

*Małgorzata Pawłowska, Waldemar Halota*

## LECZENIE PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C – NOWE LEKI, NOWE NADZIEJE

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK  
Kierownik: Prof.dr hab.med. Waldemar Halota

*Autorzy przedstawiają kierunki poszukiwań nowych leków w terapii przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Prezentują preparaty inhibitorów enzymów HCV oraz agonistów receptorów Toll, wprowadzone ostatnio do badań klinicznych wczesnych faz.*

*Słowa kluczowe: przewlekłe zapalenie wątroby typu C, leczenie, nowe leki*  
*Key words: chronic hepatitis C, treatment, new drugs*

Celem leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C jest trwała eradykacja zakażenia HCV. Nie ma wątpliwości, że jej uzyskanie uwarunkowane jest zastosowaniem leków, które w rezultacie spowodują zmianę utrwalonego, charakterystycznego dla każdego zakażonego, stanu równowagi replikacji HCV. Stan stabilnej kinetyki wirerii w przebiegu zakażenia HCV charakteryzuje równowaga pomiędzy zakażaniem nowych komórek i niszczeniem zakażonych, zapewniająca stałość puli zakażonych hepatocytów oraz równowaga pomiędzy uwalnianiem nowych wirionów do krążenia obwodowego i ich degradacją, zapewniająca stałe stężenie wirerii. Namnażanie HCV w organizmie gospodarza może zostać przerwane na drodze zahamowania produkcji nowych wirionów, hamowania zakażenia „de novo” zdrowych komórek czy przyspieszenia klirensu komórek zakażonych (1).

Działanie przeciwwirusowe teoretycznie może dotyczyć każdego etapu cyklu rozwojowego HCV: replikacji RNA, translacji i dojrzewania białek wirusowych oraz tworzenia wirionów. Zmniejszenie produkcji wirionów obniża zarówno zawartość materiału wirusowego w komórkach zakażonych jak i uwalnianie nowych wirionów, co w konsekwencji zmniejsza liczbę komórek zakażanych „de novo” i przy zachowanym klirensie zakażonych komórek prowadzi do obniżenia ich puli. Przyspieszenie usuwania zakażonych komórek zależne jest od natężenia procesów apoptozy w wyniku miejscowej komórkowej odpowiedzi limfocytów cytotoksycznych i produkcji określonych cytokin (2,3).

W poszukiwaniu nowych strategii leczenia pzw C prowadzone są badania nad zastosowaniem nowych interferonów i induktorów interferonu, leków alternatywnych do rybawiryny, specyficznych inhibitorów HCV oraz szczepionkami.

Preparaty interferonu – cytokiny o działaniu przeciwwirusowym i immunomodulacyjnym są podstawą aktualnych schematów terapeutycznych. Dotychczas w leczeniu wykorzystuje się głównie interferony typu I (IFN alfa i beta).

Po połączeniu IFN ze swoistym receptorem i indukcji aktywacji kinaz białkowych Jak 1 i Tyk 2 dochodzi do fosforylacji białek sygnału transdukcji i aktywacji transkrypcji (STAT 1 i STAT 2), które po translokacji do jądra komórki łączą się z p48/IRF-9 tworząc czynnik genów stymulowany przez IFN (ISGF3). Ten łączy się z sekwencją odpowiedzi stymulowanej przez IFN (ISRE) genów komórkowych tworząc geny stymulowane przez IFN. Równoległe do indukcji działania IFN, HCV indukuje kaskadę czynników regulujących działanie IFN (IRF), których miejscem docelowym jest ISRE. HCV rozwija wiele mechanizmów interferujących z właściwościami IFN na wszystkich poziomach jego oddziaływania, począwszy od łączenia się z receptorem, przez wpływ na aktywność PKR i 2'5'OAS do indukcji określonych ISGs. Wyjaśnienie, które spośród setek ISG są indukowane w zakażeniu HCV, jak różnią się ich sekwencje w zależności od odpowiedzi na leczenie i jaki mechanizm molekularny warunkuje to zróżnicowanie może przyczynić się do opracowania nowych metod terapii (4, 5).

Wśród badanych kombinacji interferonów consensus interferon wykazywał „in vitro” większą zdolność łączenia się z receptorem, stymulacji ISG oraz indukcji komórek NK w porównaniu do IFN alfa-2a i alfa-2b. Podobnie wysoką potencjalną aktywność przeciwwirusową i immunomodulacyjną, synergistyczną do IFN alfa przypisuje się interferonowi gamma działającemu przez inny receptor.

Aktualnie, również w Polsce prowadzone są badania II fazy oceniające skuteczność Albuferonu – IFN alfa połączonego z albuminą ludzką – w leczeniu pzw C. To połączenie wzorem pegylowanego IFN zapewnia dłuższe utrzymywanie się stężenia terapeutycznego IFN w surowicy, a badania farmakokinetyczne wykazały znaczne obniżanie wirerii HCV przy stosowaniu tego leku co 2-4 tygodnie. Prowadzone badania kliniczne II fazy u 458 pacjentów nieleczonych, jak i u 71 nieodpowiadających na wcześniejsze leczenie IFN-alfa (w 70% pegylowanym) z rybawiryną wskazują, że albuferon w kombinacji z rybawiryną jest bezpieczny i dobrze tolerowany, a też odznacza się porównywalnym do pegylowanego IFN działaniem przeciwwirusowym (6).

W działaniach rybawiryny głównie zwraca uwagę promowanie przesunięcia dynamicznej równowagi pomiędzy subpopulacjami Th1 i Th2 limfocytów CD4 na korzyść Th1, co jak wiadomo przez działanie prozapalnych cytokin, szczególnie IL-2 i IFN-gamma doprowadza do proliferacji HCV specyficznych limfocytów cytotoksycznych CD8 i akceleracji klirensu zakażonych hepatocytów. Innym działaniem rybawiryny (jej wewnątrzkomórkowej pochodnej fosforowej) jest hamowanie dehydrogenazy monofosforanu inozyny (IMPDH), co prowadzi do wyczerpania zapasów trójfosforanu guanozyny (GTP) niezbędnego do replikacji HCV. Replikację HCV w sposób bezpośredni może hamować wysokie stężenie trójfosforanu rybawiryny (RTP), który w tych przypadkach zostaje wbudowywany przez polimerazę RNA do łańcucha HCV RNA jako fałszywy analog. Jednak zdaniem badaczy główne działanie rybawiryny sprowadza się do immunomodulacji. Ze względu na dość częste występowanie w przebiegu leczenia rybawiryną niedokrwistości hemolitycznej i w konsekwencji konieczności obniżenia jej dawek lub przerwania terapii, przeprowadzono badania nad zastosowaniem w jej miejsce wiramidyny – proleku rybawiryny. Badania II fazy zastosowania wiramidyny i pegylowanego IFN alfa-2a wykazały, że wiramidyna charaktery-

zowała się niższą w porównaniu do rybawiryny indukcją niedokrwistości i w konsekwencji rzadszą redukcją dawek przy porównywalnej skuteczności terapii kombinowanej, mierzonej uzyskaniem EVR i EOT (7).

Ze względu na dużą zmienność HCV kliniczna skuteczność leków skierowanych przeciwko temu wirusowi będzie zależała od ich zdolności supresji wszystkich wariantów wirusa a też zapobiegania pojawianiu się szczepów opornych. Badania tych właściwości są ograniczone brakiem wygodnego modelu zwierzęcego tego zakażenia i ograniczonymi możliwościami przeprowadzania badań na replikonach.

Wszystkie enzymy HCV mogą być teoretycznie punktem uchwytu leków przeciwwirusowych, jednak najczęściej są nimi NS3-4A proteaza serynowa oraz NS5B RNA polimeraza. Walopicytabina (NM 283) jest dotąd jedynym nukleozydowym inhibitorem polimerazy wykazującym skuteczność w badaniach klinicznych. W badaniu fazy IIa, oceniającym skuteczność walopicytabiny zastosowanej w monoterapii lub skojarzeniu z pegylowanym IFN-alfa 2b, wśród 19 chorych na pzw C zakażonych genotypem 1 HCV wykazano, że kombinacja tych leków powodowała obniżenie wiremii HCV u większości pacjentów. 8 z 12 pacjentów leczonych walopicytabiną i pegylowanym IFN-alfa2b uzyskało EVR. W innym badaniu *O'Brien* przedstawił wyniki zastosowania walopicytabiny w różnych dawkach w skojarzeniu z pegylowanym IFN alfa 2a u 97 zakażonych genotypem 1 HCV nieodpowiadających na wcześniejsze leczenie pegylowanym interferonem i rybawiryną. Wykazał, że w 4-tym tygodniu leczenia supresja HCV RNA była wyższa w grupach leczonych NM283 + PegIFN-alfa 2a w porównaniu do leczonych PegIFN-alfa2a + RBV, najwyższa u tych, którzy otrzymali najwyższe dawki tego inhibitora polimerazy (8). Obecnie prowadzone są badania tolerancji, bezpieczeństwa i skuteczności innego nukleozydowego inhibitora polimerazy – R1626 (9).

NS3-4A proteaza HCV rozszczepia poliproteiny HCV uwalniając białka HCV niezbędne do jego replikacji. Dodatkowo mediuje rozszczepienie białek gospodarza związanych z czynnikiem odpowiedzi na IFN (IRF-3), co niweluje odpowiedź komórkową na IFN-alfa. Stąd blokowanie aktywności NS3 wydaje się mieć wpływ na zahamowanie replikacji HCV przez supresję namnażania białek wirusowych oraz przywrócenie wrażliwości gospodarza na działanie interferonu (10). Pierwszym wprowadzonym do badań klinicznych inhibitorem proteazy był BLIN 2061. Podawany pacjentom zakażonym genotypem 1 HCV 2x dziennie przez 2 dni indukował szybkie, zależne od dawki obniżanie wiremii HCV. Badania kliniczne tego leku zostały wstrzymane ze względu na zaobserwowaną u zwierząt laboratoryjnych kardiotoksyczność. Podczas badań na replikonach zaobserwowano rozwój oporności na BLIN 2061, jak też VX-950 – inny inhibitor proteazy (11,12).

SCH 503034 jest nowym doustnym inhibitorem proteazy HCV wykazującym potencjalną aktywność przeciwwirusową w badaniach na replikonach. Pierwsze badanie kliniczne kontrolowane placebo, z podwójnie ślepą próbą wykazało, że SCH 503034 zastosowany przez 14 dni jest bezpieczny, dobrze tolerowany i wykazuje zależną od dawki aktywność przeciwwirusową u zakażonych genotypem 1 HCV, wcześniej nieodpowiadających na leczenie. W kolejnym badaniu wskazano, że najsilniejsze działanie przeciwwirusowe miała terapia skojarzona inhibitorem proteazy w dawce 400mg i pegylowanym interferonem alfa-2b, w porównaniu do monoterapii pegylowanym interferonem, przy porównywalnych działaniach niepożądanych. W przeprowadzonej analizie wariantów HCV wskazano obecność pojedynczej mutacji w pozycji T54 u jednego pacjenta otrzymującego SCH503034 w dawce 200mg (13).

W badaniach przedklinicznych na replikonach wysoką aktywność przeciw mutantom NS3/4 opornym na VX-950 i BLIN 2061 wykazywały inhibitory proteazy ITMNA i ITMN B (14, 15).

Wstępne badania agonistów receptorów Toll-like szczególnie TLR 7 i TLR 9 wskazują na ich rolę w kontrolowaniu zakażenia HCV. Receptory TLR 3, TLR 7, TLR 8 i TLR 9 są wewnątrzkomórkowymi receptorami wyspecjalizowanymi w rozpoznawaniu kwasów nukleinowych wirusów. Rozpoznanie ligandów przez receptory Toll, komórek wrodzonej odpowiedzi immunologicznej, prowadzi do aktywacji procesów zapalenia, a ich zdolność pobudzania komórek prezentujących antygen (APC) uruchamia nabytą odporność do indukcji subpopulacji Th1. Stymulacja określonych receptorów Toll-like może doprowadzać do odnowy zaburzonej przez HCV funkcji układu immunologicznego gospodarza. U zakażonych HCV, którym podano izatorybinę – agonistę TLR 7 – obserwowano redukcję wirerii HCV średnio o 1 log niezależnie od genotypu HCV.

Krótkie łańcuchy oligonukleotydydowe (CpG) są potencjalnymi agonistami TLR 9. Łączą się one z TLR 9 komórek dendrytycznych oraz limfocytów B wzmacniając odporność zarówno wrodzoną jak i nabytą. Wstępne badania kliniczne przeprowadzone u zakażonych genotypem 1 HCV pacjentów demonstrujących nawrót po leczeniu Peg IFN+R wykazały, że większa część z nich osiągała EVR w wyniku zastosowania reterapii zawierającej Peg+RBV+agonistę TLR 9 – Actilon (CpG), a leczenie CpG+Peg może stanowić alternatywę dla Peg+RBV (16).

Pewne nadzieje wiąże się ze szczepionką terapeutyczną, która w założeniu ma stymulować odpowiedź komórkową. W badaniach na zwierzętach szczepionki DNA, jak też zawierające rekombinowane białka HCV, wzmagaly odpowiedź mediowaną przez limfocyty T CD4 i CD8 (17). Rekombinowana szczepionka zawierająca glikoproteiny białka E1 HCV stymulowała odpowiedź humoralną i komórkową u zdrowych ochotników, a podana zakażonym HCV w badaniu pilotażowym wywoływała obniżenie aktywności AlAT, stężenia antygeny HCV E2 w wątrobie oraz zmniejszenie włóknienia, nie wpływając na stężenie wirerii HCV w surowicy krwi (18). Trwają badania nad kolejnymi szczepionkami, między innymi zawierającą rekombinowane glikoproteiny E2 HCV.

Reasumując, przedstawione powyżej nowe preparaty znajdują się we wczesnych fazach badań klinicznych (I, II). Dopiero za kilka lat mogą spełnić pokładane w nich nadzieje. Z uwarunkowań patogenetycznych choroby wynika niepodważalna pozycja immunomodulatorów w terapii pzw C, stąd nadal IFN pozostaje jej „złotym standardem”, a kolejne nowe leki będą najprawdopodobniej stosowane w kombinacji z tą cytokiną.

*M Pawłowska, W Halota*

#### TREATMENT OF CHRONIC HEPATITIS C – NEW DRUGS, NEW HOPE

#### SUMMARY

The next generation of anti-HCV therapeutics agents will fall into new interferons and interferon inducers, alternatives to ribavirin, specific HCV inhibitors and immune therapies. According to HCV variability, the clinical success of HCV-targeted drugs will depend on their ability to suppress all viral variants as well as prevent the emergence of resistant viruses. Examination of these properties are limited in the absence of convenient animal model of HCV infection and limited possibilities studies

on HCV replicons. The NS3-4A serine protease and the NS5B RNA polymerase have emerged as popular target for antiviral intervention. Blockage of NS3 activity is expected to inhibit HCV replication by direct suppression of viral protein production and restoration of host responsiveness to IFN. The experience with synthetic agonists of Toll-like receptors 7 and 9 have begun to show their potential in controlling HCV infection. The new anti-HCV agents have progressed through early-phase clinical trials. Based on HCV infection history it seems that IFN will be the gold standard of the therapy and new agents probably will administer in combination with IFN.

## PIŚMIENNICTWO

1. Pawlotsky JM: Current and Future Concepts in hepatitis C Therapy. *Semin Liver Dis* 2005; 25 (1): 72-83.
2. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, i in. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 1998; 282: 103-107.
3. Goutagny N, Fatmi A, De Ledinghen V, i in. Evidence of viral replication in circulating dendritic cells during hepatitis C virus infection. *J Infect Dis* 2003; 187: 1951-1958.
4. Katze MG, He Y, Gale M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 675-687.
5. Gale M, Foy EM. Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature* 2005; 436: 939-945.
6. Zeuzem S, Benhamou Y, Shouval D, i in. Interim (week12) phase 2b virological efficacy and safety results of albumin interferon alpha-2b combined with ribavirin in genotype 1 chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl 2) ,S270: A733.
7. Gish RG, Arora S, Nelson D, i in. End of treatment (EOT) response in therapy-naïve patients treated for chronic hepatitis C with viramidine in combination with pegylated interferon alfa-2a. *Hepatology* 2004; 40 (Suppl 1): 338A.
8. O'Brien C, Godofsky E, Rodriguez-Torres M, i in. Randomized trial of valopicitabine (NM283), alone or with PEG-Interferon, vs. retreatment with PEG-Interferon plus ribavirin (PEGIFN/RBV) in hepatitis C patients with previous non-response to PEGIFN/RBV: first interim results. *Hepatology* 2005; 42: 234A (A#95).
9. Roberts S, Cooksley G, Shaw D, i in. Interim results of a multiple ascending dose study of R1626, a novel nucleoside analog targeting HCV polymerase in chronic HCV patients. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl 2) , S269: A731.
10. Malcolm BA, Liu R, Lahser S, i in. SCH 503034, a mechanism-based inhibitor of hepatitis C virus NS3 protease, suppresses polyprotein maturation and enhances the antiviral activity of alpha Interferon in replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50 (3): 1013-1020.
11. Lu L. Mutations conferring resistance to a potent hepatitis C virus serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 2260-2266.
12. Lin C, Lin K, Luong YP. In vitro resistance studies of hepatitis C virus serine protease inhibitors, VX-950 and BLIN 2061: structural analysis indicates different resistance mechanisms. *J Biol Chem* 2004; 279: 17508-17514.
13. Zeuzem S, Sarrazin C, Wagner F, i in. The HCV NS3 protease inhibitor SCH 503034 in combination with PEG-IFNalpha-2b in the treatment of HCV-1 PEG-IFN alfa-2b non-responders: antiviral activity and HCV variant analysis. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl 2) ,S35: A78.
14. Blatt LM. Novel potent inhibitors of the HCV NS3/4 protease. *Global Antiv J* 2005; 1 (suppl 2) 26.
15. Francesco R, Migliaccio G. Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C. *Nature* 2005; 436: 953-960.

16. McHutchison JG, Ghalib R, Lawitz E i in. Early viral response to CPG 10101, in combination with pegylated interferon and/or ribavirin, in chronic HCV genotype 1 infected patients with prior relapse response. *J Hepatol* 2006; 44 (Suppl 2): A730.
17. Puig M, Major ME, Mihalik K, i in. Immunization of chimpanzees with an envelope protein-based vaccine enhances specific humoral and cellular immune responses that delay hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2004; 22: 991-1000.
18. Nevens F, Roskams T, Van Vlierberghe H, i in. A pilot study of therapeutic vaccination with envelope protein E1 in 35 patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2003; 38: 1289-1296.

Otrzymano: 11.07.2006 r.

**Adres autora:**

Dr hab. med. Małgorzata Pawłowska, prof. UMK  
Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK  
ul. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz  
e-mail: kikchzak@cm.umk.pl