (Penin *et al.*, 2004).



Obr. 4: Schéma životního cyklu HCV. Převzato z: Racanelli (2003)

5.2 Nestruturní oblasti genomu:

Je kódující část genomu bližší k 3' konci RNA. Produkty této části jsou proteiny označené jako: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B. Tyto proteiny se účastní procesů replikace viru a většinou mají funkci enzymů.

NS2 (21 kDa) je integrální membránový protein (Blight *et al.*, 2000). Přesná funkce NS2 není zatím objasněna, ale bylo prokázáno, že není esenciální pro sestavení replikačního komplexu viru. NS2 je komponentou NS2-3 proteinázy. NS2/NS3 enzym má funkci cysteinové proteinázy a hrají roli ve zrání polyproteinu. NS2 protein má také funkci při skládání virové částice (Pallaoro *et al.*, 2001). Proteinázová aktivita oblasti NS2-3 je zajímavé cíl místo pro potencionální antivirové látky.

NS3 (69 kDa) je multifunkční protein. Jeho N-terminální doména má charakter serinové proteázy a C-terminální doména je RNA helikáza/NTPasa. NS3 proteázová doména má typickou chymotrypsinu podobnou aktivitu (Kim *et al.*, 1996). Proteázová aktivita NS3 domény potřebuje jako kofaktor produkt oblasti NS4A. RNA helikázová/NTPasová aktivita C-terminální domény je nezbytná k rozdělení zdvojené RNA v replikačním procesu.

NS4B (27kDa) je vysoce hydrofóbní nestruturní protein, který se skládá ze 4 transmembránových domén (Lundin *et al.*, 2003). Indukuje změny membránových struktur, které podporují RNA replikaci (Egger *et al.*, 2002).

NS5A je protein o velikosti mezi 56 až 58 kDa, obsahující v N-terminálním konci amfipatickou sekvenci alfa-helixu, kterou se uchycuje v membráně. Jako téměř všechny

ostatní nestrukturní proteiny asociuje s endoplazmatickým retikulem (Brass *et al.*, 2002). NS5A protein je esenciální pro virovou replikaci (Appel *et al.*, 2006). NS5A protein je exprimován ve formě fosforylované nebo hyperfosforylované. Mutace, které jakkoli ovlivňují fosforylaci, významně poškozují replikaci viru hepatitidy C. Výzkum se zde zaměřuje především na inhibitory kináz, tedy na inhibici fosforylace (Neddermann *et al.*, 2004). NS5A protein je také velice zajímavý, protože se uplatňuje v modulaci interferonové odpovědi (Appel 2006).

NS5B (68 kDa) je opět protein asociující s membránou, který je esenciální pro RNA replikaci viru v buněčné kultuře. NS5B je RNA dependentní RNA polymeráza, která je katalytickou komponentou mašinerie HCV replikace. Tato syntéza používá jako templát RNA a právě NS5B umí zahájit syntézu RNA *de novo* (Moradpour *et al.*, 2004). Podstatnou vlastností tohoto enzymu je jeho náchylnost k četným omylům a neschopnost tyto omyly opravovat a to je důvodem vzniku kvazidruhů v infikovaném organismu.

Jako poslední (Shimotohno 1997) byl identifikován protein p7 (7 kDa). Je lokalizován na spoji mezi strukturními a nestrukturními proteiny, a má mimo jiné funkci iontového kanálu (Griffin *et al.*, 2004). Protein p7 není esenciální pro virovou replikaci, ale je podstatný pro infektivitu viru hepatitidy C. Výzkum molekul, které blokují tento kanál, může být též slibný pro objev nových anti-HCV molekul (Harada *et al.*, 2000).

5.3 Strukturní oblasti genomu:

Translačními produkty této části genomu jsou 3 strukturní proteiny: core proteinu (C gen) a dva obalové glykoproteiny (E1 a E2 geny). Ukázalo se C gen (21 kDa) mezi strukturními oblastmi genomu nejméně mutuje. C gen je RNA vazebný protein a je nutný k formování virových nukleokapsid. Skládá se z dimerického alfa helixu a membránové domény. Membránová doména C genu může být dále rozdělena do dvou částí D1 a D2. D1 část je N-terminální a obsahuje hodně bazických aminokyselin jako lysin a arginin. Je důležitá pro membránové umístění C genu. D2 část je C-terminální a je podstatná pro správné složení D1. (Boulant *et al.*, 2006).

Proteiny E1 (31-35kDa) a E2 (70kDa) jsou transmembránové proteiny. Tvoří výrůstky na povrchu virionu. Mají funkci v uvolnění RNA do cytoplasmy lidské buňky. E1 a E2 glykoproteiny mají dlouhou N-terminální ektodoménu a krátkou C-terminální transmembránovou doménu, ty se skládají do heterodimeru. Ektodomény viru HCV obalené glykoproteiny jsou modifikované N-vázanými glykany - je zde 6-11 potencionálních glykosylačních míst (hodně z nich je vysoce konzervativních). E1 asociuje s E2.

Nejvariabilnější oblastí strukturní části genomu HCV je právě 5' koncová část genu E2, která je označovaná jako hypervariabilní oblast 1 (HRV1) a je tvořena 27 AA. Je považována za hlavní neutralizační epitop HCV. Má funkci v modulaci vstupu viru. Genotyp 1b má ještě druhou hypervariabilní oblast HVR2, která je umístěna na 3' konci HVR1 a je tvořena 7AA. E2 má funkci vazebného receptoru. E1 a E2 se účastní zprostředkování vstupu viru do buňky a jeho složení do infekčních partikulí (Helle *et al.*, 2006), (Cocquerel *et al.*, 2006).

5.4. Genotypy a subtypy HCV

Populace hepatitidy C se klasifikuje na základě genotypu. Jako jeden genotyp se označují všechny populace virové hepatitidy typu C vykazující shodu 50-70% nukleotidové sekvence. A to shoda v oblasti vysoce geneticky konzervativní – 5' koncové NCR. V rámci každého genotypu existuje řada subtypů, kde genetická shoda je 70-85%. Dalším stupněm jsou již zmíněné kvazidruhy se shodou nad 80%. Rozlišujeme 6 genotypů a asi 50 subtypů HCV. Jejich prevalence jeví značnou geografickou rozdílnost. V Evropě naprosto dominuje genotyp 1b. V USA jsou rovnoměrně rozšířeny genotypy 1a a 1b. V Japonsku dominuje genotyp 2. Genotyp 3 je dominantní na indickém subkontinentu. V Africe je zastoupen genotyp 4. Genotyp 5 byl prokázán pouze v jižní Africe. V Hongkongu a jihovýchodní Asii se vyskytuje genotyp 6 (Simmonds *et al.*, 2005).

5.5. Kvazidruhy (kvaziespecies)

Každý infikovaný jedinec má v organismu okolo miliardy virionů, které s největší pravděpodobností obsahují různé genetické sekvence v jednotlivých oblastech genomu. Sekvence, která je v dané oblasti nejčastější, je označovaná jako vzorová sekvence. Kromě tedy této vzorové sekvence zjistíme v dané oblasti i odlišné sekvence.

Nositele všech těchto odlišných mutací sekvencí nazýváme kvazidruhy HCV. Pravděpodobnost, že najdeme v rámci RNA materiálu jednoho virionu vzorové sekvence všech oblastí genomu je minimální. Frekvence mutací různých oblastí genomu HCV je různá, řada je letální. Populace virionů s takovou mutací zaniká. Důležitým faktem pro terapii je skutečnost, že každý kvazidruh, který unikne imunitním tlakům, musel existovat již před zahájením terapie.

Vlivem imunitní selekce se odolný kvazidruh stane dominantním a může dojít ke změnám ve vzorové sekvenci. Žádná tato genetická změna – drift nevede ke změně subtypu HCV. Subtypy se liší asi 20% sekvencí celého genomu (Urbánek 2004).

6 Klinický obraz virové hepatitidy C

Inkubační doba HCV se udává v rozmezí 15 až 150 dní, s maximem mezi 5 a 12 týdny. Akutní HCV probíhá převážně aniktericky. Často je zcela asymptomatická, a proto ve většině případů uniká pozornosti (Orland *et al.*, 2001). K rozvoji chronické infekce, při které přetrvává pozitivita nukleové kyseliny viru (HCV RNA) déle než 6 měsíců, dochází přibližně u 70 % pacientů. U většiny z nich se rozvíjí chronická hepatitida C (Rožnovský 2006). Onemocnění potom velmi pozvolně progreduje ze stádia chronické hepatitidy do jaterní cirhózy. Rychlost progresu do cirhózy je ovlivněna věkem (rychlejší přechod při infikování ve vyšším věku), nadměrným požíváním alkoholu a při koinfekci s HBV či HIV.

7 Diagnostika hepatitidy C

Základem diagnostiky hepatitidy C je průkaz anti-HCV protilátek. V případě positivity na anti-HCV protilátky je nutné doplnit vyšetření přítomnosti nukleové kyseliny viru (HCV RNA) v séru. Přitom mohou nastat dvě možnosti. První z nich je pozitivita anti-HCV protilátek i přítomnost HCV RNA. Nejčastěji jde o nemocného s chronickou hepatitidou C, méně často o akutní hepatitidu typu C. Druhou možností je pozitivita anti-HCV protilátek, ale nepřítomnost HCV RNA, což je mnohem méně častý nález. Lze interpretovat jako stav po akutní hepatitidě typu C, která nepřešla do chronicity. Nebo jde o pacienta vyléčeného z chronické hepatitidy typu C (spontánní uzdravení, bez antivirové terapie, je u chronické hepatitidy C velmi nepravděpodobná).

Verifikace přítomnosti viru HCV musí být dále ověřena některou z metod molekulární genetiky. Jde o metody, které prokazují přítomnost virové nukleové kyseliny v séru nebo v tkáni.

Pro tyto testy bylo důležité zavedení kvantifikačních jednotek HCV RNA, stalo se v roce 1999 Světovou zdravotnickou organizací. Byla definována mezinárodní jednotka HCV RNA (IU). IU představuje celkové množství HCV RNA v ml krve. Komerčně vyráběné kvantitativní systémy by v současné době měly výhradně používat tyto UI. Z metod používaných pro diagnostiku hepatitidy C to jsou polymerázová řetězová reakce (PCR), kvantitativní PCR, metoda větvené DNA a další (Pawlotsky 2002a).

8 Léčba

8.1 Protivirová léčba HCV:

Ideální cíle protivirové léčby můžeme charakterizovat následovně:

- a) trvalé vyloučení HCV
- b) trvalá normalizace ALT (alaninaminotransferáza)
- c) pokles zánětlivé aktivity a zmírnění fibrotických změn v histologickém obraze (Pawlotsky 2002b).

Infekce virem hepatitidy C (HCV) představuje v České republice závažný zdravotnický problém. Přispívá k tomu nedostupnost vakcinace proti HCV, narůstající počet pacientů s pokročilou formou jaterního onemocnění, kteří byli infikováni před několika desítkami let. Ale i zvyšující se počet mladistvých uživatelů drog s nově diagnostikovanou infekcí (v roce 2001 bylo v ČR diagnostikováno přes 20000 osob infikovaných HCV (Němeček 2003). V roce 2005 bylo nově přibývajících přes 800 – zdroj EPIDAT, SZÚ Praha. Zmíněný nepříznivý nárůst může ovlivnit protivirová léčba pacientů infikovaných HCV. Protivirové preparáty zahrnují interferon alfa (IFN), pegylovaný interferon alfa (PEG-IFN) a ribavirin. Při léčbě pacientů s chronickou hepatitidou C a méně pokročilou jaterní cirhózou se užívá většinou kombinace PEG-IFN s ribavirinem. K trvalému vyloučení HCV dochází u 50–80 % pacientů, ale léčba je provázena poměrně častými nežádoucími účinky (Rožnovský 2006).

Přehled používaných preparátů:

- purifikovaný humánní lymfoblastoidní IFN alfa (směs subtypů IFN alfa), ("Wellferon")
- rekombinantní IFN alfa (rIFN alfa), ("Roferon A", "Intron A")
- pegylovaný IFN alfa (= vázaný na polyetylén glykol, "Pegintron") - s prodlouženým plazmatickým poločasem na asi 40 hodin z původních 4 hodin
- interferon vázaný na větvený polyetylén glykol, tj. s vyšší výslednou molekulovou hmotností ("Pegasys")
- "consensus" interferon, CIFN ("Infergen"), jehož molekula obsahuje v řetězci nejčastěji se vyskytující aminokyseliny

8.2 Léčba interferony:

Interferony mají schopnost inhibovat přímo syntézu virových nukleových kyselin i jednotlivých virových proteinů. Složitá inhibice interferony je známa pouze z části.

Interferon alfa je bílkovina produkovaná lymfocyty, která se skládá ze 165 AA. Podle přesné sekvence AA jsou dále rozlišovány typy 2a, 2b, 2c...a má přímý protivirový účinek. Ribavirin zesiluje účinek interferonu, ale má i malý přímý protivirový efekt. Proto se interferony podávají současně s ribavirinem. Monoterapie interferonem se používá pouze v případě kontraindikace ribavirinu, monoterapie ribavirinem se neužívá. Další preparáty, např. interferony vázané na albumin, amantadin, deriváty ribavirinu a inhibitory proteáz nepřekročily rámec klinických studií a nejsou v běžné praxi prozatím užívány (Kamal *et al.*, 2004).

Terapie INF alfa a ribavirinem vyléčí okolo 40% pacientů s HCV genotypem 1 a okolo 80% infikovaných genotypem 2 nebo 3 (Zeuzem *et al.*, 2000).

8.2.1 Pegylovaný interferon alfa (PEG-IFN):

Preparát je možné použít u pacientů infikovaných všemi genotypy HCV. Interferonu alfa se váže na nosič, kterým je polyetylénglykol. Polyetylénglykol je složen z podjednotek, které sestávají z molekul etylenoxidu. PEG je netoxický, ve vodě rozpustný polymer, který je schopen kovalentní vazby s různými proteiny. Pegylace prodlužuje přítomnost proteinů v organismu snížením jejich vylučování ledvinami a degradace proteolýzou. Zároveň snižuje antigenicitu proteinu, zvyšuje jeho rozpustnost, tepelnou a chemickou stabilitu. PEG-IFN má asi desetkrát prodloužený plazmatický poločas oproti normálnímu IFN (zhruba 40 hodin versus 4 hodiny). Tyto výsledky umožňují podávat PEG-IFN v týdenních intervalech ve formě subkutánních injekcí. V současné době je dostupný Pegasys (Roche), který se aplikuje v dávce 180 µg bez rozdílu hmotnosti, a PegIntron (Schering-Plough), který se podává v dávce 1,5 µg/kg (Šperl 2005). Účinnost obou léků je prakticky srovnatelná i přes určité rozdíly ve složení molekul, ve farmakokinetice či v dávkování.

Lineární PEG-IFN alfa-2b má molekulovou hmotnost 12 kD a eliminuje se především ledvinami. Plazmatický poločas je 30,7 hodiny, maximální plazmatické koncentrace je dosaženo za 8-12 hodin po podání a tato koncentrace se udržuje 48-72 hodin.

V PEG-IFN alfa-2a je PEG rozvětvený a molekulová hmotnost tohoto preparátu je vyšší (40 kD) a je metabolizován hlavně játry. Tato forma PEG-IFN se pomaleji absorbuje (účinné koncentrace je dosaženo za 3-8 hodin, ale maximální až asi za 80 hodin), má asi stokrát zpomalenou eliminaci ledvinami a prodloužený plazmatický poločas oproti

„klasickému“ IFN alfa-2a. Terapeutické hladiny PEG-IFN alfa-2a přetrvávají až 168 hodin. Výhodou je možnost podávání standardní dávky 180 mg jednou týdně u všech pacientů. Není nutné dávku redukovat v případě renální nedostatečnosti.

Kombinace PEG-IFN a ribavirinu je v současnosti nejúčinnějším způsobem léčby nemocných chronickou hepatitidou C. Setrvalého vymizení viru touto léčbou se docílí u 50-60 % léčených, což je významně více než při léčbě „klasickým“ alfa-IFN a ribavirinem (30-40 %).

8.2.2 Konvenční interferon alfa (IFN):

Vzhledem k nižší účinnosti ve srovnání s PEG-IFN je konvenční interferon alfa schválen jen na lidech, kteří jsou infikováni genotypem 2 a 3. Určité místo si IFN ještě zachoval při léčbě dětí (Jacobson *et al.*, 2002), pacientů s akutní hepatitidou C a u dialyzovaných nemocných (Fabrizi *et al.*, 2000). V současné době jsou dostupné Roferon-A (Roche), Intron Redipen (Schering-Plough) a Alfaferone (Alfa Wassermann). Běžné dávkování je třikrát týdně 3 milióny jednotek subkutánně. Častější aplikace je pacienty obtížněji tolerována a navíc zvyšuje množství nežádoucích účinků. Rovněž mezi konvenčními interferony, i přes mírnou rozdílnost základní struktury, nejsou prakticky žádné rozdíly v účinnosti.

8.2.3 Nežádoucí účinky IFN:

Při léčbě IFN či PEG-IFN se často vyskytují chřipkové příznaky, mírné zažívací obtíže, padání vlasů, leukopenie a trombocytopenie. Přibližně u 20–30 % pacientů se rozvíjejí závažnější komplikace, které zahrnují poruchy štítné žlázy hlavně charakteru hypothyreózy, deprese či zhoršení dříve přítomných psychiatrických onemocnění a zhoršení dříve přítomných autoimunitních onemocnění, např. ulcerózní kolitidy, psoriázy či revmatoidní artritidy.

Nežádoucí účinky vedou mnohdy k předčasnému ukončení léčby. Zvládnutí nežádoucích účinků přináší často dodatečnou léčbu, například podání paracetamolu při chřipkových příznacích, antidepresiv při psychických změnách, často je nezbytná redukce dávky interferonů při rozvoji leukopenie a trombocytopenie (Husa *et al.*, 1996).

8.3 Ribavirin:

Při léčbě infekce HCV se ribavirin (jde o analog guanosinu, 1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboxamid) užívá pouze v kombinaci s interferony. Na našem trhu je dostupný Rebetol (Schering-Plough) a Copegus (Roche). Tablety vždy obsahují 200 mg ribavirinu.

Denní dávka kolísá od 800 do 1 200 mg, závisí na genotypu viru a hmotnosti pacienta. U pacientů infikovaných genotypem 1, kteří jsou léčeni Rebetolem s PegIntronem, je doporučena minimální dávka ribavirinu 10,6 mg/kg/den. Při léčbě ribavirinem u léčených žen je nutné užívat antikoncepci, aby se předešlo riziku postižení plodu.

8.3.1 Nežádoucí účinky ribavirinu:

Při podání ribavirinu se pravidelně rozvíjí hemolytická anémie (Schvarz *et al.*, 1995), která limituje podání léku zejména u pacientů s anémií, závažným srdečním a plicním onemocněním či postižením mozku. Relativně časté jsou dyspeptické obtíže, slizniční změny s dlouhodobým kašlem či kožní změny se zarudnutím kůže, jejím šupinatěním či zhoršením chronických onemocnění. Léčba komplikací, zejména anémie, zahrnuje redukci dávky či úplné vysazení ribavirinu, při dlouhodobém kašli se podávají mukolytika, u kožních projevů většinou postačuje lokální léčba.

Shrnutí současných používaných monoterapií a kombinovaných terapií je v tabulce níže.

Monoterapie	Kombinované Terapie
<u>Intron A</u>	<u>Pegasys + Copegus</u>
<u>Roferon</u>	<u>PEG-Intron + Rebetol</u>
<u>Infergen</u>	<u>Intron A + Rebetol</u>
	<u>Roferon A + Ribavirin</u>

Tabulka 1: Monoterapie a kombinované terapie užívané k léčbě žloutenky typu C

9 Ekonomické aspekty léčby

Výroba nových preparátů, včetně vakcín, je nejen finančně velice náročná, ale i zdlouhavá.

Následující informace vycházejí z podmínek v USA, odkud pochází většina perspektivních preparátů. Nejvyšší autoritou je zde Food and Drug Administration (FDA) - úřad, který schvaluje nově vyvíjené léky k prodeji. Firma vyvíjející nový preparát musí FDA prokázat, že nový lék je dostatečně bezpečný a účinný. Postup v jiných státech světa je obdobný. V České republice podléhají nové léky schválení Státního úřadu pro kontrolu léčiv (SÚKL). (viz. Tabulka 2 pod textem)

Fáze	Cíl	Testovací vzorek	Délka (roky)	Úspěšnost
Předklinické testy	Test bezpečnosti a účinnosti	Laboratorní testy na zvířatech	3,5	5000 preparátů vstupuje do celého procesu testování
Fáze I	Určit bezpečnost a dávkování	10 - 100 dobrovolníků	1	...z nich 5 postoupí dále do I. a II. fáze klinických testů
Fáze II	Vyhodnotit účinnost, sledovat nežádoucí účinky	100 - 300 pacientů dobrovolníků	2	
Fáze III	Ověřit účinnost, vyhodnotit nežádoucí účinky při dlouhodobém používání	1000 - 3000 pacientů dobrovolníků	3	
FDA	Schvalovací proces		2,5	...z nich 1 je nakonec schválen

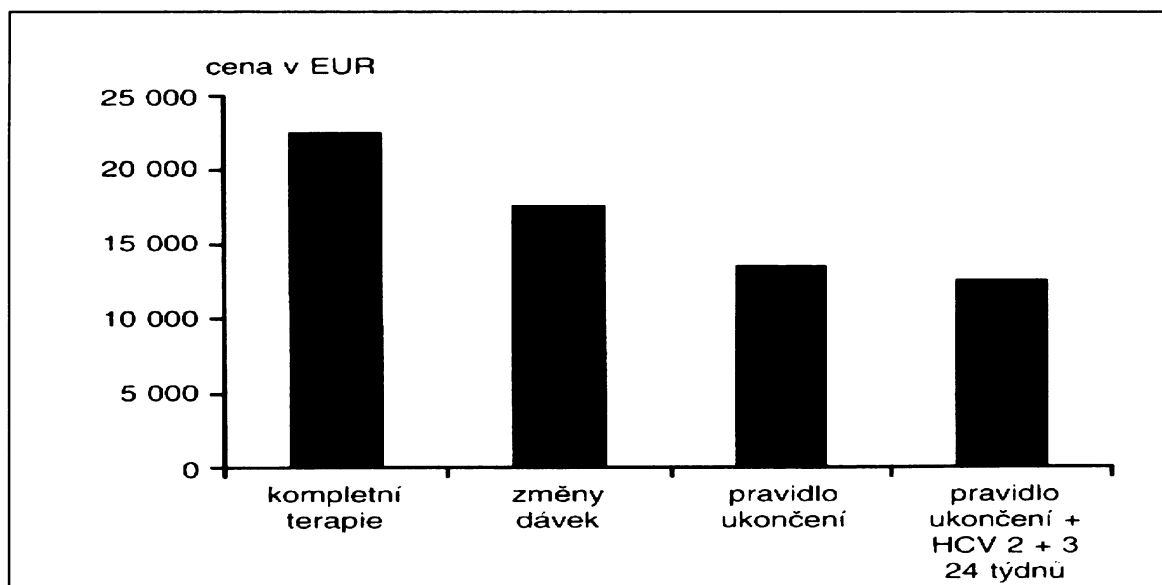
Tabulka 2: Příklad postupu při testování nových léčiv

Jedno z nejdůležitějších hledisek efektivity léčby je ekonomická zátěž. Je jisté, že léčba jakéhokoli chronického onemocnění je finančně velmi náročná a zatěžuje společnost. V oblasti protivirové terapie chronické HCV je tento problém velmi aktuální. Vzhledem k tomu, že virem HCV je v současnosti infikováno 5 krát více osob než osob infikovaným HIV. V současné době je chronická infekce HCV jednou z nejčastějších indikací pro transplantaci jater, což je velice nákladný zákrok (Trunečka 2005).

Analýza ekonomického přínosu každé terapie je složitý proces. Studie ekonomické efektivity terapie mohou být založeny buď na matematických modelech. Jako příklad může sloužit studie Dusheika z roku 1995. Dusheiko srovnával skupinu 1000 osob s chronickými virovými hepatitidami B a C, léčenou tehdy standardní monoterapií IFN alfa, se stejně početnou skupinou osob neléčených. Studie byla provedena ve Velké Británii. Bylo zjištěno, že během 30 let byla ve skupině pacientů s chronickou hepatitidou C, léčených interferony, snížena letalita o 13 až 22 případů. Ve skupině pacientů se rapidně snížil počet jaterních cirhóz. To znamená, že nebyla třeba ani následná dekompenzace. Bylo ušetřeno až 17 128 liber (Dusheiko 1995).

Druhým typem studií jsou retrospektivní analýzy (studie Joliota *et al.*, z roku 1996). Autoři porovnali dvě skupiny osob. První skupinou byli pacienti s neléčenou chronickou hepatitidou C. Byly spočítány veškeré náklady na lékařskou péči (léčba jaterní cirhózy apod.). Druhou skupinou byli pacienti s chronickou hepatitidou C léčení různými dávkovacími schémata interferonu alfa v monoterapii. Výsledná cena každého terapeutického schématu byla přepočítána na jeden rok prodloužení života u léčených osob. Ve všech srovnávaných variantách bylo dosaženo snížení nákladů až o 150000 francouzských franků (Joliot *et al.*, 1996).

Další cesta jak snížit náklady na terapii bylo zavedení PEG-INF alfa a ribavirinu do léčebných schémat (viz. Obr. 5, sloupeček kompletní terapie). Což bylo možné ještě snížit fixním dávkováním v závislosti na tělesné hmotnosti (viz. Obr. 5, sloupeček změny dávek). Z dalších cest, vedoucích ke snížení nákladů léčby, je identifikace spolehlivého predikačního faktoru efektu léčby a striktní dodržování doporučených léčebných postupů. Zde může být cena snížena až o třetinu (viz. Obr. 5, sloupeček pravidlo ukončení). Plus kombinace těchto pravidel s léčením genotypů 2 a 3 (24 týdnů a 800mg), (viz. Obr. 5 sloupeček pravidlo ukončení plus HCV 2 a 3 24 týdnů). Protivirová terapie je z dlouhodobého pohledu levnější než léčba pokročilých stádií jaterní cirhózy (Urbánek 2004).



Obr. 5: Cena v eurech-kombinace PEG-INF-alfa-b a ribavirinu, vysvětlení v textu výše.

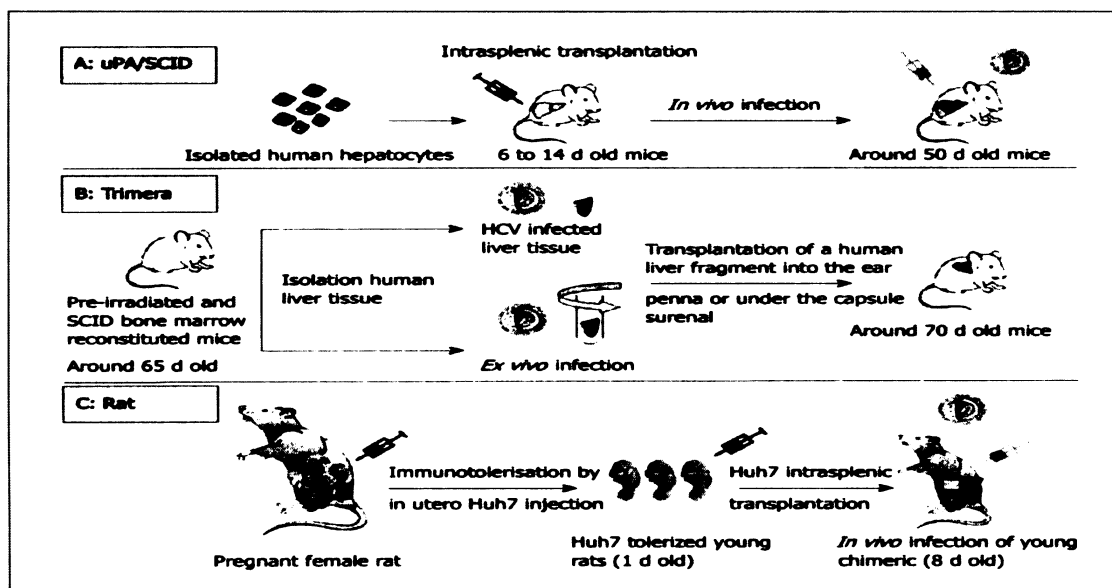
Převzato z: Urbánek 2004

10 Antivirová terapie

HCV nevyvolává časově ohraničené akutní onemocnění, se kterým by se lidský organismus byl schopný vyrovnat a virus eliminovat. Taktéž nevzniká postexpoziční imunita, která normálně brání propuknutí onemocnění při další expozici. Pouze 15-30 % osob je schopno virus eliminovat (Alberti *et al.*, 1999) a jsou popsány i opakované epizody akutní HCV infekce. Tuto reinfekci mohou přitom vyvolat řetězce identické s řetězci, které vyvolaly i první infekci (Mehta *et al.*, 2002). Je to proto, že HCV je velice heterogenní. Dnes je rozlišováno 6 genotypů a více než 50 subtypů HCV, nemluvě o výše zmíněných kvazidruzích. Tato genetická variabilita představuje základní mechanismus úniku viru imunitní odpovědi lidského organismu.

Virus hepatitidy C potřebuje plně funkční lidské hepatocyty, proto se do nedávné doby mohlo zkoumat pouze na člověku a vyšších primátech jako je šimpanz. Jako další pokusná zvířata mohou být použita: kosman, tana a tamarin, ale i ty mají značné nevýhody. Jsou jimi dlouhá doba gestace, vysoké chovné náklady, těžká dostupnost, vysoká pořizovací cena. Proto je běžnou praxí, že na jednom šimpanzovi dělá výzkum i několik týmů najednou, což je náročné pro pokusné zvíře, ale zhoršuje to i validitu výsledků. Proto je výhodnější používat pro zkoumání HCV hlodavce, jejich největšími výhodami jsou krátká doba gestace, nízké náklady na chov i nízká prodejní cena.

V dnešní době existují 3 modely pro infekci HCV z řad hlodavců (viz Obr pod textem se stručným vysvětlením). Což by mohlo posunout výzkum nových antivirotik a vakcinace proti HCV zase o krok dál (Kremsdorf *et al.*, 2007).



Obr. 6: Transplantační protokol tří hlodavčích modelů HCV infekce.

A. uPa/SCID model: izolace lidských hepatocytů, intrasplenická buněčná transplantace do homozygotních myši a *in vivo* nakažení HCV pozitivním lidským sérem. B. trimera model: iradiace a rekonstituce myši kostní dřeně, transplantace HCV infikovaných lidských fragmentů jater. C. krysí model: navození imunotolerance krysích zárodků pomocí intauterinní injekce Huh7 buněk, transplantace jaterních buněk do čerstvě narozených krys a *in vivo* infekce mladých chimérických krys HCV lidským sérem pozitivním na HCV. Převzato z: Kremsdorf *et al.*, 2007

9.1 Inhibitory

Právě díky novým zvířecím modelům a studiu životního cyklu HCV se rýsuje mnoho více či méně nadějných antivirotik potažmo vakcín. Každý krok v životním cyklu viru může být inhibován.

Nadějným přípravkem jsou například peptidomimetické inhibitory serinové proteinázy NS3/4A.

9.1.1 BILN-2061:

První proteinázový inhibitor, který vstoupil do klinických testů, byl BILN-2061 (Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Německo), je to nekovalentně se vážící, makrocyclický inhibitor HCV NS3/4A. BILN 2061 indukuje signifikantní a rychlý pokles RNA hepatitidy C. U žloutenky typu C genotypu 1, méně i u genotypů 2 a 3 (Reiser *et al.*, 2005). Bohužel výzkum tohoto preparátu byl ukončen, protože ukázal jeho myokardiální toxicitu (Hinrichsen *et al.*, 2004). Zkoumání tohoto léčiva ujasnilo základy pro porozumění resistence této třídy léčiv a tak dalo podklady pro výzkum dalších inhibitorů (Lin *et al.*, 2005).

9.2.2 Telaprevir

Telaprevir (VX-950) je NS3/4A serinový proteázový inhibitor, zkoumaný firmou Vertex Pharmaceuticals, Cambridge, MA). Další inhibitor je SCH 503034 (Schering-Plough Corporation, Kenilworth, NJ) a spolu s Telaprevirem postoupili do II. fáze klinických testů. Telaprevir je peptidomimetický inhibitor NS3/4A s alfa ketoamidovou částí, která se po podání telapreviru kovalentně váže do aktivního místa enzymu a tím ho inhibuje. Telaprevir vykazuje antivirovou aktivitu proti divokému typu HCV. Ukázalo se, že aminokyselinové substituce jsou zodpovědné za křížovou resistenci viru proti těmto typům preparátů (Lin *et al.*, 2005). Ve fázi Ib klinických zkoušek, pacienti infikovaní HCV genotypem 1 užívali 14 dní telaprevir, dávka 450 mg/8h, 750/8h, 1250/12h nebo placebo (Reesink *et al.*, 2006). Během 72 hodin všichni pacienti, dostávající telaprevir měli úbytek HCV RNA o dva řády. Průlom u pacientů nastal během druhého týdne působení telapreviru. Relaps nastal převážně u pacientů s nízkou dávkou léku. Byla zde také duální selekce telapreviru-resistentních variant. Hlavní mutace byly Val36Met/Ala, Thr54Ala, Arg155Lys/Thr, a Ala156Ser/Thr/Val. Viry, které měly aminokyselinovou substituci v pozici 156 byly nejvíce rezistentní, ale také nejméně odolné *in vivo* (Sarrazin *et al.*, 2007).

Kombinace s léčivem s antivirovým efektem, jako je pegylovaný IFN-alfa at' už v kombinaci s ribavirinem nebo bez něho, z části snižují rezistenci viru k telapreviru. V současných testech se prokázalo, že u 12 pacientů, kteří užívali trojkombinaci pegylovaného IFN-alfa, ribavirinu a telapreviru po dobu 28 dní, bylo HCV RNA nedetekovatelné (méně než 10IU/mL), (Rodriguez-Torres *et al.*, 2006). V PROVE 1 testech (PROtease inhibitors for Viral Evaluation) fáze II byla testována kombinace telapreviru s pegylovaným IFN-alfa a ribavirinem. Tento test po 12 týdnech ukázal, že naivní subjekty, ty s nedetekovatelnou hladinou HCV RNA, byli signifikantně vyšší než jen kombinace pegylovaného IFN-alfa a ribavirinu bez telapreviru (respektive 88% vs. 52%). Telaprevir je

ale bohužel spojen mnoha frekventovanými vedlejšími účinky jako dermatologické a gastrointestinální potíže (McHutchison *et al.*, 2007). V PROVE 2 fázi testů nebyla HCV RNA po 4 týdnech trojkombinační terapie detekována u 122 pacientů ze 163, což je pouze 75% (Dusheiko *et al.*, 2008). Tento pokles byl způsoben zřejmě tím, že pacienti z PROVE 1 byli pod přísnějším dohledem. Výsledky z PROVE 3 zatím nejsou.

9.2.3 RdRp inhibitory

Inhibitory RNA - dependentní RNA polymerasy (RdRp) jsou děleny do 2 kategorií: nukleotidové/nukleosidové inhibitory, které jsou zaměřeny na katalytická místa enzymu a nenukleosidové inhibitory, které jsou cílené na alosterická místa v enzymu RdRp. Byla popsána 4 místa, A až D, v RdRp. Tři RdRp inhibitory jsou testovány na pacientech v klinických testech, včetně 2 nukleosidových a 1 nenukleosidového inhibitoru.

NM283, komerční název valopicitabin (Idenix Pharmaceuticals, Cambridge, MA, a Novartis, Basel, Switzerland, je nukleosidový analog 2'-C-methylcytidinu. Zkoumána je monoterapie valopicitabinem. Bohužel se zde objevují časté gastrointestinální problémy (Afdhal *et al.*, 2006).

S dalších testovaných preparátů, které jsou buď v klinických nebo předlinických fázích testování, to jsou inhibitory vstupu HCV- polyklonální imunoglobuliny, monoklonální protilátky, ribozymy a oligonukleotidy (viz. Obr. 7 níže)

	Phase of Development			
	Preclinical	I	II	III IV
Viral Entry Inhibitors				
Hepatitis C immunoglobulin (HClg)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
HCV-Ab 68 and HCV Ab 65 (monoclonal Ab)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
HCV RNA Translation Inhibitors				
ISIS 14803 (antisense)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
AV1 - 4065 (antisense)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
Heptazyme (ribozyme)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
VGX-410C (small molecule IRES inhibitor)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
TT 033 (siRNA)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
Post Translational Processing Inhibitors				
<i>NS3-4A Serine Protease Inhibitors</i>				
BILN 2061	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
ITMN 191	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
VX-950	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
SCH 503034	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
ACH-806/GS-9132	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
HCV Replication Inhibitors				
<i>NS5B Polymerase Inhibitors</i>				
MK-0608	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
HCV-796	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
R1628	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
JTK-003	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
NM-283	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
XTL 2125	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
<i>Cyclophilin B Inhibitors</i>				
DEBIO-025	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
NIM 811	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
<i>NS5A Inhibitors</i>				
A-831, A-689	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
<i>Helicase Inhibitors</i>				
QU663	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
Recombinant Ab fragments	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■
Virus Assembly and Release Inhibitors				
UT-231B (iminosugar - glucosidase inhibitor)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■*
Celgoxvir (glucosidase inhibitor)	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■	■■■■■■■■■■

Obr. 7: Inhibitory životního cyklu HCV v preklinické nebo klinické fázi výzkumu. Převzato z: Pawlitsky *et al.*, 2007

11 Závěr

Diagnostika a léčba pacientů s chronickou hepatitidou C je ve většině vyspělých zemí světa na vysoké úrovni. V České republice je léčba dostupná pro všechny pacienty, kteří ji potřebují a které je možné tímto způsobem léčit, a je plně hrazena zdravotními pojišťovkami. Hlavním úkolem současnosti je aktivní vyhledání a léčba nemocných chronickou HCV dříve, než se u nich onemocnění dostane do pokročilých stádií, kdy je již kvalita a délka jejich života výrazně ovlivněna, léčebné možnosti omezené a náklady na léčbu závratně vysoké. Díky epidemiologickým údajům můžeme říci, že infekce virem HCV jedno z nejvážnějších onemocnění na světě. A proto je třeba shromažďovat data a výsledky a posunout tak vývoj nových antivirotních zase o krok kupředu. Životní cyklus HCV nabízí množství potenciálních cílů pro specifické inhibitory. Teoreticky každý krok cyklu může být inhibován. V současnosti se výzkum nejvíce zaměřuje na specifické inhibitory buněčného cyklu HCV a dospěl k značnému počtu slibných léčiv, která jsou v předklinickém nebo klinickém testování. Bohužel se ukazuje, že mnoho z nadějných preparátů má velké množství vedlejších účinků. Proto je neustále považována za standardní léčbu kombinace interferonu alfa a ribavirinu.

12 Seznam použité literatury

- Afdhal NH, O'Brien C, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, Pappas SC, Pockros P, et al. Valopicitabine (NM283), alone or with peg-interferon, compared to peg-interferon/ribavirin (PEGIFN/RBV) retreatment in hepatitis C patients with prior non-response to PEGIFN/RBV: week 24 results. *J Hepatol.* 2006; 44(Suppl 2): p. 19
- Alberti A., Chemello L., Benvegna L. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol*, 1999 31, p. 17-24A
- Alter MJ. Epidemiology of hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol* 2007, 13(17): p. 2436-2441
- Appel N., Schaller T., Penin F., Bartenschlager R. from structure to fiction: new insights into hepatitis C virus RNA replication. *J. Biol Chem* 2006, 281, p. 9833-9836
- Blight KJ., Kolykhalov AA., Rice CM. Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* 2000, 290, p. 1972-1974
- Boulant S., Vanbelle C., Ebel C., penin F., Lavergne JP. Hepatitis C virus core protein is a dimeric alpha-helical protein exhibiting membráně protein features. *J. Virol* 2005, 79, p. 11353-11365
- Brass V., Bieck E., Montserret R., Wolk B., Hellings JA., Blum HE., Penin F., Moradpour D. An amino-terminal amphipathic alpha-helix mediates membrane association of the hepatitis C virus nonstructural protein 5A. *J Biol Chem* 2002, 277, p. 8130-8139
- Cocquerel L., Voisset C., Dubuisson J., Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 2006. 87, p. 1075-1084,
- Dubuisson J., Hepatitis C virus proteins, *World J gastroenterol* 2007, 7;13(17): 2406-2415
- Dusheiko GM., Roberts JA. Treatment of chronic type B and C hepatitis with interferon alpha: An economic appraisal. *Hepatology*, 1995, 22, p. 1863-1873
- Dusheiko GM, He'zode C, Pol S, Goeser T, Bronowicki J-P, Bourliere M, et al. Treatment of chronic hepatitis C with telaprevir in combination with peginterferon alfa-2a with or without ribavirin: interim results of the PROVE2 study. *J Hepatol* 2008; 48: p. 26.
- Edlin B., Prevention and treatment of hepatitis C in injection drug users. *Hepatology*, 2002, p. 210-219
- Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum HE., Moradpour D., Bienz K. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membráně alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002, 76, p. 5974-5984
- Fabrizi F., Martin P., hepatitis B virus infection in dialysis patients. *Am J Nephrol* 2000, 20, p. 1-11

- Frank, C., Mohamed, Mk., Strickland, GT., *et al.* The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*, 2000, 9207, p. 887-891
- Griffin S., Clarke D., Harvey R., Barclay WS., Harris M., Rowlands DJ., A conserved basic loop in hepatitis C virus p7 protien is required for amantadine-sesnsitive ion channel aktivity in mammalian cells but is dispensable for localization to mitochondria, *J Gen Virol*, 2004, 85, p. 451-461
- Halfon, P., Riflet, H., Renou, C. Molecular evidence of male to female sexual transmission of hepatitis C virus after vaginal and anal intercourse. *J Clin Microbiol*, 2001, 39, p. 1204-1206
- Harada T, Tautz N, Thiel HJ. E2-p7 region of the bovine viral diarrhea virus polyprotein: processing and functional studies. *J Virol*. 2000;74: p. 9498–9506
- Helle F., Wychowski C., Vu-dac N., Gustafson Kr., Voisset C., Dubuisson J., cyanovirin-N inhibic hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glykans. *J Biol chem* 2006, 281, p. 25177–25183
- Hinrichsen H, Benhamou Y, Wedemeyer H, Reiser M, Sentjens RE, Calleja JL, et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology*. 2004; 127: p. 1347–1355.
- Husa P., Ježek P., Chalupa P. Therapy for chronic viral hepatitis with interferon alpha-2b. *Scripta Medica*, 69, 1996, p. 431-439
- Husa P., Roznovsky L., Smejkal P. et al. Efficacy and safety of chronic hepatitis C treatment in hemophilic patients. *Hepato-Gastroenterology* 2005; 52, č. 65: p. 1541–1544.
- Chevaliez S., Pawlotsky JM. Hepatitis C virus: Virology, diagnosis and management of antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 2007, *Int J Med Sci*. 2006; 3(2): p. 35–40.
- Choo QL., Kuo G., Weiner Al., et al., Isolation of a c dna clone derived from a blood borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989, 244, p. 359-362
- Jacobson Kr., Murray K., Zellos A., et al., An Analysis of Publisher trial sof interferon monotherapy in children with chronic hepatitis C. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002, p. 52-58
- Joliot E., Vanlemmens C., Kerleau M., et al., Cost-effectiveness analysis of the treatment of chronic hepatitis C. *J Hepatol*, 1996, 4, p. 456-464
- Kamal SM. , Ismail A., Graham C., He Q., Rasenack J.W. , Thomas Peters T., Tawil A.A., Fehr J.J.Khalifa K.E.S., Madwar M.M., Koziel M.J. *et al.*, Pegylated interferon alfa therapy in acute hepatitis C: relation to hepatitis C virus-specific T cell response kinetic. *Hepatology* 2004;39: p. 1721-1731.

- Kim JL., Morgenstern KA., Lin C., Fox T., Dwyer MD., Landro JA., Chambers SP., Markland W., Lepre CA., O'Malley ET., Harberson SL., Rice CM., Murcko MA., Caron PR., Thomson JA. Crystal structure of the hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 1996, 87, p. 343-355
- Kremsdorf D., Brezillon N., new animal models for hepatitis C viral infection and pathogenesis studies. *World J Gastroenterol* 2007, 13(17),: p. 2427-2435
- Lin C, Gates CA, Rao BG, Brennan DL, Fulghum JR, Luong YP, et al. In vitro studies of cross-resistance mutations against two hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BILN 2061. *J Biol Chem.* 2005; 280: p. 36784–36791.
- McHutchison JG, Everson GT, Gordon S, Jacobson I, Kauffman R, McNair L, et al. Results of an interim analysis of a phase II study of telaprevir (VX-950) with peginterferon alfa-2a and ribavirin in previously untreated subjects with hepatitis C. *J Hepatol.* 2007;
- Mehta Sh., Cox A., Hoover Dr., et al., protection against persistence of hepatitis C. *Lancet*, 2002, 343, p. 388-390
- Mele, A., Spada, E., Sagliocca, L. et al. Risk of parenterally transmitted hepatitis following exposure to Sumery or other invasive procedures: results from the hepatitis surveillance system in Italy. *J Hepatol*, 2001, 2, p. 284-289
- Memon, MI., Memon, Ma. Hepatitis C: An epidemiological review. *J Viral Hepat*, 2002, 2, p. 84-100, review
- Neddermann P., Quintavalle M., Di Pietro C., Clementi A., Cerretani M., Altamura S., Bartholomew L., De Francesco R. Reduction of hepatitis C virus NS5A hyperphosphorylation by selective inhibition of cellular kinases activates viral RNA replication in cell culture. *J Virol* 2004, 78, p. 13306-13314
- Neumayr, G., Propst A., Schwaighofer H. Lack of evidence for the heterosexual transmission of hepatitis C. *QJM* 1999; 92: p. 505-508
- Němeček V. Sérologický přehled ČR v roce 2001 – virová hepatitida A, B, C. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie* 2003; 12, Příloha 1: p. 55–61
- Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: p. 321-327
- Otto GA., Puglisi JD. The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* 2004, 119: p. 369-380
- Pallaoro M., Lahm A., Biasiol G., Brunetti M., Nardella C., Orsatti L., Bonelli F., Orru S., Narjes F., Steinkuhler C. Characterization of the hepatitis C virus NS2/3 processing reaction by using a purified precursors protein. *J Virol* 2001, 75, p. 9939-9946
- Pawlotsky JM. Molecular diagnosis of viral hepatitis. *Gastroenterology* 2002a; 122: p. 1554-1568

- Pawlotsky JM. Use and interpretation of virological tests for hepatitis C. *Hepatology* 2002b; 36: p. 65-S73
- Penin F., Dubuisson J., Rey FA., Moradpour D., Pawlotsky JM., Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39: p. 5–19
- Perz Jf., Armstrong Gl., Farrington La., Hutin Yj., Bell Bp., The contributions of hepatitis B and hepatitis C virus infection to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol* 2006, 45, p. 529-53
- Reesink HW., Zeuzem S., Weegink CJ., Forestier N., van Vliet A., van de Wetering de Rooij J., *et al.*, Rapid decline of viral RNA in hepatitis C patients treated with VX-950: a phase Ib, placebo-controlled, randomized study. *Gastroenterology*. 2006;131: p. 997–1002
- Reiser M, Hinrichsen 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: p. 832–835
- Rodriguez-Torres M, Lawitz E, Muir AJ, Keane J, Kieffer TL, McNair L, *et al.* Current status of subjects receiving peginterferon alfa-2a (PEG-IFN) and ribavirin (RBV) follow-on therapy after 28-day treatment with the hepatitis C protease inhibitor telaprevir (VX-950), PEG-IFN and RBV. *Hepatology*. 2006;44(Suppl 2):532A
- Rožnovský L., CSc, Med. Pro Praxi 2006; 4: p. 160–163
- Sarrazin C, Kieffer TL, Bartels D, Hanzelka B, Muh U, Welker M, *et al.* Dynamic HCV genotypic and phenotypic changes in patients treated with the protease inhibitor telaprevir (VX-950). *Gastroenterology*. 2007.
- Schvarz R., Yun Z., Sonnerborg A., *et al.*, Combined treatment with interferon alfa-2b and ribavirin for chronic hepatitis C in patients with a previous non-response or non-sustained response to interferone alone. *J Med Virology* 1995, 46, p. 43-47
- Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deleage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspe G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 2005, 42(4): p. 962-73.
- Šperl J. První zkušenosti s léčbou chronické hepatitidy C PegIntronem a Rebetolem v České republice. *Vnitř Lék* 2005 51 (11): p. 1314–1318.
- Trunečka P, Vítko Š, Adamec M *et al.* Výsledky programu transplantace jater v IKEM za 10 let trvání. *Folia Gastroneterol Hepatol* 2005; 3, Suppl 1 p. 13–S21
- Urbánek P., *Infekce Virem Hepatitidy C*. Galén, Praha 5.

Urbánek P., Mareček, Z., Brodanová, M., et al. Rizikové faktory přenosu viru hepatitidy C v české populaci Čas lék čes., 2002, 6, p. 185-188

Urbánek P, Husa P, Kümpel P et al. Diagnostika a léčba chronické hepatitidy C., Klinická mikrobiologie a infekční lékařství, 9(1), s. 51-54

Weiner G., Kuo G., Bradley DW., et al., Detection of hepatitis C viral sequences in non-A, non-B hepatitis. Lancet, 1990, 335, p. 1-3

Zeuzem S., Feinman SV., Rasenack J., Heathcote EJ., Lai My., Gane. Peginterferon alpha-2a in patients with chronic hepatitis C. Engl J Med 2000, 343, p. 1673-80. N E