

Dr. Schaff Zsuzsa

Semmelweis Egyetem, II. sz. Patológiai Intézete
Budapest

A máj patológiája

Az antivirális terápia új útjai a Hepatitis C vírus (HCV) replikáció újabb adatainak felhasználásával

A HCV jelenleg a 12. vezető halálok az USA-ban minden életkorban, és az 5. a 35-54 éves korcsoportban (Sherman et al. 2007). A HCV egyedül, vagy alkohollal együtt a májbetegségek kb kétharmadért felelős. Jelenleg, kb 120-180 millió HCV-vel krónikusan fertőzött ember él és kb 370 000 beteg hal meg HCV-fertőzésben évente.

A HCV fertőzés jelenlegi elfogadott terápiaja az IFN+ribavirin kezelés. A betegek kezelésre adott válasza azonban számos tényezőtől függ: vírus-függő és gazdaszervezet meghatározta faktortól. Bár a kezelés gerince változatlanul a PEG-IFN α + Ribavirin kezelés, számos új lehetőséggel próbálkoznak világszerte, kiemelve azt, hogy az előbbiekkal kombinációban kívánják adni az új szert, azaz nem monoterápiában. Az orvostudomány minden területen, kiemelten az onkológiában, a “célorientált” terápiára törekszik. Mindez akkor válik lehetővé, ha a kiváltó kóroki tényezőt, ill a betegség patomechanizmusát jobban megismerhetjük. Mindehhez hosszú és költséges preklinikai vizsgálatok szükségesek. Hasonló irányú törekvést láthatunk a hepatitis vírusok, kiemelten a HCV teápia újabb útjainak kutatásában is.

A HCV terápia legfontosbb “célirányú” tergetjei a következők (Pappas S.Ch. 2007.):

- immunmodulátorok, melyek a HCV immun választ stimulálják
- a HCV replikációjában szerepet játszó enzimek, pl a HCV polimeráz (RNS-dependens RNS polimeráz), proteáz inhibitorok (szerin proteáz, helikáz stb.)
- a vírus sejthez való kötődését gátlók (sejtfelszíni receptorgátlók)
- a vírus belépését, az “uncoating”-ot, a replikációs komplex képzését az összeépülést vagy a vírus kibocsájtást gátlók (Sherman et al. 2007.)

Az új terápiás lehetőségek megértéséhez néhány ismeretet célszerű feleleveníteni a HCV replikációra vonatkozóan:

A HCV elsősorban a hepatocytákban replikálódik, kb 4% csupán extrahepatikusan, elsősorban a lymphocytákban. A különösen magas replikációs szint (10^{10} - 10^{12} virion/nap) gyakori mutációhoz és genomikai variációkhoz vezet, egy betegen belül a quasispecies kialakulásához. Az egyes genotípusok jelentős eltérést mutatnak a vírus “master” szekvenciájától, ami a sajátos geográfiai típuseloszlás magyarázatát is adja (Pl. Hazánkban a HCV 1b, Egyiptomban a HCV 4-es genotípusa a leggyakoribb). Mindez jelentősen befolyásolja a gyógyszerfejlesztést, mivel a kötőhely valószínűleg genotípus specifikus és ez a terápia során a vírus “elszabadulásához” (“escape”) vezet (Sherman et al 2007). Mindez magyarázza a jelenleg elfogadott terápiák (PEG-IFN+ribavirin) genotípus specifikus adagolását (24-48 hetes kezelési ciklusok).

Az FDA Advisory Committee rámutatott arra, hogy mivel az **egy szert alkalmazó terápia a korai vírus mutáció veszélyét jelentheti, többféle támadáspontú szerek együttadása tűnik célszerűnek, különböző kombinációkban, genotípus és egyéni érzékenység, a terápiára adott válasz függvényében.** A monoterápia ugyanis korai, a rezisztencia szempontjából kulcsfontosságú mutációkhoz vezethet. A kombinált terápia ugyan a mellékhatások kombinálódásához is vezethet, ezért a preklinikai vizsgálatoknak, különös gondossággal, ez irányba is ki kell terjednie. Két vagy több szer együttes adása során a biztonságot és vírus kinetikát együtt kell tanulmányozni.

Jelenleg kb 30 szer áll az FDA vizsgálata alatt, melyek egy része kiesik, ill. kiesett a vizsgálat valamely fázisában. A fentiek alapján a következő hatásmódó szerek képezik a jelenlegi kutatások csoportjait:

1. Új immunmodulátorok:

McHutchinson és mtsai (2007) CPG 10101 (Actilon) néven (Coley Pharmaceutical Group Inc., Wellesley, MA) új típusú molekulát állítottak elő. A szer B sejt és plasmacytoid dendritikus sejt (pDC) Toll-like receptor 9 (TLR9) stimulációval fejti ki HCV antivirális hatását. A CPG 10101, mint "csupasz DNS" ("naked") szintetikus oligodezoxinukleotid TLR9 stimulációt eredményez a B és pDC sejteken, ami aktivált antivirális citokin produkcióhoz, beleértve az IFN α -t vezet, a szelektált T sejt aktiváció mellett.

A fenti szerzők 4 hétig kezeltek CH-C-ben szenvedő betegeket 7 különböző dózisú CPG 10101-gyel. Dózis függő citokin indukciót észleltek, beleértve az IFN α jelentősen emelkedett szintjét, a HCV-RNS dózis dependens szintcsökkenése mellett. Összeségében a hatás hasonló volt a pegilált INF monoterápia hatásával. A szert jól tolerálták a betegek. Ennek ellenére a szer további fejlesztését felfüggesztették. Miért?

Nem ez az egyetlen toll-like receptor agonista szer, melyet visszavontak, mivel a preklinikai toxikológiai vizsgálatok biztonsági kérdéseket vetettek fel (ANA975, 2007. Szept 24 sajtóközlemény)

Az IL-29 III-típusú IFN hatásos antivirális szer in vitro. Fázis 1 vizsgálatokat indítottak **PEG-IFN lambda (PEG-rIL-29)** egyszeri dózisával, melyet a betegek jól toleráltak. További vizsgálatok folyamatban vannak (Hausman et al. ZymoGenetics, Seattle 2007).

2. HCV Enzim inhibitorok

A HCV szerkezete jól ismert (poz-strand RNS vírus a Flaviviridae családból). A HCV genom egy poliproteint kódol, melyet enzimek 10 különböző részre vágnak (összefoglalónak l. Szabó et al. 2005). Ezen proteázok, elsősorban az NS3 proteáz és a NS5B RNS-dependens RNS polimeráz különösen fontos antivirális célpontok. Az u.n. HCV replikonok és a HCVcc sejtenyészeti model rendszerekkel a vírus replikáció egyes szakaszai igen jól tanulmányozhatók, különösen a vírus belépés és összeépülés folyamata. Ezen vizsgálatok bizonyították, hogy a lipidcseppek igen fontosak a virion morfogenezisében és az NS5A a vírus replikációs ciklusának kulcs regulátora (Bartenschlager 2007). A vírus egyes komponenseinek összeépülése a lipidcseppek felszínén történik, valamint a capsid protein akkumulálódik a lipidcsepp felszínén. A tradicionális, virális enzimek ellen kifejlesztett drogok gyakran gyorsan terápia rezisztens mutánsok kialakulásához vezetnek. Részben ezért is kutatnak újabb és újabb utakat, hogy megfelelő kombinációban ezen hatásokat kivédjék.

A közelmúltban további, eredetileg igen ígéretes, a HCV replikációban szerepet játszó enzimgátlókat vontak vissza, a várható mellékhatások miatt.

Így az **NM283 (Valopicitanine)** (Mayers D. Idenix Pharmaceuticals, USA, 2007)), egy orális HCV RNS **NS5B polimeráz inhibitor** esetében súlyos gastrointestinalis mellékhatások (hányinger, hányás, hasmenés) jelentkeztek, magasabb dózis esetén, folyamatos kezelés során. A szer monoterápiában 0,2-1,2 log-gal csökkentette a HCV RNS-t. Több vizsgálati sorban kombinálták PEG-IFN-nal és ribavirinnel, kedvező hatással. Az eredményeket és a mellékhatásokat összevetve, végül az FDA-val megegyezve megszüntették a szerrel kapcsolatos vizsgálatokat.

Egy másik NS5B polimeráz inhibitor a **HCV-796** májtoxicitást mutatott. Mindkét szer esetében a preklinikai tesztek és a korai klinikai alkalmazás nem mutatott "vészjeleket". Mindez arra utal, hogy rendkívül igényes és gondos vizsgálatok szükségesek új szerek bevezetése előtt.

Ugyancsak visszavonták az igen ígéretesnek indult **BILN 2061** (Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals) (Stoltz 2007) egy HCV **NS3/NS4A szerin proteáz inhibitor** fejlesztését. A szer potens, orális adagolású szerként indult, azonban sajnálatosan cardiotoxikusnak bizonyult, myocardialis vakuolizációhoz vezetett. A duzzadt mitochondriumok, azaz a MI károsodás mutatta morfológiailag a vakuolizációt. Egy rhesus majom elpusztult a korai biztonsági teszt szakaszban, szívelégtelenségben. A vizsgálat érdekessége, hogy csak a rhesus majmokban észlelhető a kezelés 3-14. napjától az enyhe fokális, a 28. napon már multifokális diffúz szívizomkárosodás, ami a túlélő állatok többségében 10 hét múlva megszűnt. Más tanulmányozott állatban (egér, patkány, tengerimalac stb) nem észleltek hasonló reakciót. Ezen vizsgálatok igen erősen ráirányítják a figyelmet arra, hogy az új szerek vizsgálata

során milyen elmélyült vizsgálatot kell végezni, mind kiterjedtségben (különböző állatfajok), mind mélységében (EM vizsgálata).

A **GS-9190** (Oldach D. Gilead Sciences, Inc, USA 2007) új nem- nukleozid HCV **NS5B polimeráz inhibitor**, potens in vitro antivirális hatással. Meglepő, különösen a BILN 2061 megdöbbentő visszavonását és cardiotoxicitását hallva, hogy a szert randomizált, kettős-vak, placebo kontrollált trial-ban próbálják: (safety/tolerability, pharmacokinetics and antiviral activity) CH-C, genotype 1 cirrhosis mentes betegeken. A betegek 18-60 évesek, még nem kezeltek (naivak). 31 beteget vontak be az "A" szakaszba (HCV 1a/1b). A beszámolók szerint a kezelést jól tolerálták, enyhe fejfájás jelentkezett csupán. Dózis dependens antivirális hatást tapasztaltak. Az egyszeri dózist jól tolerálták. A "multiple dose phase" jelenleg zajlik.

A **Telaprevir (VX-950)** (McNair L., Vertex Pharmaceuticals, USA, 2007) orális, igen szelektív peptidomimetic inhibitor, HCV NS3-4A proteáz gátló. Korai vizsgálatokban PEG-IFN α 2a-val adták 14 napig és PEG-IFN és ribavirinnel 28 napig. Most fázis 2 programban van a szer, elsősorban naiv, 1-es genotípusú CH-C-t kezelnek.

További, egyelőre még állatkísérleti modellekben (csimpánzok) alkalmazott direkt antivirális szerekről is beszámoltak. Így az **MK-0608** (HCV RNS polimeráz nukleozid analóg inhibitora), a **NS3/4A proteáz macrocyclikus** inhibitora és ezek együttes hatása eredményesnek bizonyult, ugyanis jelentősen csökkentették a vírus mennyiségét (Olsen et al. Merck Re Lab 2007).

Az **R7128 cytidin nucleozid** analóg polimeráz inhibitor (Hutchison et al. Duke Clin Res. 2007), melyet már önkénteseken kipróbáltak HCV 1 genotípusú fertőzésben. Az **R1479 prodrug**, a HCV RNS polimeráz potens inhibitora (Nelson et al., Univ.Florida, 2007). Együttadva PEG-IFN α -val és ribavirinnel szinergikus antivirális hatást figyeltek meg.

3. Sejtfelszíni receptor gátlók

A replicon rendszer (autonom replikáló RNS: szubgenomikus és genomikus hosszúságú) jó lehetőséget ad a HCV enzim gátlók hatásának tanulmányozására. A vírus sejtbe való belépését, az összeépülés későbbi szakaszait, a vírus sejtből való kijutását azonban ezen modell-rendszerrel nem lehet nyomonkövetni. Erre a közelmúltban alkalmazott sejtenyészeti-fertőző vírus rendszerek alkalmasak (PI: JFH-1, H77S stb.).

A potenciális targetek közül a különböző **HCV receptorok** (HCV-R) tűnnek különösen fontosnak. A vírus célsejtbe való szelektív kötődése a vírus kódolt glikoproteinek és specifikus sejtfelszíni receptorok (HCV-R) kötődésén keresztül történik, tehát nagyrészt ezek felelősek a vírus "tropizmusáért". A jelenleg ismertek ezek közül a **CD81** tetraspannin (Pileri et al. Science 1998), a scavenger receptor class B member I (**SR-BI**) (Scarselli et al. EMBO 2002), a tight junction (TJ) protein, **claudin 1** (Evans et al. Nature 2007). Néhány egyéb molekula, így egyes glycosaminoglycanok és low density lipoprotein receptorok szerepe ugyancsak felvetődött, különösen a vírus sejtbe való belépésében. Mutagenézis és antitest blokkolási tanulmányok bizonyítják, hogy a **claudin1** első extracelluláris hurka kapcsolódik a HCV-hez, ami arra utal, hogy alapvető fontosságú a HCV sejtbe való bejutása szempontjából.

Ennek alapján felvetették (Evans et al.2007), hogy esetleges claudin 1 (és más HCV-R) blokkolók ugyancsak antivirális hatásúak lehetnek. Ez különösen fontos lehet a transzplantációt követő időszakban, a graft reinfekciójának elkerülésére.

A CD81 és SR-BI a HCV E2-vel lép kapcsolatba. Ez megfelelő antitestekkel blokkolható, tehát ugyancsak lehetséges "targetként" kezelendő.

4. Egyéb hatásmódú szerek

A **Cyclophilin inhibitorok** ugyancsak felvetődtek, mint lehetséges új anti-HCV hatású szerek (Crabbé, Debiopharm, Switzerland, 2007). Ennek alapja, hogy a szerzők szerint a Cyclophilin B (CYPB), mely számos cellularis protein foldingban és izomerizációban játszik szerepet, úgy tűnik, hogy involvált a HCV replikációban is. A CYPB a HCV RNS dependens RNS polimeráz pozitív

modulátora a replikációs komplexben. A CypB mint az NS5B RNS-dependens RNS polimeráz funkcionális regulátoraként hat. Így felvetődött, hogy a Cyclosporin A és egyéb cyclophilin inhibitor gátolhatja a CypB hatását, így a vírus replikációt. A rendszer, ill. a hatás azonban még számos kérdésben tisztázatlan és kísérleti stádiumban van.

Felvetődött egyes immunosuppresszív hatással nem rendelkező **CyclosporinA derivátumok**, anti-HCV hatása. Ezen szerek, így az NIM811, Debio 025 és a SCY-635 ígéretesnek tűnnek. Ezek közül egyedül a **Debio 025**-re vonatkozóan vannak beteg-adatok. HIV és HCV koinfekció esetén, kompenzált májbetegségben adagolva, 14 nap alatt 3,6 log₁₀-zel csökkentette a vírus load-ot. (Crabbé 2007).

A HCV p7 protein, a "viroporin" (vírus kódolt ioncsatorna) jelentős a HCV belépésben és/vagy a virion összeépülésében. A Biotron LTB (Cambera, Australia) 300 feletti antivirális szert állított elő, köztük a **BT225 p7** ioncsatorna hatását gátló szert. In vitro ingazolták, hogy IFN α +ribavirin-nel együtt hatásosan gátolja a HCV replikációt. Fázis Ib vizsgálatokat terveznek CH-C-ben szenvedő betegekben.

A közelmúltban egy igen szokatlan, másrésről igen "egyszerűnek" tűnő terápiáról számoltak be japán kutatók (Fujiwara et al. Hepatology Res. 2007), a **kettős filtrációs plasmapheresis** és IFN kombinációjának alkalmazásáról CH-C genotype 1-ben, magas vírus szám esetében alkalmazva. A módszer, melyet **V-RAD**-nak neveztek el (**V**irus **R**emoval and **E**radication by **D**FPF) megfelelő berendezéssel "átszűri" a vért, eltávolítva a HCV részecskék jelentős részét. Az utána alkalmazott IFN terápia sokkal hatásosabbnak bizonyult.

Irodalom:

Sherman, K., Fleischer R., Laessing K., Murry J., Tauber W., Birnkrant, D: Development of novel agents for the treatment of chronic hepatitis C infection: Summary of the FDA antiviral products advisory committee recommendations. Hepatology 46: 2014-2020, 2007.

Pappas, S.Ch.: Good science behind hepatitis C virus antiviral drug development: Necessary but not sufficient. Hepatology 46: 1317-1319, 2007.

Mc Hutchinson J.J., Bacon B.R., Gordon, S.C. et al: A phase 1B, randomized, double-blind, dose escalation trial of CPG 10101 in patients with chronic hepatitis C virus. Hepatology 46: DOT 10.1002/hep.21773, 2007.

Szabó E., Lotz G., Páska Cs., Kiss A., Schaff Zs: Viral hepatitis: New data on hepatitis C infection. POR 9:215-221 2003.

Bartenschlager, R.: New insights into the HCV replication cycle: Lessons learned from novel culture systems. Global Antiviral Journal, 3: Suppl.2. (HepDart 2007) abstr04, p8. 2007.

Pietropaolo K., Belanger B., Zhou X., Fielman B., Olek E., Leone J., Mayers D: Development of an HCV nucleoside polymerase inhibitor. HepDart 2007 Satellite Symposium. Toward Curative Therapies for Hepatitis C. P11.

Stoltz J.H., Stern, J.O: A 28-day mechanistic safety study in rhesus monkeys on hepatitis C virus protease inhibitor BILN 2061: Lessons learned. HepDart 2007 Satellite Symposium. Toward Curative Therapies for Hepatitis C. P7.

Bavisotto, L., Wang C., Jacobson, I. et al: Antiviral, pharmacokinetic and safety data for GS-9190, a non-nucleoside HCV NS5b polymerase inhibitor, in a phase-1 trial in HCV genotype 1 infected subjects. HepDart 2007 Satellite Symposium. P9-10.

McNair, L.: Specifically targeted therapies for HCV (STAT-C): An update on Telaprevir. HepDart 2007 Satellite Symposium, p13.

Olsen, D.B., Handt, L., Koeplinger, K., Ludmerer S. Et al: A combination of direct antiviral compounds can achieve sustained viral response in hepatitis C virus-infected chimpanzees. Global Antiviral Journal 3: Suppl2, (HepDart 2007) abstr 60, p65, 2007.

Nelson, D., Pockros, P.J., Godofsky, E., Rodriguez-Torres, M. Et al: R1626 demonstrates synergistic antiviral effect in combination with Peginterferon alfa-2a (40KD), with or without Ribavirin, and high barrier resistance development. Global Antiviral Journal 3: Suppl2, (HepDart 2007) abstr 62, p66, 2007.

Pileri P., Uematsi Y., Compagnoli S., Galli G. Et al: Binding of hepatitis C virus to CD81. Science 282:938-941, 1998.

Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M. et al: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for hepatitis C virus. EMBO J. 21:5017-5025, 2002.

Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne D.M., Syder A.J. et al: Caludin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. Nature 446:801-805, 2007.

Crabbé R.: The role of Cyclophilins and Cyclophilin inhibitors in the replication of HCV.

Luscombe, C.A., Huang, Z., Murray M., Miller M., Ewart G: A novel anti-viral compound BIT225, inhibits Bovine Diarrhea Virus (BVDV) in vitro, and has synergistic antiviral activity in combination with recombinant interferon alpha-2b (rIFNa-2b) and Ribavirin.

Hausman D.F., Freeman J.A., Souza S.M., Nestorov J.A., Zhang T: A phase 1, randomized, blinded, placebo-controlled, single-dose, dose-escalation study of PEG-Interferon lambda (PEG-rIL-29) in healthy subjects. Global Antiviral Journal 3: Suppl2, (HepDart 2007) abstr 67, p71, 2007.

Fujiwara K., Kaneko S., Kakumu S., Sata M. Et al: Double filtration plasmapheresis and interferon combination therapy for chronic hepatitis C patients with genotype 1 and high viral load. Hepatology Res 37:701-710, 2007.