

Paulina Godzik, Marcin Komorowski, Joanna Cielecka-Kuszyk, Kazimierz Madaliński

INHIBITORY WIRUSA ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C – MOŻLIWOŚCI TERAPEUTYCZNE

INHIBITORS OF HEPATITIS C VIRUS - THERAPEUTIC POSSIBILITIES

Pracownia Immunopatologii Zakażeń Wirusami Hepatotropowymi Zakładu Wirusologii,
Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny, Warszawa

STRESZCZENIE

Poszukiwania nowych leków przeciw HCV idą w kierunku opracowania preparatów, które hamują translację lub blokują białka wirusowe, a nawet białka gospodarza uczestniczące w patogenezie zapalenia wywołanego przez HCV. Taką grupą związków są inhibitory proteazy serynowej NS3 (telaprevir, boceprevir, R7227, TMC435, SCH900518, GS9256). Najbardziej zaawansowane badania dotyczą telapreviru i bocepreviru; obecnie testuje się ich działanie w terapii kombinowanej z PegIFN- α i RBV, które weszły już w III fazę badań klinicznych (osiągnięto wysoką trwałą odpowiedź wirusologiczną (SVR) na poziomie 60-75%). Do tej grupy należą także inhibitory domeny NS5A, w tym PPI-461, który wykazuje aktywność przeciwwirusową i cytotoksyczną. Kolejnym rodzajem proleków są inhibitory helikazy NS3, np. peptyd p14 (IC₅₀ = 725 nM).

Trwają prace nad inhibitorami wnikania wirusa (ITX-5061), szczepionkami terapeutycznymi (IC-41, Civacir, TG-4040, CT-1011, GI-5005) oraz preparatami immunomodulującymi (ANA-773, IMO-3649, NOV-205) (17). Lekami działającymi na białka gospodarza są m.in. inhibitory cyklofiliny. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą preparatu DEBIO 025, z którym po zakończeniu badań I i II fazy, III fazę badań klinicznych rozpoczęto w lutym 2010.

Od 5 lat istnieje możliwość badania efektów tych związków w warunkach *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowej Huh-7 zakażonej HCV. Studia te pozwalają na ocenę efektywności i cytotoksyczności związków, a także oporności szczepów wirusa.

Słowa kluczowe: *inhibitory wirusa zapalenia wątroby typu C, terapia przeciwwirusowa, interferon α , swoiste antywirusowe terapie HCV*

ABSTRACT

The search for new drugs against HCV contains new ways to obtain pro-drugs which inhibit translation and block viral proteins, and inhibit host proteins important in HCV-induced pathogenesis. This group of agents are serine protease NS3 inhibitors (telaprevir, boceprevir, R-7227, TMC-435, SCH 900518, GS-9256). The most advanced studies are developed with telaprevir and boceprevir; at present their effect in combined therapy with PegIFN- α and RBV in the III clinical phase is tested. The sustained viral response (SVR) was achieved at the level of 60-75%. This group of agents contains also inhibitors of NS5A domain, e.g. PPI-461 which shows antiviral and cytotoxic activity. The following prodrugs are NS3 helicase inhibitors, e.g. p14 peptide, whose IC₅₀ equals 725nM.

Studies are continued on viral entry inhibitors (ITX-5061), therapeutic vaccines (IC-41, civaci, TG-4040, CT-1011, GI-5005) and immunomodulating preparations (ANA-773, IMO-3649, NOV-205). The agents acting on host proteins are a.o. cyclophilin inhibitors. The most advanced studies concern DEBIO 025 preparation which after phase I and II, underwent phase III of clinical studies in February 2010.

Since 5 years there is a possibility to investigate the effects of these compounds *in vitro* with the use of Huh-7 line infected with HCV. These investigations allow to estimate the antiviral effectiveness and cytotoxicity of agents, and resistance of viral strains.

Key words: *Inhibitors of hepatitis C virus, antiviral therapy, interferon α , specifically targeted antiviral therapies for HCV (STAT-C)*

POSZUKIWANIE NOWYCH LEKÓW O DZIAŁANIU PRZECIWWIRUSOWYM

Inhibitory proteazy serynowej. Proteaza serynowa wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) stanowi domenę NS3 wraz z kofaktorem NS4A. Leki hamujące jej aktywność przyczyniają się do blokowania podziału łańcucha poliproteiny HCV, uniemożliwiając tworzenie się funkcjonalnych białek wirusowych. Inhibitory mogą być związkami peptydowymi, niepeptydowymi i peptydomimetykami. W II fazie badań klinicznych są obecnie: SCH900518, TMC435, R-7227 i GS9256. Najbardziej zaawansowane prace dotyczą dwóch związków: telapreviru (VX-950) i bocepreviru (SCH-503034). Są one obecnie w III fazie badań klinicznych.

Telaprevir (VX-950), doustny selektywny inhibitor, wykazał w badaniach *in vitro* znaczną supresję wiremii HCV. Początkowo lek podawano w postaci monoterapii dwóm grupom pacjentów (z USA i Europy) przez 24 tygodnie. Stwierdzono, że powstaje wiele mutacji opornych na telaprevir. Powodował on również efekty uboczne w postaci: zaczerwienienia skóry, nudności i anemii (1). W II fazie badań przeprowadzonych w USA (PROVE-1) i Europie (PROVE-2) potwierdzono aktywność antywirusową telapreviru. Poziom SVR (trwała odpowiedź wirusologiczna, definiowana jako ustępowanie wiremii w ciągu 24 tygodni po zakończeniu leczenia u ok. 33-42% pacjentów zakażonych genotypem 1 oraz 80-90% zakażonych genotypem 2 lub 3), przy zastosowaniu telapreviru w terapii kombinowanej z pegylovanym interferonem- α (PegIFN- α) i rybawiryną (RBV), wyniósł 61-69% w stosunku do grupy kontrolnej, gdzie osiągnięto SVR na poziomie 46%. Terapia ta polegała na zastosowaniu przez pierwsze 12 tygodni trzech leków (PegIFN- α , RBV, VX-950), a następnie odpowiednio przez 12 lub 36 tygodni PegIFN- α i RBV. Badania II fazy przyniosły możliwość skrócenia czasu trwania terapii do 24 tygodni. Badania PROVE-2 potwierdziły istotną rolę RBV, której brak powodował większą częstość mutacji warunkujących oporność na telaprevir i nawrót replikacji HCV w trakcie leczenia. Skutki uboczne przy zastosowaniu VX-950 były częstsze i obejmowały wysypkę na skórze, bóle głowy, nudności i osłabienie (2, 3). Badania PROVE-3 objęły 453 pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na wcześniejsze leczenie standardowym schematem (PegIFN- α + RBV). SVR osiągnięto na poziomie 51% w stosunku do grupy kontrolnej: PegIFN- α i RBV na poziomie 14%. Poziom odpowiedzi był wyższy u pacjentów, którzy mieli wcześniejsze pogorszenie. Efekty uboczne były częstsze niż w grupie kontrolnej (15% vs. 4%) (4).

Podczas konferencji EASL (*European Association for the Study of the Liver*) w 2010 roku przedstawiono wyniki badań, których celem było ponowne przebadanie

pacjentów, którzy nie osiągnęli właściwego poziomu SVR w II fazie badań (w badaniach PROVE 1/2/3). Byli to pacjenci, u których było brak odpowiedzi (obniżenie wiremii < 1 log po 4 tygodniach leczenia lub < 2 log po 12 tygodniach) lub wykazali częściową odpowiedź (poziom RNA HCV ≥ 2 log po 12 tygodniach leczenia i wykrywalny po 24 tygodniach). W badaniach tych wzięli udział również ci pacjenci, u których doszło do ponownego pogorszenia po standardowej terapii PegIFN- α i RBV. Początkowo, wszyscy pacjenci otrzymywali telaprevir z PegIFN- α + RBV przez 12 tygodni. Po upływie tego czasu stosowano PegIFN- α + RBV przez kolejne 12 tygodni. Pacjenci, którzy po tym czasie nadal wykazywali obecność HCV RNA, otrzymywali PegIFN- α + RBV jeszcze przez 24 tygodnie. U pacjentów, u których doszło do pogorszenia po standardowej terapii, stwierdzono podczas tych badań wysoki poziom SVR (92%) po 24 tygodniach leczenia. Natomiast pacjenci, u których występowała częściowa odpowiedź, uzyskali SVR na poziomie 60%. Również wysoki poziom SVR (57%) był obserwowany u pacjentów po 48 tygodniach leczenia, u których początkowo nie było żadnej odpowiedzi (5).

W czerwcu 2010 roku firma 'Vertex' przedstawiła wyniki III fazy badań przeprowadzonych na 1095 pacjentach zakażonych genotypem 1 HCV. Osiągnięto SVR na poziomie 75% po 12 tygodniach stosowania telapreviru z PegIFN- α + RBV i następnie po 12 lub 36 tygodniach stosowania PegIFN- α + RBV. SVR na poziomie 69% uzyskano w przypadku stosowania telapreviru z PegIFN- α + RBV przez 8 tygodni i następnie PegIFN- α + RBV przez 16 lub 40 tygodni. W grupie kontrolnej (PegIFN- α + RBV przez 48 tygodni) osiągnięto SVR na poziomie 44% (6).

W badaniach *in vitro* nad boceprevirem (B, SCH-503034), uzyskano znaczny efekt terapeutyczny tego leku ($IC_{50}=0,3-0,4$ μ M, 50% inhibitory activity). W połączeniu z PegIFN- α (B+PegIFN- α) przyniósł znaczący efekt hamowania replikacji genotypu 1 HCV (zmniejszenia poziomu HCV RNA o >2 wartości log po 2 tygodniach stosowania) (7). Wyniki II fazy badań klinicznych zaprezentowano w 2009 roku na konferencji EASL (SPRINT-1). Początkowo stosowano leczenie standardową terapią obejmującą PegIFN- α i RBV przez 48 tygodni. Cztery tygodnie przed jej ukończeniem włączono boceprevir w dawce 800mg 3 razy dziennie, dzięki czemu udało się znacząco poprawić poziom SVR. Osiągnięto SVR na poziomie 75% w stosunku do standardowej terapii, gdzie uzyskano SVR na poziomie 38%. Dla terapii B + PegIFN- α + RBV stosowanej przez 48 tygodni uzyskano SVR na poziomie 67%. Objawy uboczne były podobne jak w przypadku standardowej terapii. Obejmowały wysypkę, zmęczenie, anemię, nudności i bóle głowy. Ponadto, leczenie boceprevirem było związane z częstszym występowaniem niedokrwistości

(50% w przypadku bocepreviru, 33% bez) oraz powodowało zmianę uczucia smaku (6, 8, 9). Obecnie trwają badania III fazy na pacjentach zakażonych genotypem 1 HCV (SPRINT-2) (10).

Podczas konferencji EASL w 2010 roku przedstawiono wyniki badań nad boceprevirem, których celem było sprawdzenie trwałej odpowiedzi wirusologicznej (SVR) po 3 latach od ukończenia terapii. Badania te przeprowadzono na 604 pacjentach, którzy otrzymywali boceprevir z PegIFN- α + RBV w II fazie badań. Trwała odpowiedź wirusologiczna po 3 latach utrzymała się na tym samym poziomie (48%) (11).

Inhibitory NS5A. NS5A jest białkiem niestrukturalnym, zawiera sekwencje IRES i umożliwia łączenie się z podjednostką 40S rybosomu tworząc kompleks replikacyjny. Funkcja ta umożliwia translację białek HCV. Zaletą inhibitorów tego białka jest to, że działają one już w pikomolarnych ilościach oraz działają na całą populację genotypów HCV (10). Obiecujące wyniki badania inhibitora NS5A uzyskano dla PPI-461. PPI-461 obecnie znajduje się w badaniach przedklinicznych. Bada się go w typowych systemach replikonów, opartych na genotypie 1a i 1b oraz w zmodyfikowanych replikonach (trzon HCV 1b zawierający wstawkę NS5A genotypów 2a, 3a, 4a, 5a, 6a i 7a). Toksyczność bada się *in vitro* oraz na szczurach i małpach. W badaniach tych uzyskano aktywność antywirusową (EC_{50}) dla PPI-461 na poziomie 0,2 i 0,01 nM, odpowiednio dla genotypu 1a i 1b. Dla innych genotypów wirusa otrzymano EC_{50} na poziomie 0,1-19 nM. Poziom cytotoksyczności komórkowej (CC_{50}) wyniósł >10 μ M dla kilku linii komórkowych. Lek ten wykazuje stabilność w mikrosomach wątroby i nie hamuje izoenzymu P450 przy stężeniu 10 μ M. Dobra jest również biodostępność u szczurów i małp. Stężenie w wątrobie oraz czas półtrwania w osoczu sugeruje, że PPI-461 może być podawany ludziom raz dziennie (12).

Inhibitory helikazy. Białko NS3 wirusa wykazuje również aktywność helikazową. Helikaza NS3 składa się z trzech domen (domeny 1-3). Są one konieczne do wiązania i rozwijania kwasu nukleinowego. Peptyd p14 (RRGRTGRGRRGIYR), którego sekwencja aminokwasowa odpowiada konserwowanemu motywowi domeny 2 helikazy, jest pierwszym inhibitorem (o bardzo niskim stężeniu hamującym 50% aktywności helikazy, IC_{50} , wynoszącym 725 nM), dla którego wykazano bezpośrednie oddziaływanie z helikazą oraz wykazano aktywność antywirusową (13).

Skojarzone stosowanie wyżej opisanych preparatów jest założeniem terapii przeciwwirusowej (STAT-C) skierowanej bezpośrednio na enzymy wirusowe HCV. Terapia ta pozwala na osiągnięcie lepszej skuteczności

leczenia, skrócenie terapii wirusowej, czy też zmniejszenie i ograniczenie efektów ubocznych.

Innym kierunkiem poszukiwań nowych leków i rozwiązań leczenia HCV może być opracowywanie preparatów, które interferują bezpośrednio z wirusowym RNA, hamują translację lub blokują białka wirusowe, a nawet białka gospodarza uczestniczące w patogenezie HCV. Trwają też prace nad inhibitorami wnikania wirusa (ITX5061), szczepionkami terapeutycznymi (IC41, Civacir, TG4040, CT-1011, GI-5005) oraz preparatami immunomodulującymi (ANA773, IMO-3649, NOV-205) (6).

Leki wpływające na białka gospodarza. Są to m.in. inhibitory cyklofiliny. Cyklofilina B jest kofaktorem NS5B, dlatego też wpływa na replikację HCV. Pierwszym inhibitorem cyklofiliny była cyklosporyna A. Nie jest ona jednak stosowana w terapii przeciwwirusowej ze względu na swoje właściwości immunosupresyjne. Obecnie bada się pochodne cyklosporyny A, które są pozbawione tej cechy: NIM811, DEBIO 025 i SCY-635. Najbardziej zaawansowane badania dotyczą DEBIO 025, który jest doustnie stosowanym inhibitorem. Ma on silne działanie przeciwwirusowe i nie wykazuje oporności krzyżowej w stosunku do mutantów indukowanych przez inhibitory proteazy lub polimerazy. Badania I fazy klinicznej były prowadzone na pacjentach zakażonych HCV i HIV. Podawano im przez 14 dni DEBIO 025 w dawce 1200mg 2 razy dziennie. Poziom wirerii wirusa obniżył się znacząco o 3,6 wartości log dla trzech genotypów HCV (1, 3 i 4) (14). Badania II fazy były oparte na terapii skojarzonej z PegIFN- α . Dziewięćdziesięciu pacjentom zakażonym genotypem 1 i 4 wirusa podawano lek w trzech dawkach (200, 600, 1000 mg/dzień) w terapii skojarzonej z PegIFN- α . W przypadku pacjentów zakażonych genotypami 1 i 4 wirusa osiągnięto redukcję HCV RNA odpowiednio o 4,6 i 4,8 wartości log. U pacjentów zakażonych genotypami 2 i 3 poziom HCV RNA po 4 tygodniach leczenia obniżył się odpowiednio o 5,9 i 5,9 wartości log. Efekty uboczne były porównywalne we wszystkich grupach pacjentów i obejmowały neutropenię związaną z przyjmowaniem PegIFN- α oraz przejściową hiperbilirubinemię w przypadku stosowania najwyższej dawki DEBIO 025 (1000 mg/dzień) (15). W fazie IIb badań, prowadzonej na 272 pacjentach zakażonych genotypem 1 wirusa, podaje się DEBIO 025 w dawce 60mg wraz z PegIFN- α i RBV. W lutym 2010 Novartis ogłosił rozpoczęcie III fazy badań klinicznych (6).

SCY-635 jest obecnie w Ib fazie badań. Podaje się go pacjentom zakażonym genotypem 1 wirusa w dawce 900mg/dzień przez 15 dni. Osiągnięto redukcję HCV RNA na poziomie 2,3 wartości log. Na konferencji EASL w 2010 roku przedstawiono wyniki badań,

w których potwierdzono, że dawka 900mg chroni przed powstaniem mutantów wirusa opornych na leczenie tym lekiem. Badanie oporności wykonywano po 15 i 22 dniach leczenia. Mutacje powstawały jedynie w regionie NS5B i wykryto dwa ich typy: I432V i S556G (16).

Leki immunomodulujące. IMO-2125 jest agonistą TLR9, indukującym wysoki poziom endogennego IFN- α i innych cytokin Th1. Badania I fazy nad tym terapeutycznym były prowadzone na 41 pacjentach zakażonych HCV, którzy nie odpowiedzieli na wcześniejsze leczenie PegIFN- α + RBV (redukcja RNA HCV poniżej 2 wartości log). IMO-2125 podawano raz dziennie w dawkach: 0,04; 0,08; 0,16; 0,32 mg/kg. Celem było osiągnięcie: bezpieczeństwa stosowania, indukcji odpowiedzi immunologicznej oraz odpowiedniego obniżenia poziomu RNA HCV. Wyniki tych badań wskazują, że IMO-2125 był najskuteczniejszy w dawkach większych niż 0,32 mg/kg/tydzień przez 4 tygodnie. Obserwowane objawy uboczne (objawy grypopodobne, świąd skóry, zmęczenie, bóle głowy, mięśni i stawów) miały wymiar łagodny i umiarkowany. Stwierdzono wzrost stężenia cytokin (chemokina IP-10, IFN- α , 2'5'-OAS) oraz redukcję RNA HCV o ≥ 1 wartości log (17).

Najnowszą technologią jest również stosowanie małych interferujących cząstek RNA – siRNA (*small interfering RNA*). Są to duplekty RNA (ok. 20 nukleotydów), które hybrydując z wybranymi sekwencjami RNA wirusowego hamują replikację HCV lub translację białek wirusowych (18).

Opisane powyżej przykłady nowych leków, których miejsca uchwytu w genomie HCV przedstawia rycina 1, świadczą o intensywnie prowadzonych badaniach. Mają one na celu udoskonalenie leczenia zakażeń HCV i są prowadzone w bardzo różnych kierunkach, obejmując dużą liczbę związków. Są również na różnych etapach zaawansowania.

Ważnym etapem oceny przydatności związku są badania prowadzone w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem różnych replikonów HCV. Pozwalają one na ocenę skuteczności, cytotoksyczności oraz oporności. Są również krokiem eliminującym większość potencjalnych leków. Przejście fazy przedklinicznej umożliwia dalsze badania w fazie klinicznej wymagające zaangażowania pacjentów.

METODY BADANIA SKUTECZNOŚCI POTENCJALNYCH LEKÓW

Badanie skuteczności nowych preparatów na eliminację HCV z organizmu gospodarza jest utrudnione ze względu na brak odpowiedniego modelu zwierzęcego. Jedynymi zwierzętami, u których dochodzi do zakażenia HCV są szympansy i myszy, którym wszczepiono ludzkie hepatocyty. Prowadzenie eksperymentów

na małpach wiąże się z jednej strony z bardzo dużymi kosztami, a z drugiej strony obarczone jest problemami etycznymi (19).

Od początku lat 90. prowadzone są badania nad stworzeniem wzorcowego modelu hodowli komórkowej, umożliwiającej namnażanie wirusa *in vitro*. Możliwość hodowli HCV na linii komórkowej pozwoliłaby na pogłębienie wiedzy na temat cyklu replikacyjnego wirusa, interakcji patogenu z komórkami oraz na sprawdzenie skuteczności potencjalnych związków antywirusowych. Ostatni aspekt badań jest niezwykle ważny, gdyż obecnie stosowana terapia przeciw HCV oparta na podawaniu PegIFN- α i RBV jest skuteczna jedynie u około 50-80% pacjentów, a ponadto prowadzi do wielu działań niepożądanych (20, 21).

W 1999 roku stworzono subgenomowy replikon HCV, który replikował się w linii Huh-7 (*hepatoma cell line*) (22). Konstruktor zawierał geny niestrukturalne HCV oraz gen *neo* (kodujący fosfotransferazynę neomycyny). Komórki transfekowane produktem transkrypcji *in vitro* konstrukt, uzyskiwały oporność na neomycynę, co świadczyło o replikacji sekwencji wirusowych (22). Subgenomowe replikony wykorzystywane są obecnie do poszukiwania nowych związków hamujących replikację HCV (23, 24).

W 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie o udanej próbie replikacji całego genomu HCV w linii komórkowej (25). Jako materiał genetyczny wirusa posłużyło RNA genotypu 2a (JFH1, ang. *Japanese fulminant hepatitis*) wyizolowane od japońskiego pacjenta z piorunującym zapaleniem wątroby. Przepisany na cDNA pełnej długości RNA został wklonowany w plazmid. Produkt przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji został transfekowany do linii Huh-7. Wyniki tego eksperymentu były zaskakujące. Już po 24 godzinach hodowli wykrywano w komórkach obecność pełnogenomowego JFH1, zaś po 72 godzinach w 70-80% komórek - obecność białka rdzeniowego oraz białek niestrukturalnych wirusa. Świadczyło to o zachodzeniu replikacji z wysoką częstotliwością w komórkach transfekowanych przy pomocy JFH1. W supernatancie pochodzonym znajdowane były, przy zastosowaniu technik mikroskopii elektronowej, cząstki wirusowe o średnicy około 55 nm, czyli nie odbiegające znacznie wielkością od cząstek HCV opisywanych w literaturze (26). Cząstki te były zakaźne zarówno w stosunku do naimnej linii Huh-7, jak i szympansov (19, 25).

Obecnie system hodowli *in vitro* HCV oparty na konstrukcie pJFH1 wykorzystywany jest do badania nowych leków przeciwwirusowych (23, 27). Pozwala to na ocenę skuteczności związku, poprzez ilościowe oznaczanie zmian HCV RNA w hodowli oraz na ocenę cytotoksyczności. Ogromną zaletą tego systemu w stosunku do dotychczas wykorzystywanego w badaniach subgenomowego replikonu HCV jest możliwość

wykrycia wpływu testowanych związków nie tylko na replikację wirusowego RNA, ale także na inne etapy cyklu życiowego wirusa, szczególnie wnikanie wirusa do komórek i tworzenie wirionów. System hodowli *in vitro* HCV oparty na konstrukcie pJFH1 pozostaje wciąż jedynym stabilnym układem, najbliższym badaniom na pierwotnych hodowlach hepatocytów zakażonych HCV, wyizolowanych od pacjentów, który można i należy zastosować do przetestowania potencjalnych leków anti-HCV przed rozpoczęciem badań toksykologicznych i testów klinicznych.

Podziękowanie. Praca została wykonana w ramach realizacji grantu MNiSW NN 405 132539 „Badanie potencjalnych leków przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C (HCV) w unikalnej hodowli wirusa”

PIŚMIENNICTWO

- Lin K, Perni R, Kwong A, i in. VX-950, a novel hepatitis C virus (HCV) NS3-4A protease inhibitor, exhibits potent antiviral activities in HCV replicon cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 1813–22.
- McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, i in. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1827–38.
- Hézode Ch, Foretier N, Dusheiko G, i in. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; 360: 1839–50.
- McHutchison JG, Manns MP, Muir AJ, i in. Telaprevir for previously treated chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2010; 362: 1292–303.
- Berg T, McHutchison JG, Adda N, i in. SVR with telaprevir, peginterferon alfa-2a and ribavirin in HCV patients with well-characterized prior null response, partial response, viral breakthrough or relapse after PR. *J Hepatol* 2010;52 (Suppl.1):S2 (Abstract 4)
- <http://www.hcvadvocate.org/hepatitis/hepC/HCVDrugs.html#STAT-C>
- Zeuzem S, Sarrazin C, Wagner F, i in. The HCV NS3 protease inhibitor SCH-503034 in combination with PEG-IFNa–2b in the treatment of HCV-1 PEG-IFNa–2b non-responders: antiviral activity and HCV variant analysis. *J Hepatol* 2006; 42 (Suppl 2): 35.
- Kwo P, Lawitz EJ, McCone J, i in. SPRINT-1: Boceprevir plus Peginterferon alfa-2b/Ribavirin for treatment of genotype 1 chronic hepatitis C in previously untreated patients. *Hepatology* 2008; 48(Suppl.1): 1027A(abstract LB16)
- Kwo P, Lawitz EJ, McCone J, i in. HCV SPRINT-1 final results: SVR 24 from a phase 2 study of boceprevir plus peginterferon™ (peginterferon alfa-2b)/ ribavirin in treatment-naïve subjects with genotype-1 chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2009; 50 (Suppl.1): S4 (Abstract4)
- Flisiak R, Parfieniuk A. Investigational drugs for hepatitis C. *Expert Opin. Investig. Drugs* (2010) 19(1): 63–75.
- Vierling JM, Ralston R, Lawitz EJ, i in. Long-term outcomes following combination treatment with boceprevir plus peg-intron/ribavirin (P/R) in patients with chronic hepatitis C, genotype-1 (CHC-G1) *J Hepatol* 2010; 52 (Suppl.1): S470–471 (Abstract 2016)
- Colonna R, Peng E, Bencsik M, i in. Identification and characterization of PPI-461, a potent and selective HCV NS5A inhibitor with activity against all HCV genotypes. *J Hepatol* 2010;52 (Suppl.1):S14–15 (Abstract 33)
- Gozdek A, Zhukov I, Polkowska A, i in. NS3 Peptide, a Novel Potent Hepatitis C Virus NS3 Helicase Inhibitor: Its Mechanism of Action and Antiviral Activity in the Replicon System *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008, p. 393–401.
- Flisiak R, Horban A, Galloway P, i in. The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and Human Immunodeficiency Virus. *Hepatology* 2008; 47: 817–826.
- Flisiak R, Feinman SV, Jablowski M, i in. The cyclophilin inhibitor Debio 025 combined with PEG IFN-2a significantly reduces viral load in treatment-naïve hepatitis C patients. *Hepatology* 2009; 49: 1460–1468.
- Hopkins S, Mosier S, Harris R, i in. Resistance selection following 15 days of monotherapy with SCY-635 a non-immunosuppressive cyclophilin inhibitor with potent anti-HCV activity. *J Hepatol* 2010;52 (Suppl.1):S15 (Abstract 34)
- Muir A, Ghalib R, Lawitz E, i in. A phase I, multi-center, randomized, placebo-controlled, dose-escalation study of IMO-2125, a TLR 9 agonist, in hepatitis C-nonresponders. *J Hepatol* 2010;52 (Suppl.1):S14 (Abstract 32)
- Zekri AR, Bahnassy AA, El-Din HM, i in. Consensus siRNA for inhibition of HCV genotype-4 replication. *Virology Journal* 2009, 6:13.
- Godzik P. System replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) *in vitro*. *Post Mikrobiol* 2009; 48: 207–212.
- Witthoft T, Möller B, Wiedmann KH, i in. Safety, tolerability and efficiency of peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German open safety trial. *J Viral Hepat* 2007; 14: 788–796.
- Zarębska-Michaluk D, Lebensztejn DM, Kryczka W. Skuteczność skojarzonego leczenia rekombinowanym interferonem alfa z rybawiryną chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i obecnością zespołów pozawątrobowych. *Przegl Epidemiol* 2007; 61: 551–558.
- Lohmann V, Korner F, Koch JO, i in. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285: 110–113.
- Murakami Y, Noguchi K, Yamagoe S, i in. Identification of bisindolylmaleimides and indolocarbazoles as inhibitors of HCV replication by tube-capture-RT-PCR. *Antiviral Res.* 2009; 83(2):112–7.
- Borawski J, Troke P, Puyang X, i in. Class III phosphatidylinositol 4-kinase alpha and beta are novel host factor regulators of hepatitis C virus replication. *J Virol.* 2009; 83(19): 10058–74.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, i in. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from cloned viral genome. *Nat Med* 2005; 11: 791–796.

26. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, i in. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205-209.
27. Cheng G, Zhong J, Chisari FV. Inhibition of dsRNA-induced signaling in hepatitis C virus-infected cells by NS3 protease-dependent and -independent mechanisms. *PNAS USA* 2006;103(22):8499-504.

Otrzymano: 29.07.2010 r.

Zaakceptowano do druku: 13.09.2010 r.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Kazimierz Madaliński
Zakład Wirusologii
Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy
Zakład Higieny
Ul. Chocimska 24
00-791 Warszawa
Tel.: 22 5421-326; 22 5421-337
e-mail: kmadalinski@pzh.gov.pl