

Povijesni razvoj terapije za hepatitis C

Cesarec, Laura

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:624261>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-13**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Laura Cesarec

Povijesni razvoj terapije za hepatitis C

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Farmakologija Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Zavodu za farmakologiju pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Lidije Bach-Rojecky.

SADRŽAJ

| | |
|--|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Otkriće virusa hepatitisa | 1 |
| 1.2. Otkriće virusa hepatitisa C (HCV)..... | 2 |
| 1.3. Virusni hepatitisi..... | 3 |
| 1.4. Struktura virusa hepatitisa C..... | 5 |
| 1.5. Životni ciklus virusa hepatitisa C | 8 |
| 1.6. Epidemiologija hepatitisa C..... | 10 |
| 1.7. Patofiziologija hepatitisa C..... | 11 |
| 1.8. Klinička slika hepatitisa C | 11 |
| 1.9. Dijagnostika hepatitisa C | 12 |
| 2. OBRAZLOŽENJE TEME | 14 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 15 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 16 |
| 4.1. Interferon alfa-2b | 16 |
| 4.2. Kombinacija interferona alfa-2b i ribavirina | 20 |
| 4.3. Kombinacija pegiliranog interferona alfa i ribavirina | 24 |
| 4.4. Prvi izravni antivirusici | 25 |
| 4.4.1. Boceprevir..... | 28 |
| 4.4.2. Telaprevir..... | 30 |
| 4.5. Razvoj DAA terapije..... | 32 |
| 4.5.1. Novi inhibitori NS3/4A proteaze | 33 |
| 4.5.2. Inhibitori NS5B RNA ovisne RNA polimeraze..... | 38 |
| 4.5.3. Inhibitori NS5A proteina | 40 |
| 4.6. Terapija danas | 44 |
| 4.7. Terapija sutra | 46 |
| 5. ZAKLJUČCI..... | 48 |
| 6. LITERATURA | 49 |
| 7. SAŽETAK/SUMMARY..... | 54 |
| 7.1. Sažetak | 54 |
| 7.2. Summary..... | 55 |
| 8. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD | |

1. UVOD

Hepatitis se definira kao upalna bolest tkiva jetre bilo koje vrste. Manifestira se kao akutni hepatitis i kao kronični hepatitis. Hepatitis koji traje dulje od šest mjeseci smatra se kroničnim. S obzirom na kliničke i histološke manifestacije, hepatitis varira od blažeg do ozbiljnijeg oblika kod kojeg može doći do razvoja fibroze i ciroze jetre te hepatocelularnog karcinoma (Razavi, 2020).

Uzroci hepatitisa različiti su, a mogu se podijeliti na neinfektivne i infektivne. Hepatitis uzrokovan neinfektivnim uzročnicima dijeli se na metabolički (genetski), autoimuni, alkoholni i toksični hepatitis (uzrokovan određenim hepatotoksičnim kemikalijama, lijekovima, drogama i dodacima prehrani). Infektivni su uzročnici virusni – virusi hepatitisa, citomegalovirus i Epstein-Barr virus, ali i neki drugi virusi kod imunokompromitiranih osoba, kao što su herpes simplex virusi i adenovirusi (Clemente i Schwarz, 2011).

1.1. Otkriće virusa hepatitisa

Prvi opisi hepatitisa datiraju još od vremena Sumerana (3. tis. pr. Kr.) koji su uzročnikom hepatitisa smatrali demona Ahhazua koji je napadao jetru (jetra se tada smatrala domom duše). Slijede razni opisi Hipokrata, Grka, Rimljana i srednjovjekovnih učenjaka. Od 18. stoljeća javljaju se mnoge epidemije hepatitisa tijekom ratnih pohoda (Napoleonove invazije, Američki građanski rat, Drugi svjetski rat). Prvo značajnije otkriće donio je A. Lürman 1885. godine. On je proučavao epidemiju na bremenskom brodogradilištu i utvrdio da sve zaražene povezuje jedna stvar – cjepivo protiv velikih boginja koje su primili. Zaključio je da je izvor infekcije ljudska limfa kojom je cjepivo bilo kontaminirano. Kasnije su uočeni slični scenariji – epidemija hepatitisa nakon primjene injekcija arsena za terapiju sifilisa, injekcija bizmuta i soli zlata te cjepiva protiv žute groznice. Svi su ti scenariji predstavljali dokaze za teoriju da se hepatitis prenosi parenteralnim putem. F. O. MacCallum 1947. godine govori o postojanju dva oblika hepatitisa – hepatitis s kratkim periodom inkubacije (kasnije hepatitis A) i hepatitis s dugim periodom inkubacije (kasnije hepatitis B). U narednim godinama provode se brojna istraživanja koja potvrđuju postojanje ova dva oblika, a konačna potvrda stiže 1967. godine nakon provođenja istraživanja u njujorškoj školi za djecu s intelektualnim invaliditetom. U narednim se godinama virus hepatitisa A (HAV) i virus hepatitisa B (HBV) dalje proučavaju te se otkrivaju i definiraju njihovi antigeni (HBV antigen konačno definiran 1970. godine te

HAV antigen konačno definiran 1979. godine). U međuvremenu, 1977. godine, otkriven je i virus hepatitisa D (HDV) tj. njegov antigen prisutan kod osoba inficiranih hepatitisom B. Studije o velikim epidemijama hepatitisa u Indiji i Kini ukazivale su na postojanje još jednog hepatitis virusa koji je imenovan kao virus hepatitisa E (HEV), a njegov je antigen definiran 1983. godine (Trepo, 2014).

1.2. Otkriće virusa hepatitisa C (HCV)

H. J. Alter i suradnici s američkog Nacionalnog instituta za zdravlje (engl. National Institute of Health, NIH) 1975. godine istraživali su slučajeve hepatitisa povezanog s transfuzijom. Za osam od dvanaest slučajeva utvrđeno je da se uzročnik serološki ne podudara s ostalim do tada poznatim virusima koji uzrokuju hepatitis (HAV, HBV, citomegalovirus i Epstein-Barr virus). Virus je privremeno imenovan non-A non-B (NANBH). Nakon toga provode se istraživanja na čimpanzama. Alter i suradnici 1979. godine proučavali su hepatocite čimpanza zaraženih NANBH-om. Uočili su dva tipa promjena u morfologiji stanice – pojava čestica koje formiraju cjevčice kod jedne grupe čimpanza te pojava čestica koje formiraju agregate u jezgri kod druge grupe čimpanza. Slijede godine proučavanja tih infektivnih čestica i opisivanja njihovih fizikalno-kemijskih svojstava kao i epidemioloških karakteristika same bolesti. Usprkos tome, dugo vremena nije došlo do potpune identifikacije NANBH virusa (Khuroo i Sofi, 2020). Napokon, 1989. godine, Houghton i suradnici otkrili su virusni antigen te su uspješno klonirali i sekvencirali virus. Nazvali su ga virosom hepatitisa C (Basyte-Bacevice i Kupcinskas, 2020). Kasnije, 1997. godine, Rice i suradnici napravili su prvi infektivni virusni klon koji se koristio za daljnja istraživanja na čimpanzama (Hu i sur., 2020).

Dobitnici Nobelove nagrade za fiziologiju i medicinu 2020. godine bili su Harvey James Alter (1935., SAD), Michael Houghton (1949., Ujedinjeno Kraljevstvo) i Charles Moen Rice (1952., SAD). Nagrada im je dodijeljena zbog njihovih značajnih doprinosa u otkriću i opisivanju virusa hepatitisa C (Hu i sur., 2020).

1.3. Virusni hepatitis

Virusi hepatitis heterogena su skupina virusa. Kod čovjeka je do sada poznato 5 tipova virusa – virus hepatitisa A (HAV), virus hepatitisa B (HBV), virus hepatitisa C (HCV), virus hepatitisa D (HDV) i virus hepatitisa E (HEV). Njihove najvažnije karakteristike prikazane su u Tablici 1., Tablici 2. i Tablici 3.

Tablica 1. Najvažnije karakteristike HAV i HBV (Thuener, 2017)

| | HAV | HBV |
|--------------------|---|---|
| Rod, porodica | Hepatovirus, Picornaviridae | Orthohepadnavirus, Hepadnaviridae |
| Genom | RNA | ds DNA |
| Ovojnica | ne | da |
| Put prijenosa | fekalno-oralni prijenos | parenteralni prijenos, spolni prijenos, prijenos s majke na dijete prilikom poroda |
| Period inkubacije | 15-50 dana | 45-180 dana |
| Akutna infekcija | da | da |
| Kronična infekcija | ne | da |
| Stopa smrtnosti | niska | niska ukoliko se bolest liječi (inače visoka zbog razvoja ciroze i/ili hepatocelularnog karcinoma kod kroničnog hepatitisa B) |
| Cjepivo | da | da |
| Terapija | suportivna (za mučninu, povraćanje i dehidraciju, analgetici) | peginterferon alfa-2a, inhibitori reverzne transkriptaze (lamivudin, telbivudin, entekavir, adefovir dipivoksil, tenofovir dizoproksil) |
| Ostalo | - | cjepivo protiv HBV smatra se prvim indirektnim cjepivom protiv raka (neliječeni HBV dovodi do hepatocelularnog karcinoma) |

Tablica 2. Najvažnije karakteristike HCV i HDV (Nawaz i sur., 2015) (Botelho-Souza i sur., 2017)

| | HCV | HDV |
|--------------------|---|--|
| Rod, porodica | Hepacivirus, Flaviviridae | Deltavirus, Incertae sedis ¹ |
| Genom | RNA | RNA |
| Ovojnica | da | da |
| Put prijenosa | parenteralni prijenos | parenteralni prijenos |
| Period inkubacije | 6-8 tjedana | koinfekcija: 45-180 dana superinfekcija: 2-8 tjedana |
| Akutna infekcija | da | da |
| Kronična infekcija | da | da |
| Stopa smrtnosti | niska ukoliko se bolest liječi (inače visoka zbog razvoja ciroze i/ili hepatocelularnog karcinoma kod kroničnog hepatitisa C) | niska ukoliko se bolest liječi (inače visoka zbog razvoja ciroze i/ili hepatocelularnog karcinoma kod kroničnog hepatitisa B i D) |
| Cjepivo | ne | ne |
| Terapija | objašnjeno u poglavlju 4 (rezultati i rasprava) | peginterferon alfa-2a (nije u potpunosti djelotvoran) |
| Ostalo | - | potreban mu je HBV za replikaciju i javlja se samo kod osoba zaraženih hepatitisom B (koinfekcija istovremeno s hepatitisom B ili superinfekcija kod osoba kronično zaraženih hepatitisom B) |

¹ Nesiguran položaj (neodređena taksonomska porodica)

Tablica 3. Najvažnije karakteristike HEV (Kamar i sur., 2017)

| | HEV |
|--------------------|---|
| Rod, porodica | Orthohepevirus, Hepeviridae |
| Genom | RNA |
| Ovojnica | ne |
| Put prijenosa | fekalno-oralni prijenos |
| Period inkubacije | 2-10 tjedana |
| Akutna infekcija | da |
| Kronična infekcija | ne |
| Stopa smrtnosti | niska (visoka kod trudnica) |
| Cjepivo | da (Kina) |
| Terapija | suportivna (za mučninu, povraćanje i dehidraciju, analgetici) |

1.4. Struktura virusa hepatitisa C

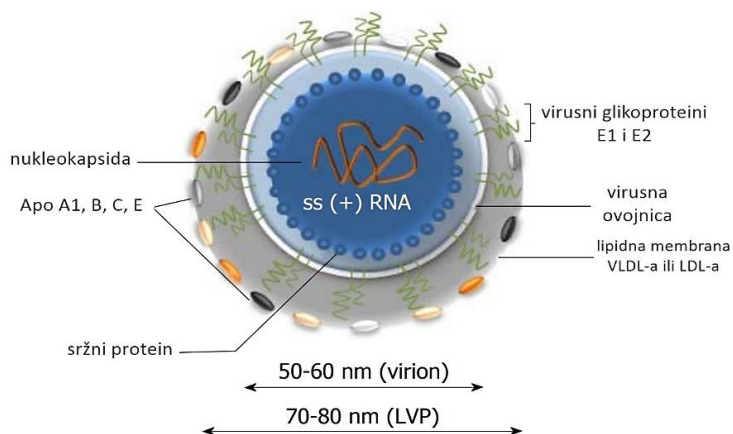
Virus hepatitisa C mali je ikozaedralni +ssRNA² virus obavijen ovojnicom. Taksonomski se smješta u rod Hepacivirus porodice Flaviviridae. Genom mu se sastoji od približno 9.6 kb. Otvoreni okvir čitanja³ u endoplazmatskom se retikulumu translacija u jedan poliproteinski prekursor dug 3010-3033 aminokiselina. Taj se poliproteinski prekursor pomoću staničnih i virusnih proteaza procesira u deset funkcionalnih proteina. Tri su strukturalna proteina – sržni protein te proteini E1 i E2. Ostalih je sedam proteina nestrukturalno – p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B. Oni su važni za morfogenezu, replikaciju i regulaciju virusne čestice. Otkriven je i jedanaesti protein – F protein. U Tablici 4. prikazane su osnovne uloge pojedinih virusnih proteina. Iz prikazanog može se vidjeti kako nijedan protein nema samo jednu ulogu, već su svi oni multifunkcionalni te da neke uloge nisu u potpunosti razjašnjene.

Velik broj virusnih čestica udružen je, preko proteina E1 i E2, sa staničnim lipoproteinima (uglavnom s LDL-om i VLDL-om te apolipoproteinima A1, B, C i E) te se takve tvorevine nazivaju lipovirusne čestice (prikazano na Slici 1.).

Postoji 7 genotipova HCV-a koje karakteriziraju različita geografska distribucija, različite kliničke manifestacije i različiti dominantni putevi prijenosa (Morozov i Lagaye, 2018).

² pozitivno smisljena jednolančana RNA je virusna RNA koja se može direktno translirati u virusne proteine

³ open reading frame (ORF) je dio genoma koji se translira



Slika 1. Model lipovirusne čestice hepatitis C virusa (preuzeto i prilagođeno prema Morozov i Lagaye, 2018)

Tablica 4. Osnovne uloge pojedinih proteina HCV (Morozov i Lagaye, 2018)

| Protein | Uloge |
|------------------------|--|
| Sržni protein (p22) | <ul style="list-style-type: none"> • strukturni protein (formiranje nukleokapside) • regulatorna funkcija tijekom translacije <ul style="list-style-type: none"> • regulacija signalnih puteva • potencijalna uloga u apoptozi, metabolizmu lipida (uloga u razvoju steatoze⁴), regulaciji Ca²⁺ i razvoju hepatocelularnog karcinoma (HCC) |
| E1 (gp35) | <ul style="list-style-type: none"> • transmembranski glikoprotein ovojnice (strukturni protein) |
| E2 (gp70) | <ul style="list-style-type: none"> • transmembranski glikoprotein ovojnice (strukturni protein) • E1-E2 heterodimeri tvore šiljkaste tvorevine na površini virusa <ul style="list-style-type: none"> • E1-E2 kompleks važan je za interakciju sa staničnim receptorima i fuziju virusa • E1-E2 glikanski „štit“ ograničava pristup antitijela virusu (kao i udruživanje s lipoproteinima) • kodiraju ga dvije hipervarijabilne genomske regije vrlo podložne mutacijama → potencijalna uloga u izbjegavanju imunskog odgovora organizma i razvoju kronične infekcije |

⁴ steatoza ili masna jetra posljedica je nakupljanja masti u jetri

| | |
|------------|---|
| NS1 (p7) | <ul style="list-style-type: none"> • može formirati ionski kanal (viroporin) koji igra ulogu u infekciji – prevenira zakiseljavanje staničnih organela te tako štiti novonastale virione od preranih konformacijskih promjena induciranih kiselinom <ul style="list-style-type: none"> • uloga u sklapanju i otpuštanju virusnih čestica • potencijalna meta antivirusnih lijekova • detektiran je i E2-p7-NS2 prekursor koji vjerojatno ima ulogu u kinetici infekcije |
| NS2 (p23) | <ul style="list-style-type: none"> • sastavni dio NS2/3 cisteinske proteaze važne za infektivnost virusa – proteoliza između NS2 i NS3 • potencijalna uloga u regulaciji transkripcije sintaze masnih kiselina (uloga u razvoju steatoze) i u angažmanu proteina tijekom sklapanja i otpuštanja virusnih čestica |
| NS3 (p70) | <ul style="list-style-type: none"> • C-terminalni dio ima aktivnost helikaze i ATPaze – remodeliranje RNA tijekom replikacije • N-terminalni dio ima aktivnost serinske proteaze (NS3/4A proteaza) i NTPaze – proteoliza NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A i NS5A/5B spojeva te nekih staničnih proteina koji su važni za urođenu imunost (npr. MAVS protein koji je važan za aktivaciju NF-κB⁵ i interferona tipa 1) • NS3/4A proteaza također ima ulogu u interferenciji sa stečenom imunosti i u infektivnosti samog virusa |
| NS4A (p8) | <ul style="list-style-type: none"> • kofaktor nužan za aktivnost NS3 (NS3/4A) proteaze • utjecaj na neke stanične funkcije – pridonosi patogenezi virusa • detektiran je i u mitohondriju (ne samo u endoplazmatskom retikulumu) – mijenja distribuciju mitohondrija i uzrokuje štetu koja dovodi do apoptoze stanica domaćina |
| NS4B (p27) | <ul style="list-style-type: none"> • važan za regrutaciju ostalih nestrukturnih proteina tijekom replikacije <ul style="list-style-type: none"> • uloga u sklapanju i otpuštanju virusnih čestica |

⁵ nuklearni faktor kappa B

| | |
|--|--|
| NS5A (p56/p58) | <ul style="list-style-type: none"> doprinosi replikaciji, razmnožavanju i patogenezu virusa, modulaciji staničnih signalnih puteva (uključujući one za apoptozu) i interferonskom odgovoru sadrži regiju koja određuje osjetljivost na interferon α – koristi se za predviđanje uspješnosti interferonske terapije |
| NS5B (p66-68) | <ul style="list-style-type: none"> RNA-ovisna RNA polimeraza – sintetizira negativno smisleni RNA lanac⁶ i sklona je pogreškama (mutacije virusa) |
| F protein (<i>frameshit protein</i>) ili ARFP (<i>alternate reading frame protein</i>) | <ul style="list-style-type: none"> kratko živući citoplazmatski protein nerazjašnjene uloge vrlo vjerojatno ima ulogu u modulaciji funkcije dendritičkih stanica i stimulaciji odgovora T-stanica postoje njegove različite forme ovisno o genotipu virusa |

1.5. Životni ciklus virusa hepatitisa C

Za uspješno vezanje i ulazak virusa u stanicu domaćina potrebno je barem šest membranskih proteina. Dva su vezna faktora – heparan sulfat proteoglikan (HSPG) i LDL-receptor⁷ i dva su prava receptora – SR-B1⁸ i CD81⁹. Povezivanjem virusa s ta četiri faktora dolazi do približavanja virusa i stanice te do interakcija E2 s dva ulazna faktora – CLDN1¹⁰ i OCLN¹¹. S obzirom na velik broj potrebnih interakcija, vezanje HCV-a za stanicu domaćina spor je proces koji mora biti vrlo dobro koordiniran. Sam ulazak virusa u stanicu odvija se putem endocitoze posredovane klatrinom (Morozov i Lagaye, 2018).

Identificiran je i stanični faktor EWI-2wint koji se ponaša kao prirodni inhibitor ulaska HCV u stanicu – interakcijom s CD81 prevenira interakciju CD81-E2. Molekule koje oponašaju CD81-EWI-2wint interakciju mogle bi poslužiti kao korisni antivirusni lijekovi.

⁶ negativno smisljena jednolančana RNA je virusna RNA koja se ne može direktno translirati u virusne proteine

⁷ low density lipoprotein receptor – promovira endocitozu LDL-a

⁸ scavenger receptor class B member 1

⁹ cluster of differentiation 81

¹⁰ claudin 1

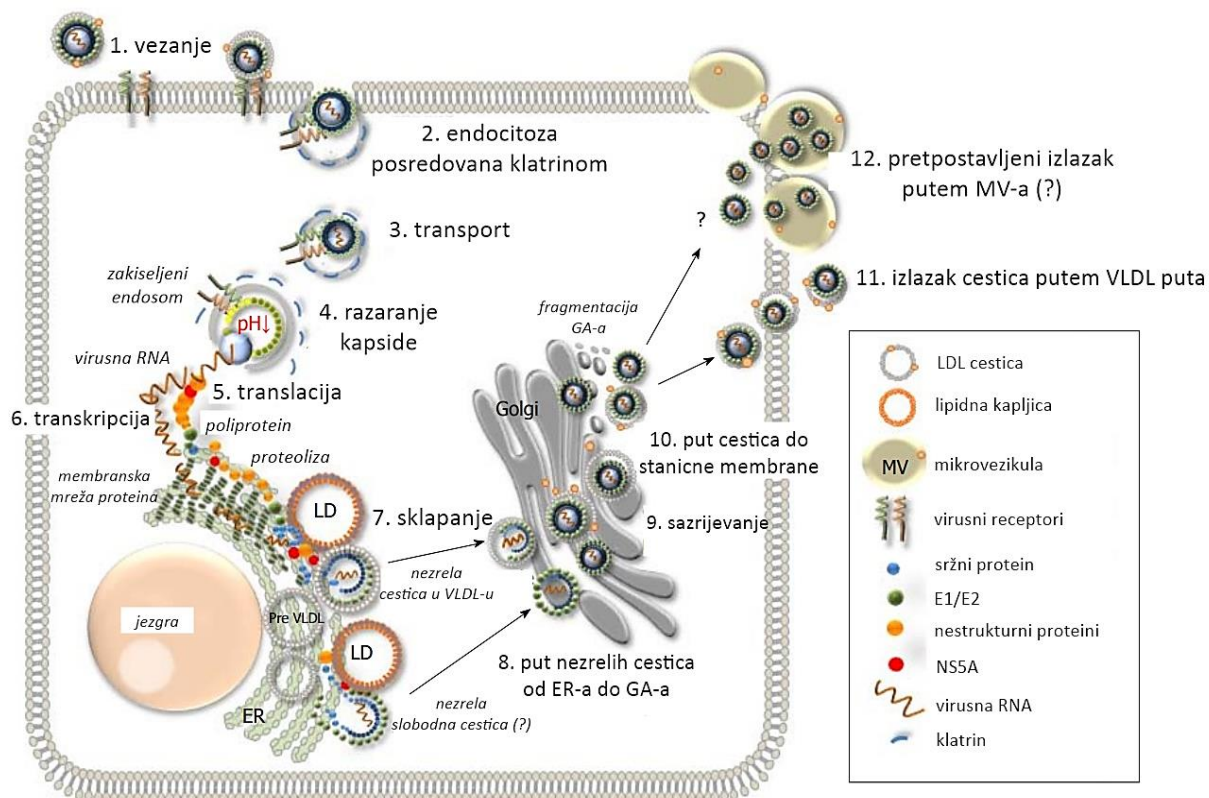
¹¹ occludin

Nakon ulaska virusa u stanicu, virusne čestice prenose se do ranog endosoma gdje dolazi do zakiseljavanja. Virusna se kapsida razara, a virusna se RNA otpušta u citoplazmu te dalje podliježe procesima replikacije i translacije proteina. Translacija proteina odvija se u endoplazmatskom retikulumu – nastaje poliproteinski prekursor koji se dalje procesira pomoću staničnih i virusnih proteaza u funkcionalne virusne proteine. Replikacija RNA odvija se pomoću NS5B RNA-ovisne RNA polimeraze koja sintetizira negativno smisleni RNA lanac, a koji dalje može služiti kao predložak za sintezu pozitivno smislenog RNA lanca i daljnju translaciju virusnih proteina (Morozov i Lagaye, 2018).

Sklapanje virusne čestice odvija se u endoplazmatskom retikulumu i to u blizini ili na samoj površini lipidne kapljice koja stanici služi za pohranu lipida. Novosintetizirana +ssRNA transportira se do mjesta sklapanja gdje se enkapsulira zasad nepoznatim mehanizmom. Nukleokapsida se zatim spaja s proteinima ovojnice te tako nastaje nezrela čestica koja dalje sazrijeva u Golgijevom aparatu. Nedavno je dokazano da HCV ima ulogu u fragmentaciji Golgijevog aparata čime može doći do smrti stanice. Upravo je to potencijalni okidač za nekrozu jetre (Morozov i Lagaye, 2018).

Virusne čestice iz stanice uglavnom izlaze koristeći put VLDL-a. Pretpostavlja se da je izlazak moguć i preko mikrovezikula izvedenih od membrane (MV). Jedna takva vezikula mogla bi prenijeti i veći broj virusnih čestica te predstavlja bolji zaštitni okoliš za virus (Morozov i Lagaye, 2018).

Čitav životni ciklus HCV prikazan je na Slici 2.



Slika 2. Životni ciklus hepatitisa C virusa (preuzeto i prilagođeno prema Morozov i Lagaye, 2018)

1.6. Epidemiologija hepatitisa C

Jedini do sada dokazani put prijenosa virusa jest parenteralni. Otkrićem virusa započinje rutinsko testiranje donirane krvi na HCV – prije toga glavni put prijenosa bila je upravo transfuzija krvi. Najčešći putevi prijenosa danas su dijeljenje igala i šprica, tetoviranje i stavljanje *piercinga* nesteriliziranim priborom te slični postupci koji uključuju korištenje pribora koji je bio u dodiru sa zaraženom krvi. To je veliki problem u zemljama u razvoju gdje se medicinski pribor često višekratno koristi (Webster i sur., 2015).

Procjenjuje se da oko 1% svjetske populacije odnosno oko 1,5% europske populacije ima kronični hepatitis C, a otprilike četvrtina njih razvit će cirozu jetre i/ili hepatocelularni karcinom. Prema procjenama Svjetske zdravstvene organizacije, 2016. godine od posljedica hepatitisa C preminulo je oko 400 000 ljudi. Ipak, terapijske mogućnosti danas vrlo su učinkovite i mogle bi izlječiti veliku većinu oboljelih kada bi svi oni imali pristup dijagnozi i terapiji (Han i sur., 2019).

1.7. Patofiziologija hepatitisa C

Poznato je da HCV dovodi do oštećenja jetre, ali točni mehanizmi kojima do toga dolazi nisu još skroz potvrđeni. Vjeruje se da su ta oštećenja uvelike posredovana imunosnim odgovorom domaćina u kojem dominiraju CD8⁺ T-limfociti, ali i druge stanice (CD4⁺ T-limfociti, regulatorni T-limfociti i NK stanice). Sve te stanice prepoznaju strukturne i nestrukturne antigene HCV-a. Imunosni odgovor raste te se luče citokini, kemokini i faktori rasta. Oni, zajedno s određenim virusnim proteinima, potiču zvjezdane stanice jetre na lučenje kolagena i na metaboličko reprogramiranje koje rezultira povećanom autofagijom, ozljedama parenhima i aktivacijom miofibroblasta. Tako se postepeno razvija fibroza, a kasnije i ciroza jetre te hepatocelularni karcinom (Morozov i Lagaye, 2018).

Sam virus ima i direktan učinak na jetru. Uzrokuje određene promjene u hepatocitima – oksidacijski stres, fragmentaciju Golgijevog aparata, promijenjenu distribuciju mitohondrija i druge, a koje dovode do apoptoze stanice. Također, s obzirom da su mu za replikaciju potrebni lipidi, HCV uzrokuje i promjenu lipidnog profila što inducira steatozu jetre (Morozov i Lagaye, 2018).

Virus uzrokuje patološke promjene i izvan jetre. Može se replicirati u limfocitima i monocitima potencijalno uzrokujući imunosne bolesti (limfom). B-limfociti aktivirani HCV-om proizvode velike količine krioglobulina koji se talože u malim i srednjim krvnim žilama uzrokujući vaskulitis. Utječući na jetru, HCV utječe i na određene metaboličke procese i lučenje određenih faktora te tako može dovesti do razvoja inzulinske rezistencije odnosno šećerne bolesti tipa 2. Vrijedi spomenuti i da virus ima sposobnost mijenjanja svojih antigena čime nastaju kvazispesije¹². Tako on uspješno izbjegava imunosni odgovor domaćina (Morozov i Lagaye, 2018).

1.8. Klinička slika hepatitisa C

Hepatitis C u 20% slučajeva ostaje u akutnom obliku, odnosno imunosni sustav domaćina uspijeva se obraniti i eliminirati virus. Čak 90% akutnih slučajeva biva asimptomatsko. Simptomi koji se najčešće javljaju su nespecifični – slabost, temperatura, bol u mišićima i

¹² antigene varijacije unutar jednog domaćina

zglobovima, probavne smetnje te rijetko žutica. Serumske transaminaze uglavnom su nešto povišene, ali samo kraći period (Morozov i Lagaye, 2018).

Preostali slučajevi (80%) odnose se na kronični oblik hepatitisa C – virus se nastavlja replicirati više od šest mjeseci nakon izlaganja. Većina oboljelih također je asimptomatska ili imaju nespecifične simptome. Vrijednosti serumskih transaminaza većinom su normalne ili umjereno povišene. Prava klinička slika uglavnom se javlja desetljećima nakon zaraze u obliku ciroze jetre i/ili hepatocelularnog karcinoma, odnosno u obliku simptoma i znakova koji dolaze s tim stanjima – žutica, ascites, koagulopatija, portalna hipertenzija, hepatička encefalopatija, povišene serumske transaminaze (Morozov i Lagaye, 2018).

Kod kroničnog oblika mogu se javiti i problemi izvan jetre – ranije spomenuti limfomi, šećerna bolest tipa 2, vaskulitisi (problemi u zglobovima, bubrezima, mozgu, kardiovaskularnom sustavu i drugim organima) te ostalo (Morozov i Lagaye, 2018).

Čimbenici koji mogu ubrzati napredovanje bolesti su dob (stariji od 40 godina), muški spol, visok indeks tjelesne mase, masna jetra, konzumacija alkohola i koinfekcija HIV-om (Morozov i Lagaye, 2018).

1.9. Dijagnostika hepatitisa C

Za dijagnostiku hepatitisa C razvijeni su serološki testovi, antigenski testovi i testovi amplifikacije nukleinske kiseline (NAAT¹³).

Serološkim se testovima dokazuje prisutnost specifičnih protutijela na HCV. Pozitivan serološki test znači kroničnu infekciju ili preboljenje u prošlosti – kronična infekcija potvrđuje se dodatnim antigenskim testom ili nekim od testova amplifikacije nukleinske kiseline. Akutna infekcija ne može se dokazati serološkim testom s obzirom na to da je potrebno neko vrijeme da se stvore protutijela na HCV.

Najprecizniji antigenski test je antigenski test na sržni protein. Uz pomoć specifičnih protutijela za taj antigen, sržni protein može se kvantitativno odrediti.

Pomoću testova amplifikacije nukleinske kiseline detektira se prisutnost HCV genoma (RNA). Najčešće korištena metoda jest PCR¹⁴. Kvalitativni PCR vrlo je osjetljiv i koristi se za incijalnu dijagnostiku te za pretragu donirane krvi i organa. Njime se može dijagnosticirati akutna

¹³ nucleic acid amplification test

¹⁴ polymerase chain reaction

infekcija. Kvantitativni PCR (real-time PCR) koristi se za praćenje uspješnosti terapije. Cilj je izlječenje koje se definira kao SVR (*sustained virological response*) – HCV RNA < 15 IU/mL šest mjeseci nakon završetka antivirusne terapije.

Također, važna skupina testova je i ona kojom se obavlja genotipizacija HCV-a kako bi se odabrala odgovarajuća terapija i strategija liječenja za pacijenta sukladno genotipu kojim je pacijent zaražen. Najčešće se PCR-om analiziraju kodirajuće regije odnosno geni za sržni protein i za NS5B (Morozov i Lagaye, 2018).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Svjetska zdravstvena organizacija prepoznaje hepatitis C kao veliki globalni zdravstveni problem. Cjepivo protiv HCV ne postoji, a virus je posebice raširen u nerazvijenim zemljama gdje se često prenosi putem infektivnog medicinskog pribora. Budući da kronični oblik bolesti dovodi do teškog oštećenja jetre, terapijski je cilj eliminirati virus iz organizma te potpuno izliječenje.

U posljednjih nekoliko desetljeća, zahvaljući poznavanju životnog ciklusa i strukture HCV te ulaganju u razvoj novih generacija antivirusika, farmakološko liječenje hepatitisa C jako je napredovalo te se ova bolest danas uspješno liječi.

Tema ovog diplomskog rada je prikazati povijesni razvoj terapije za hepatitis C – od interferona i ribavirina koji su djelovali na imunosni sustav domaćina, preko prvih lijekova koji su djelovali na sam virus pa sve do modernih izravno djelujućih protuvirusnih lijekova.

3. MATERIJALI I METODE

Za izradu ovog preglednog diplomskog rada proučavana je stručna i znanstvena literatura iz područja farmacije i medicine na temu hepatitisa C i njegove terapije.

Pretraživane su baze podataka PubMed, ScienceDirect, ResearchGate, Cochrane, Medscape, UpToDate, Lexicomp, Drugbank i Mediatelly te određene smjernice za liječenje hepatitisa C.

Tijekom pretrage korištene su iduće ključne riječi i njihove kombinacije: *hepatitis, hepatitis C, discovery, history, virology, epidemiology, pathogenesis, symptoms, diagnosticity, therapy, interferon, ribavirin, DAA*.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Interferon alfa-2b

Prva odobrena terapija za hepatitis C 1991. godine bio je interferon alfa-2b (Intron[®] A). Interferoni (IFN) su glikoproteinski citokini koje proizvode i otpuštaju zaražene i imunosne stanice domaćina kao odgovor na virusnu infekciju. Ime su dobili jer interferiraju s virusnom infekcijom. Dijele se na tri tipa interferona s obzirom na vrstu receptora na koju se vežu – IFN tip I (najpoznatiji su IFN- α i IFN- β), IFN tip II (IFN- γ) i IFN tip III (IFN- λ). Osnovni mehanizam djelovanja uključuje aktivaciju imunskog sustava u borbi protiv virusa. Osim NK stanica, makrofaga i limfocita, aktiviraju i obrambene mehanizme u nezaraženim stanicama, aktiviraju RNaze koje uništavaju virusnu RNA, povećavaju ekspresiju MHC I i MHC II molekula (Mahajan i Kaur, 2015).

Istražujući utjecaj virusne infekcije na inficirane stanice, interferone su otkrili znanstvenici J. Lindenmann i A. Isaacs 1957. godine. Za potrebe kliničkih ispitivanja isprva su se proizvodili iz ljudskih leukocita stimuliranih virusima. Tako izdvojena frakcija sadržavala je interferone, ali i druge proteine pa se točne karakteristike i funkcije interferona nisu mogle u potpunosti potvrditi. Tek 20 godina kasnije, 1987. godine, razvojem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (*high performance liquid chromatography*, HPLC), uspješno je dobivena prva frakcija koja je sadržavala isključivo interferone (Pestka, 2007).

U međuvremenu, tijekom sedamdesetih, dolazi do razvoja rekombinantne DNA tehnologije. To je 1980. godine omogućilo proizvodnju IFN- α i to u dva oblika, 2a i 2b, koji se razlikuju s obzirom na tehnologiju proizvodnje. Proizvode se u klonovima *E. coli* koji imaju plazmide s genom za IFN- α izoliranim iz ljudskih leukocita (Trepo, 2014).

Interferon- α dimerni je protein. Svaki se monomer sastoji od pet α -heliksa. Monomeri su međusobno povezani ionom cinka čije vezno mjesto tvore karboksilatne skupine susjednih glutaminskih kiselina svakog monomera (Glu 41 i Glu 42) (Nagabhushan i sur., 2002).

Okidači za proizvodnju endogenih interferona uglavnom su mikrobi odnosno njihove komponente preko aktivacije *toll-like* receptora (TLR) te nekih drugih membranskih i citoplazmatskih receptora – dolazi do aktivacije određenih signalnih puteva i do poticanja transkripcije interferonskih gena (Schneider i sur., 2014).

Interferon- α se, kao i ostali interferoni tipa I, veže na IFNAR (receptor za interferone tipa I) na površini stanice. To je heterodimerni receptor koji je sastavljen od dvije podjedinice – IFNAR1 i IFNAR2. Najprije dolazi do vezanja na IFNAR2, a zatim se IFNAR1 udružuje s

nastalim IFN/IFNAR2 kompleksom te dolazi do aktivacije kompleksa. Pokreće se JAK/STAT¹⁵ signalni put, ali i neki drugi signalni putevi. Na kraju signalnog puta dolazi do fosforilacije STAT-1 i STAT-2 proteina te se oni udružuju s IRF-9¹⁶ proteinom tvoreći heterotrimerni transkripcijski faktor ISGF-3¹⁷. On se veže na promotorsko mjesto (ISRE¹⁸) gena koji su stimulirani interferonom (ISG¹⁹) te potiče njihovu transkripciju. Postoje i drugi IRF koji služe kao regulatori transkripcije ISG – kao aktivatori ili supresori, a neki su od njih aktivirani direktno virusnom infekcijom. Geni koji su stimulirani interferonom dalje se transliraju u proteine koji imaju antivirusnu i/ili antitumorsku ulogu. Broj tih proteina velik je, a neki od njih, kao i njihove osnovne uloge navedeni su u Tablici 5. Na Slici 3. prikazan je mehanizam aktivacije ISG-a interferonom alfa (Schneider i sur., 2014)..

Interferoni također mogu utjecati na ekspresiju određenih vrsta RNA – dugačke nekodirajuće RNA (lncRNA), mikro RNA (miRNA), male RNA i ostale vrste RNA koje dalje utječu na tijek virusne infekcije (Schneider i sur., 2014).

Protein NS5A HCV sadrži regiju koja određuje osjetljivost na interferon (ISDR²⁰). Broj zamijenjenih aminokiselina te regije služi za predviđanje uspješnosti interferonske terapije – određene kombinacije aminokiselina pogoduju virusu na način da se umanjuje indukcija ISG (Sugiyama i sur., 2017).

Vrijeme poluživota interferona alfa-2b nakon supkutane injekcije iznosi dva do tri sata. Vršna koncentracija postiže se nakon približno šest sati. Najčešće su nuspojave infekcije (faringitis, bronhitis, sinusitis), poremećaji krvi i limfnog sustava (leukopenija, limfopenija, trombocitopenija), poremećaji živčanog sustava (omaglica, glavobolja, tremor), poremećaji probavnog sustava (mučnina, povraćanje, dijareja), poremećaji kože (alopecija, pruritus, osip), psihijatrijski poremećaji (suicidalne misli, depresija, anksioznost, agitacija, nesanic), zamagljen vid, vrtoglavica, palpitacije, tahikardija, kašalj, vrućica, mialgija, artralgiya, bolovi u leđima, poremećaji menstrualnog ciklusa, gubitak apetita, anoreksija, razvoj autoantitijela i autoimunih poremećaja te bol i upala na mjestu injekcije. Sve se te nuspojave u većini slučajeva manifestiraju kao skup simptoma sličnih gripi (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/introna-epar-product-information_hr.pdf).

¹⁵ janus kinase/signal transducer and activator of transcription proteins

¹⁶ interferon regulatory factor 9

¹⁷ IFN-stimulated gene factor

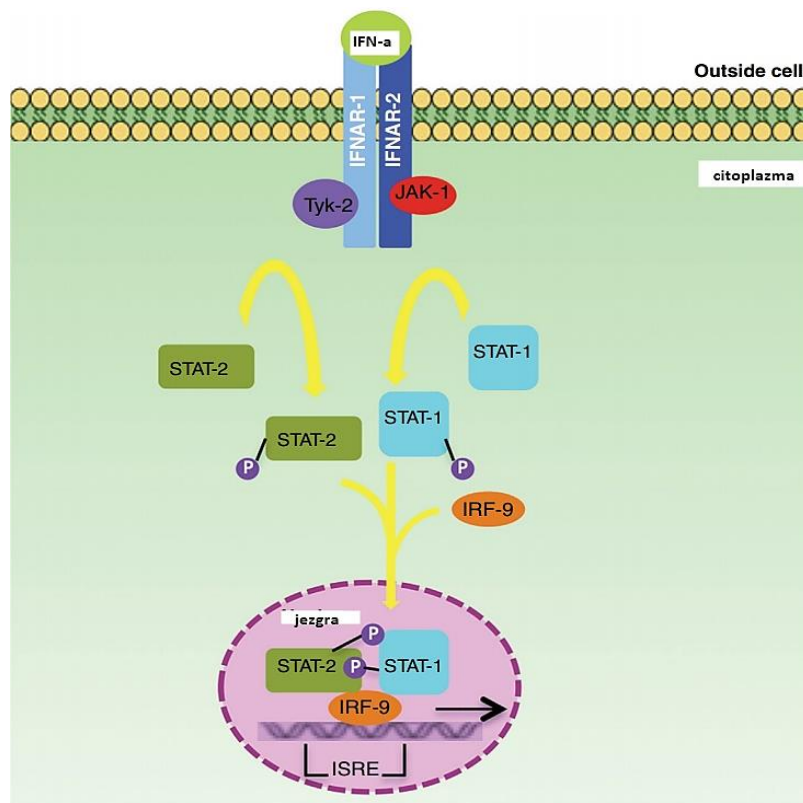
¹⁸ interferon-stimulated gene

¹⁹ interferon-stimulated response element

²⁰ interferon sensitivity determining region

Upotreba interferona alfa-2b za liječenje hepatitisa C započela je nakon dvije provedene randomizirane kontrolirane studije. Primjenjivale su se doze interferona alfa-2b od 1 do 3 milijuna internacionalnih jedinica (IU) supkutanim injekcijama tri puta tjedno tijekom šest mjeseci. Ustanovljeno je da se količina HCV RNA kod 20% pacijenata smanjila te je lijek i službeno odobren za terapiju hepatitisa C. (Basyte-Bacevice i Kupcinskas, 2020).

Danas se terapija interferonom alfa-2b ne nalazi ni u jednim smjernicama za liječenje hepatitisa C kao ni za liječenje ostalih bolesti. S obzirom na brojne nedostatke te postojanje i većinsko korištenje alternativnih i boljih verzija interferona (pegilirani interferoni), proizvođač Introna® A krajem 2019. godine odlučio ga je u potpunosti povući iz proizvodnje (<https://www.sanfordguide.com/2019-11-15-id-update/>).



Slika 3. Mehanizam aktivacije ISG-a interferonom alfa (preuzeto i prilagođeno prema Abdolvahab i sur., 2016)

Najprije dolazi do vezanja na IFNAR2, a zatim se IFNAR1 udružuje s nastalim IFN/IFNAR2 kompleksom te dolazi do aktivacije kompleksa. Pokreće se JAK/STAT signalni put, ali i neki drugi signalni putevi. Na kraju signalnog puta dolazi do fosforilacije STAT-1 i STAT-2 proteina te se oni udružuju s IRF-9 proteinom tvoreći heterotrimerni transkripcijski faktor ISGF-3. On se veže na promotorsko mjesto (ISRE) gena koji su stimulirani interferonom (ISG) te potiče njihovu transkripciju.

Tablica 5. Proteini kodirani genima koji su stimulirani interferonom i njihove osnovne uloge (Schneider i sur., 2014)

| Protein | Uloga |
|---|---|
| Razni IRF | regulatori transkripcije ISG |
| Razni PRR ²¹ : RLR ²² , ALR ²³ , NLR ²⁴ , TLR ²⁵ ... | povećano prepoznavanje PAMP ²⁶ -ova – povećana detekcija patogena |
| OAS ²⁷ | OAS detektira stranu citosolnu RNA čime dolazi do sinteze 2'-5' oligoadenilata koji aktiviraju RNazu L |
| RNaza L | uništava virusnu, ali i staničnu RNA |
| PKR ²⁸ | -fosforilacijom određenih proteina blokira sintezu proteina i time daljnju replikaciju virusa -degradira inhibitor nuklearnog faktora κB (IκB) – aktivacija NF-κB signalnog puta |
| p56 | direktno inhibira sintezu virusnih proteina |
| Mx ²⁹ | hvata određene komponente virusa, poput nukleokapside, i sprječava da one dođu do svog cilja u stanici |
| CH25H ³⁰ | hidroksilira kolesterol u 25-hidroksikolesterol – pojačana otpornost stanične membrane na fuziju s virusom |
| IFITM ³¹ proteini | sprječavaju ulazak virusa u stanicu |
| TRIM ³² proteini | sprječavaju ulazak virusa u stanicu |

²¹ pathogen recognition receptor

²² retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-I)-like receptor

²³ AIM2-like receptor

²⁴ nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor

²⁵ toll-like receptor

²⁶ pathogen-associated molecular pattern

²⁷ oligoadenylate synthetase

²⁸ protein-kinase R

²⁹ myxovirus resistance

³⁰ cholesterol-25-hydroxylase

³¹ IFN-inducible transmembrane

³² tripartite motif

| | |
|---------------------|---|
| NCOA7 ³³ | sprječava ulazak virusa u stanicu |
| Viperin | sprječava replikaciju virusne RNA i izlazak virusa iz stanice |
| Teterin | sprječava izlazak virusa iz stanice |
| ISG15 | ISGilacija tj. kovalentno vezanje na ciljane proteine čime utječe na njihovu ulogu – povećava ili smanjuje aktivnost određenih proteina važnih u imunosnom odgovoru |

4.2. Kombinacija interferona alfa-2b i ribavirina

Kombinacija interferona alfa-2b i ribavirina za terapiju hepatitisa C odobrena je 1998. godine. Znanstvenici J. T. Witkovski i R. K. Robins sintetizirali su i proučavali antivirusne ribonukleozide koji bi utjecali na enzimske funkcije koje su zajedničke svim virusima. Jedan od sintetiziranih ribonukleozida bio je i ribavirin 1970. godine. Nešto kasnije, 1972. godine, potvrđeno je kako ribavirin posjeduje aktivnost protiv širokog spektra RNA i DNA virusa (Meštrović, 2021).

Način dobivanja ribavirina (kemijski i enzimski) nije se pretjerano mijenjao tijekom godina. Kemijska sinteza rezultira relativno velikim iskorištenjem (54-83%), ali su potrebni zahtjevni uvjeti reakcije (visoka temperatura i vrlo niski tlak) kako bi se formirala glikozidna veza između peracilirane β -D-ribofuranoze i metil 1,2,4-triazol-3-karboksilata nakon čega slijedi amioliza odnosno reakcija između karboksilata i amina te nastaje konačni amid. Enzimska sinteza rezultira varijabilnim iskorištenjem (19-84%), ali potrebni su blagi reakcijski uvjeti. Provodi se transglikozilacijom uz enzim purinska nukleozidna fosforilaza (PNP) koja prenosi ugljikohidratnu skupinu s odgovarajućeg donora (uglavnom neki nukleozid) na odgovarajuću purinsku bazu time tvoreći novi nukleozid. Enzim se izolira iz određenih bakterijskih stanica – većinom iz *Aeromonas hydrophila* (Rabuffetti i sur., 2019).

Ribavirin (1--D-ribofuranozil-1,2,4-triazol-3-karboksamid) je analog purinskog nukleozida gvanozina. Njegova kemijska struktura prikazana je na Slici 4.

Ulaskom u stanicu, ribavirin fosforilacijom prelazi u aktivne oblike: mono-, di- i trifosfate koji djeluju na nekoliko načina koji su sažeto prikazani na Slici 5.

³³ nuclear receptor coactivator 7

Ribavirin monofosfat (RMP) već je pri nižim koncentracijama kompetitivni inhibitor inozin monofosfat dehidrogenaze (IMPDH), enzima koji katalizira konverziju inozin monofosfata u ksantozin monofosfat odnosno katalizira prvi korak u biosintezi gvanozin monofosfata. Posljedica je toga smanjena unutarstanična koncentracija gvanozin trifosfata (GTP), potrebnog za sintezu nukleinskih kiselina. Također, GTP je bitan i za ostale stanične procese – vezanje aminoacil tRNA na A-mjesto na ribosomu, translokaciju ribosoma prema 3' kraju mRNA, prijenos signala preko G-proteina kao drugog glasnika, glukoneogenezu (GTP služi kao izvor energije u određenim koracima) (Nyström i sur., 2019).

Ribavirin trifosfat (RTP) kompetitivni je inhibitor mRNA gvanililtransferaze odnosno *capping* enzima koji katalizira dodavanje 7-metilgvanozin "kape" na 5' kraju mRNA molekulu, što je važno za odgovarajuću stabilnost i translaciju mRNA. Za razliku od enzim-GMP intermedijera, enzim-RMP intermedijer kovalentno je povezan te zato dolazi do inhibicije enzima. Za RTP također je dokazano da kompetitivno inhibira RNA-ovisnu RNA-polimerazu (RdRP) virusa influenze, ali ne i HCV. Ipak, dokazano je da pri većim koncentracijama ribavirina, ugradnja RTP-a umjesto GTP-a u RNA uzrokuje mutagenezu virusa koji tada postaje neispravan i nefunkcionalan – RTP se s dvije vodikove veze povezuje i s citidin trifosfatom (CTD) i s uridin trifosfatom (UTP) što naknadno dovodi do G-u-A, A-u-G, C-u-U i U-u-C mutacija kroz čitavu RNA HCV-a koje se ne mogu popraviti s obzirom na to da RdRP ne posjeduje *proofreading* mehanizam (Nyström i sur., 2019).

Ribavirin također djeluje i na imunosni odgovor domaćina – modulira T_H1/T_H2 ravnotežu (povećava T_H1 imunosni odgovor koji je važniji za antivirusni učinak), povećava razinu IL-12, smanjuje razinu CXCL-10, regulira ekspresiju i osjetljivost ISG-a na interferone te smanjuje koncentraciju jetrenih enzima (Nyström i sur., 2019).

Nedavno je dokazano i kako ribavirin na razini transkripcije i translacije inducira spermidin-spermin N1-acetiltransferazu (SAT1), enzim koji katabolizira poliamine. Poliamini su male, pozitivno nabijene organske molekule važne za transkripciju, translaciju, proteaznu funkciju i pakiranje virusa, a upravo ribavirin utječe na njihovu razgradnju (Tate i sur., 2019).

Usprkos višestrukim mehanizmima, ribavirin kao monoterapija ima slabi učinak na HCV. Međutim, budući da je jedno od djelovanja ribavirina da optimizira ekspresiju ISG-a te povećava njihovu osjetljivost na interferone, ribavirin se dugo vremena primjenjivao u kombinaciji s (peg)interferonom alfa (Nyström i sur., 2019).

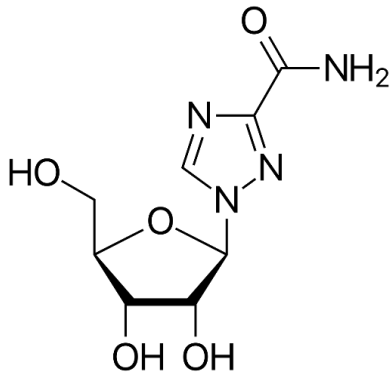
Apsorpcija ribavirina nakon oralne je primjene brza i bioraspoloživost iznosi 64%. Vrijeme poluživota je dugo (danima) te je volumen distribucije velik (ribavirin se slabo veže za proteine

plazme). Klirens ovisi o funkciji bubrega pa je kod bubrežnih bolesnika potrebna prilagodba doze (Nyström i sur., 2019).

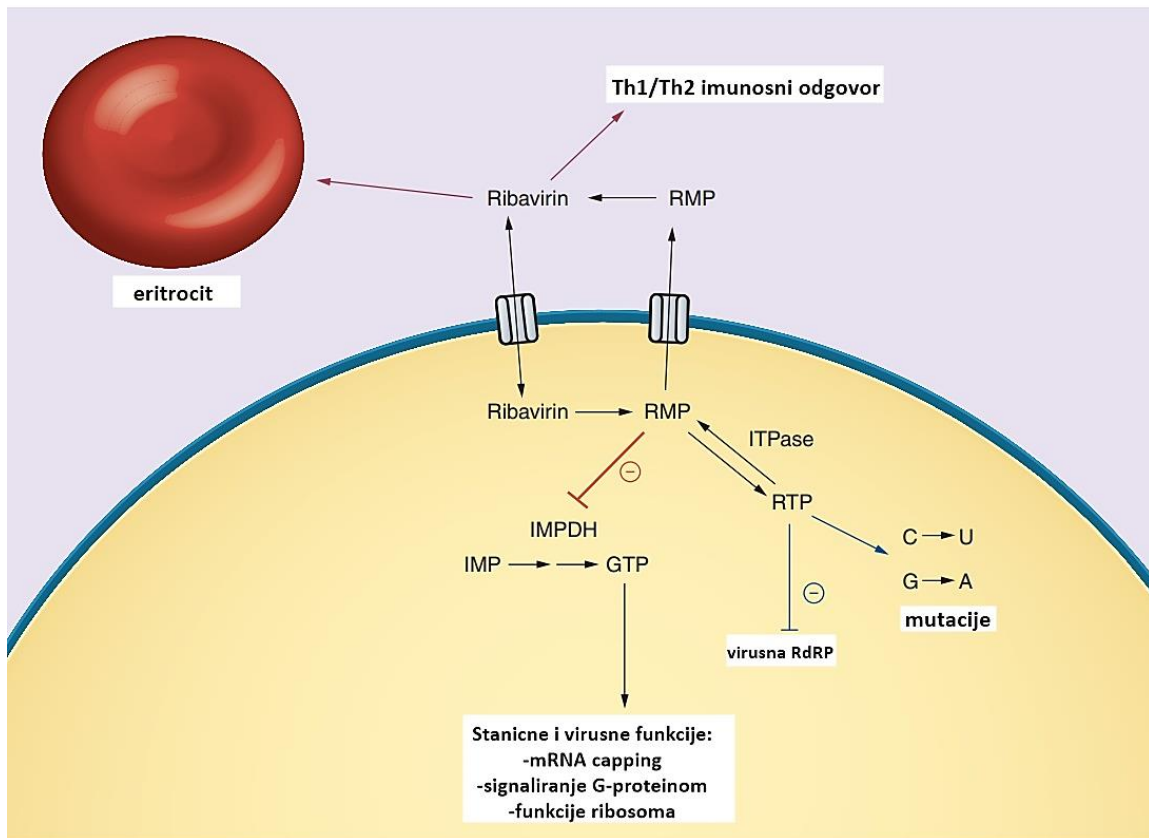
Fosforilacija ribavirina unutar eritrocita sprječava njegov izlazak u plazmu – koncentracije unutar eritrocita tridesetak su puta veće nego u plazmi. Upravo je zato glavna nuspojava ribavirina hemolitička anemija kao posljedica deplecije ATP-a i oksidativnog stresa unutar eritrocita. Anemija je reverzibilna, odnosno povlači se nakon prestanka terapije. Osobe koje imaju određeni polimorfizam *ITPA* gena (gen za inozin trifosfat pirofosfatazu), koji rezultira smanjenom aktivnošću ovog enzima, otpornije su na hemolitičku anemiju uzrokovanu ribavirinom te je kod njih primjećena veća učinkovitost terapije ribavirinom. ITPaza inače defosforilira ITP (inozin trifosfat) u IMP (inozin monofosfat). Kod osoba sa smanjenom aktivnosti ITPaze ITP se gomila u stanici te se može dalje pretvarati u ATP bitan za homeostazu eritrocita. Također, ITPaza defosforilira i RTP u RMP koji može izaći iz stanice u plazmu tako da ovaj polimorfizam uzrokuje i manje koncentracije RTP-a u plazmi i manju sistemsku toksičnost ribavirina. Kod osoba koje su razvile anemiju, potrebno je smanjiti dozu ribavirina i/ili primjenjivati eritropoetin – hormon koji potiče eritropoezu. Ostale nuspojave uključuju nesanicu, glavobolju, bol u mišićima i zglobovima, kašalj i osip. S obzirom na teratogenost ribavirina i na činjenicu da se dugo zadržava u organizmu i izlučuje u sjemenu tekućinu, ribavirin je kontraindiciran za vrijeme trudnoće te se trudnoća ne preporuča nekoliko mjeseci nakon prestanka terapije žene i/ili muškarca (Nyström i sur., 2019).

Upotreba kombinacije interferona alfa-2b i ribavirina za liječenje hepatitisa C započela je nakon kliničke studije u kojej se uspoređivala uspješnost monoterapije interferona alfa-2b te kombinacije ova dva lijeka. Dokazalo se da je kombinacija vrlo uspješna i bolja od monoterapije – zadovoljavajući odgovor postignut je kod 40% pacijenata te je kombinacija odobrena za terapiju hepatitisa C (Basyte-Bacevice i Kupcinskas, 2020).

Danas se kombinacija interferona alfa-2b i ribavirina više ne koristi, ali se i dalje koristi ribavirin kao takav te se nalazi u smjernicama za liječenje hepatitisa C. Njegova je uporaba indicirana u određenim genotipovima HCV-a te stadijima bolesti i to u kombinaciji s drugim lijekovima jer skraćuje vrijeme terapije. Primjenjuje se u obliku tableta dva puta dnevno. Potrebna doza i trajanje terapije određuju se na temelju tjelesne mase bolesnika, genotipu virusa i lijeka/lijekova s kojima se kombinira (Loustaud-Ratti i sur., 2016).



Slika 4. Kemijska struktura ribavirina (Rabuffetti i sur., 2019)



Slika 5. Mehanizmi djelovanja ribavirina (preuzeto i prilagođeno prema Nyström i sur., 2019)

RMP je kompetitivni inhibitor IMPDH koja katalizira prvi korak u biosintezi gvanozin monofosfata. Posljedica je smanjena unutarstanična koncentracija GTP potrebnog za više staničnih funkcija.

RTP je kompetitivni kovalentni inhibitor mRNA gvanililtransferaze koja katalizira dodavanje 7-metilgvanozin "kape" na 5' kraju mRNA molekulu (važno za odgovarajuću stabilnost i translaciju mRNA). RTP je i kompetitivni inhibitor RdRP virusa influenze, a kod HCV uzrokuje mutagenesu virusa ugradnjom u rastući RNA lanac.

Ribavirin djeluje i na imunski odgovor domaćina – modulira T_H1/T_H2 ravnotežu (povećava T_H1 imunski odgovor koji je važniji za antivirusni učinak).

4.3. Kombinacija pegiliranog interferona alfa i ribavirina

Godine 2000. za terapiju hepatitisa C odobren je peginterferon alfa-2b (PegIntron[®]), a 2002. godine i peginterferon alfa-2a (Pegasys[®]), oboje u kombinaciji s ribavirinom.

Peginterferoni su pegilirani interferoni. Pegiliranje označava kovalentno konjugiranje proteina s molekulom polietilenglikola (PEG). Ideja za to potječe još iz sedamdesetih godina od profesora F. Davisa sa Sveučilišta Rutgers u SAD-u koji je smatrao da će se tako poboljšati određena farmakološka svojstva proteina. Prvi odobreni pegilirani lijek bio je pegilirana goveđa adenozin deaminaza 1990. godine, a nakon toga razvija se niz pegiliranih proteinskih lijekova (Yadav i Dewangan, 2021).

Postoji nekoliko strategija odnosno mehanizama pegiliranja koji se mogu podijeliti na nespecifične (*random*) konjugacije i konjugacije na specifičnom položaju. Kod nespecifičnih konjugacija dolazi do reakcije između nukleofilne ili elektrofilne skupine proteina (primarna amino skupina, tiolna skupina, aldehidna skupina...) i elektrofilnog ili nukleofilnog PEG reagensa (PEG konjugiran s nekom skupinom koja ga aktivira) te nastaje smjesa proteina koji su strukturni izomeri. Konjugacija na specifičnom položaju uglavnom se provodi uz transglutaminazu (TGazu) koja katalizira prijenos PEG-a s PEG primarnog amina na glutamin proteina. U zadnje se vrijeme sve više radi na razvoju reverzibilnog i nekovalentnog pegiliranja, budući da trajna veza s molekulom PEG-a može utjecati na aktivnost proteina. Kod reverzibilnog pegiliranja, protein i PEG vežu se kovalentnom vezom, ali se ona cijepa *in vivo*. Kod nekovalentnog pegiliranja princip je sličan, samo što veze između proteina i PEG-a nisu kovalentne, već hidrofobne, ionske ili kelatne (Damodaran i Fee, 2010).

PegIntron[®] se priprema konjugacijom interferona s jednonlačanim PEG-sukcimidil-karbonatom (PEG-SC) preko primarnih amino skupina aminokiselina na površini proteina (većinom histidina) čime nastaje uretanska veza. S druge strane, Pegasys[®] se priprema monopegilacijom interferona s razgranatom molekulom PEG-a aktiviranog s N-hidroksisukcinimidom (PEG-NHS), također preko primarnih amino skupina aminokiselina na površini proteina (Damodaran i Fee, 2010).

Pegiliranje se provodi s ciljem poboljšanja farmakokinetičkih svojstava i smanjenja imunogenosti lijeka. Smanjuje se bubrežni klirens kao i proteolitička razgradnja proteinskog lijeka te mu se tako produžuju vrijeme poluživota i interval doziranja. To je važno jer se tako smanjuju troškovi liječenja, povećava se suradljivost pacijenata te se smanjuju toksičnost i nuspojave. Isto tako, konjugirani PEG osigurava steričke smetnje tako da se smanjuje agregacija proteina te osigurava topljivost proteina zbog svojih polarnih hidroksilnih skupina.

Također, pegiliranjem se maskiraju imunogena mjesta na proteinu te se tako smanjuje sama imunogenost proteina (*in vivo* stvaranje protutijela na primjenjeni proteinski lijek) koja smanjuje biološku aktivnost lijeka (Ginn i sur., 2014).

S druge strane, pegiliranje može negativno utjecati na farmakodinamiku odnosno biološku aktivnost lijeka – sterički se blokiraju interakcije između lijeka i ciljanog enzima/receptora pa je potrebno dulje vrijeme da dođe do njihove interakcije. Rješenje za to leži u već ranije navedenim strategijama pegiliranja – konjugacija na specifičnom položaju, reverzibilna konjugacija ili nekovalentna konjugacija (Ginn i sur., 2014).

Mnogim je istraživanjima pokazano da se konjugiranjem proteina s PEG-om ne povećava njihova toksičnost odnosno da su takvi proteini sigurni za uporabu. Sama se molekula PEG-a, kao i pegilirani protein, izlučuju bubrezima (Ginn i sur., 2014).

Vrijeme poluživota Pegasysa® nakon supkutane primjene iznosi u prosjeku 160 sati. Vršna koncentracija postiže se nakon tri do četiri dana. Nuspojave su iste kao za klasični nepegilirani interferon, ali su slabije izražene s obzirom na rjeđe doziranje (https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pegasys-epar-product-information_hr.pdf).

Kliničkim je ispitivanjima dokazano kako je kombinacija peginterferona alfa i ribavirina učinkovita kod 60% pacijenata te ubrzo ta kombinacija postaje terapijski zlatni standard za hepatitis C te će zadržati taj status idućih desetak godina.

Pegasys® se primjenjuje supkutanom injekcijama u dozi od 180 mg jedanput tjedno u kombinaciji s oralno primjenjenim ribavirinom. Trajanje terapije ovisi o genotipu HCV-a. Ipak, s obzirom na to da su razvijeni bolji lijekovi, danas se peginterferon alfa ne nalazi u službenim smjernicama za liječenje hepatitisa C, čak ni kao početna terapija. Budući da ti novi lijekovi nisu dostupni u mnogim zemljama u razvoju, tamo je i dalje zlatni standard za terapiju hepatitisa C upravo kombinacija pegiliranog interferona alfa i ribavirina (<https://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs/peginterferon-alfa-drug>).

4.4. Prvi izravni antiviroci

Nakon više od dva desetljeća istraživanja HCV i potencijalnih meta lijekova, 2011. godine odobrena su prva dva izravna antivirotika za terapiju hepatitisa C – boceprevir i telaprevir. Oba su lijeka sintetizirana još početkom 2000-ih, ali su nakon toga slijedile godine kliničkih ispitivanja te usavršavanja postupka sinteze i formulacije ljekovitog oblika.

Izravni su antivirusni (DAA³⁴) lijekovi koji djeluju na specifične mete u životnom ciklusu HCV-a. Prvi DAA bili su inhibitori NS3/4A proteaze. To je enzim koji cijepa virusni poliproteinski prekursor na aktivne proteine te je stoga, kao ključni enzim za razmnožavanje virusa, prepoznata kao atraktivna meta za djelovanje izravnih antivirusa (Howe i Venkatraman, 2013).

Rendgenska struktura NS3/4A kompleksa opisana je 1997. godine. To je heterodimerni kompleks sastavljen od većeg enzimskog dijela NS3 (aktivnost serinske proteaze i helikaze/ATPaze) te manjeg aktivacijskog kofaktora NS4A važnog za potpunu i optimalnu funkciju enzima. U aktivnom se mjestu proteaze nalazi katalitička trijada – His57, Asp81 i Ser139, a važnu strukturnu stabilizacijsku ulogu ima i ion cinka udaljen od tog aktivnog mjesta. Enzimska reakcija ove serinske proteaze obuhvaća niz kiselinsko-baznih reakcija katalitičke trijade. Glavna je reakcija kovalentno vezanje nukleofilnog kisika iz Ser139 na karbonilni ugljik iz veze supstrata koja će se rascijepiti. Druge dvije aminokiseline (His57 kao baza i Asp81 kao kiselina) služe za stabilizaciju reakcijskih intermedijara, a za krajnju je hidrolizu potrebna i molekula vode (Howe i Venkatraman, 2013). Općeniti mehanizam reakcije serinskih proteaza prikazan je na Slici 6.

C. Steinkühler i suradnici s talijanskog instituta za molekularnu biologiju 1998. godine ustanovili su kako su odcijepljeni N-terminalni dijelovi supstrata moćni inhibitori NS3/4A proteaze – to je bio početak razvoja ovih lijekova. Problem je i dalje predstavljala veličina takve molekule jer velike su molekule teške za razvoj te imaju loša fizikalno-kemijska svojstva. Iduća prepreka u razvoju ovih inhibitora bio je nedostatak robusnih modela replikacije virusa. To su 1999. godine riješili Lohmann i suradnici – razvili su subgenomski replikon sustav odnosno virusnu RNA koja sadrži gene samo za nestrukturane proteine HCV-a koja se replicira unutar stanica hepatoma (hepatocelularnog karcinoma). Prvotna učinkovitost lijekova kandidata provodila se upravo u ovom sustavu – provjeravalo se dolazi li do replikacije RNA nakon izlaganja lijeku. Također, problematična je bila i činjenica da se aktivna mjesta NS3/4A proteaze razlikuju među različitim genotipovima u određenim aminokiselinama, odnosno trebalo je pronaći inhibitore koji ne ulaze u interakcije s tim aminokiselinama. Ipak, to nije bio slučaj s boceprevirom i telaprevirom jer su oni sintetizirani kao inhibitori NS3/4A proteaze genotipa 1 te su stoga slabo djelovali na ostale genotipe. Odobreni su za terapiju isključivo HCV-a genotipa 1 (Howe i Venkatraman, 2013).

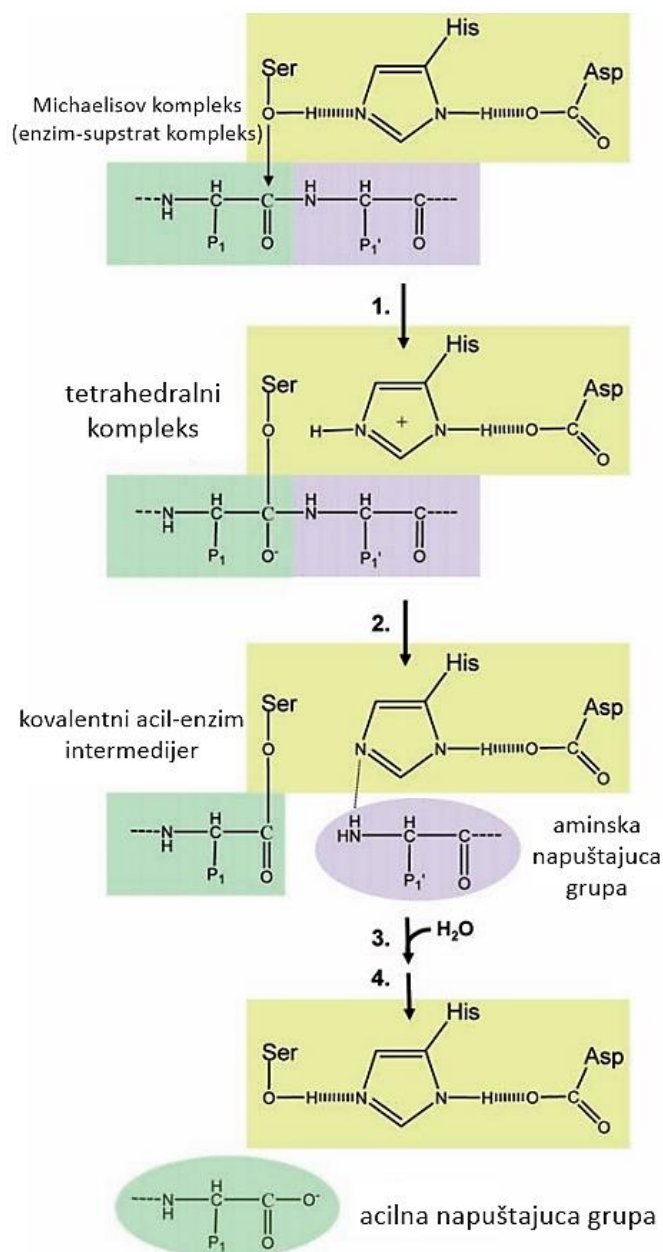
³⁴ direct antiviral agents

Za procjenu enzimske kinetike reakcije između enzima i potencijalnog inhibitora R. Zhang i suradnici s Schering-Plough instituta razvili su depsi-peptid kojeg je NS3/4A proteaza uspješno cijepala i koji nije ugrožavao njezinu aktivnost te se stoga postizala visoka osjetljivost detekcije produkta proteolize (Howe i Venkatraman, 2013).

Boceprevir i telaprevir reverzibilni su kovalentni inhibitori NS3/4A proteaze HCV. Oni su tzv. inhibitori prijelaznog stanja – stupaju u kovalentnu interakciju s aktivnim mjestom enzima, ali nisu podložni brzom konačnoj reakciji hidrolize tj. odvajanja od enzima. Razlog tome je to što se u njihovoj strukturi umjesto amidne veze nalazi keto-amidna veza. Nukleofilnom adicijom kisika iz serina na ugljik iz keto-amidne veze nastaje poluketal čija je hidroliza spora (zato su reverzibilni inhibitori) tj. potrebno je neko vrijeme da enzim postane ponovno funkcionalan. Kao i pravi supstrat enzima, ostvaruje i nekovalentne interakcije s više aminokiselina iz aktivnog mjesta enzima, uključujući i aminokiseline katalitičke trijade (Butt i Kanwal, 2012). Njihove su se početne sinteze odvijale u puno koraka – bile su zahtjevne i donosile su malu iskoristivost. Razvojem lijekova, razvijale su se i sinteze – smanjio se broj koraka i postigla se veća iskoristivost (De Luca i sur., 2014).

Osim boceprevira i telaprevira, razvijani su i drugi spojevi s inhibitornim djelovanjem na NS3/4A proteazu, ali su svi oni "pali" u nekoj fazi kliničkog ispitivanja, uglavnom zbog velike toksičnosti (De Luca i sur., 2014).

Boceprevir i telaprevir bili su indicirani za terapiju hepatitisa C uzrokovanog HCV-om genotipa 1, i to kao inicijalna terapija i kao terapija prethodno liječenih osoba. Nakon par godina primjene boceprevira i telaprevira, njihova se upotreba smanjila zbog razvoja boljih lijekova, također DAA, te su ovi lijekovi povučeni s tržišta (De Luca i sur., 2014).



Slika 6. Osnovni mehanizam reakcije serinskih proteaza (preuzeto i prilagođeno prema Schaller, 2004)

4.4.1. Boceprevir

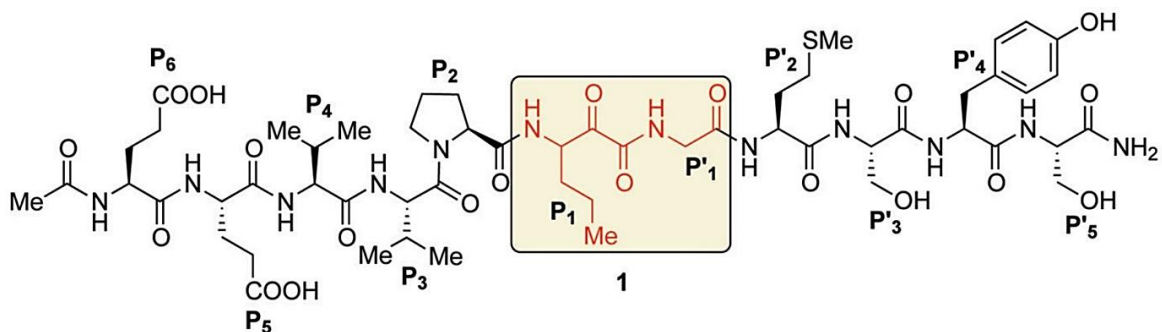
Razvoj boceprevira započeo je od undekapeptida koji je sintetiziran po uzoru na prirodni supstrat proteaze. On je pokazivao dobru aktivnost, ali loša *drug-like* svojstva (kemijska struktura prikazana na Slici 7.). Njegovom je postepenom optimizacijom kao 13. analog razvijen boceprevir (kemijska stuktura prikazana na Slici 8.).

Početne *in vitro* studije pokazale su odlična svojstva boceprevira – visoku učinkovitost, selektivno djelovanje na NS3/4A proteazu te negativan Amesov test mutagenosti. *In vivo* studije pokazale su vrlo povoljan farmakokinetički profil kod istraživanih životinja te je lijek također uspješno prošao fazu 1 i fazu 2 kliničkih ispitivanja. Faza 3 kliničkih ispitivanja bila je podijeljena na dvije randomizirane studije, jednu s prethodno liječenim, a drugu s prethodno neliječnim pacijentima. Pacijenti su liječeni kombinacijom peginterferona alfa, ribavirina i boceprevira, uz uvodnih 4 tjedna kada su dobivali samo kombinaciju peginterferona alfa i ribavirina. Kontrolnu su grupu činili pacijenti koji su dobivali peginterferon alfa i ribavirin 4 tjedna, a zatim peginterferon alfa i ribavirin plus placebo 44 tjedna. Zabilježeni su visoki postoci učinkovitosti terapije. (Howe i Venkatraman, 2013).

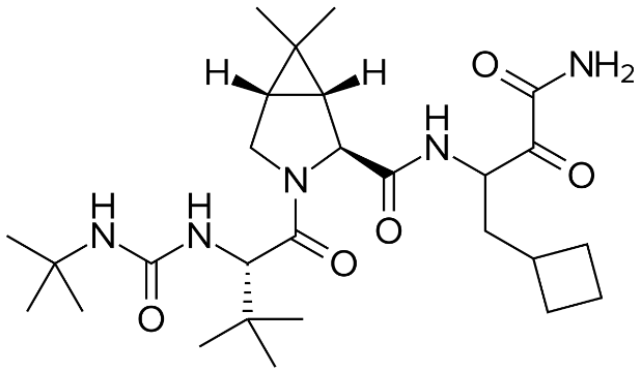
Vrijeme poluživota oralno primjenjenog boceprevira je kratko (3-5 sati) zbog opsežnog metabolizma. Oralna bioraspoloživost iznosi 65%, a hrana mu je značajno povećava te bi se zato trebao uzimati uz obrok. Dominantno se metabolizira aldo-ketoreduktazama te se izlučuje fecesom (Butt i Kanwal, 2012).

Najčešće su nuspojave anemija, neutropenija, trombocitopenija i disgeuzija (poremećeni osjet okusa) (Butt i Kanwal, 2012).

Boceprevir se primjenjivao u obliku oralnih kapsula u dozi od 800 mg tri puta na dan u kombinaciji s peginterferonom alfa i ribavirinom (trojna terapija). Duljina terapije ovisila je o prethodnom terapijskom iskustvu kao i o odgovoru na nju. Prije same primjene boceprevira, provodila se uvodna terapija peginterferonom alfa i ribavirinom 4 tjedna – time se smanjivao rizik od razvoja rezistencije te se boceprevir uvodio u terapiju kada bi ribavirin postigao maksimalni učinak (četiri su mu tjedna potrebna za postizanje ravnotežne koncentracije) (Butt i Kanwal, 2012).



Slika 7. Kemijska struktura undekapeptida iz kojeg je započeo razvoj boceprevira (Howe i Venkatraman, 2013)



Slika 8. Kemijska struktura boceprevira (Howe i Venkatraman, 2013)

4.4.2. Telaprevir

Slično kao kod boceprevira, razvoj telaprevira započeo je od dekapeptida vrlo dobrog djelovanja, ali loših *drug-like* svojstava (kemijska struktura prikazana na Slici 9.) iz kojeg je daljnjom modifikacijom razvijen telaprevir (kemijska struktura prikazana na Slici 10.).

Početne *in vitro* i *in vivo* studije također su pokazale vrlo dobra svojstva – visoka učinkovitost, selektivno djelovanje na NS3/4A proteazu, mala citotoksičnost te povoljan farmakokinetički profil. I telaprevir je zadovoljio fazu 1 i fazu 2 kliničkih ispitivanja te je ušao u fazu 3. U toj su se fazi provodile tri studije – dvije s prethodno neliječenim i jedna s prethodno liječenim pacijentima. Ispitali su se različiti režimi doziranja kombinacije telaprevira, peginterferona alfa i ribavirina (većinom režim telaprevir 12 tjedana + peginterferon alfa i ribavirin 48 tjedana). Kontrolnu su grupu činili pacijenti koji su primali peginterferon alfa i ribavirin 48 tjedana. Stopa učinkovitosti i ovdje je bila visoka (Kwong i sur., 2011).

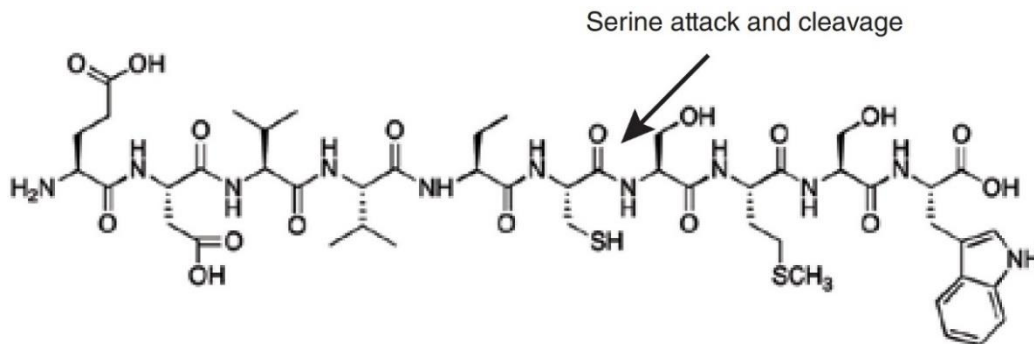
Uloga peginterferona alfa i ribavirina u kombinaciji s telaprevirom (i boceprevirom) je da se poveća sama učinkovitost terapije te da se djeluje protiv virusnih varijanti rezistentnih na telaprevir (grafički prikaz prikazan na Slici 11.) (Kwong i sur., 2011).

Vrijeme poluživota telaprevira je kratko (4-5 sati). Bioraspoloživost mu povećava masna hrana te bi se trebao uzimati uz obrok koji sadrži barem 20 grama masti. Dominantno se metabolizira CYP3A4 enzimom i izlučuje fecesom (Butt i Kanwal, 2012).

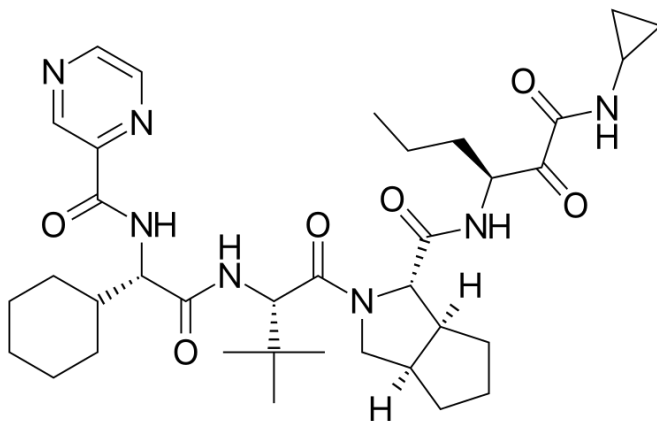
Najčešće su nuspojave anemija, kožni osip, pruritis, gastrointestinalni problemi i hemeroidi.

Telaprevir se primjenjivao u obliku oralnih tableta u dozi od 750 mg tri puta na dan, također kao trojna terapija. Duljina terapije ovisila je o prethodnom terapijskom iskustvu kao i o

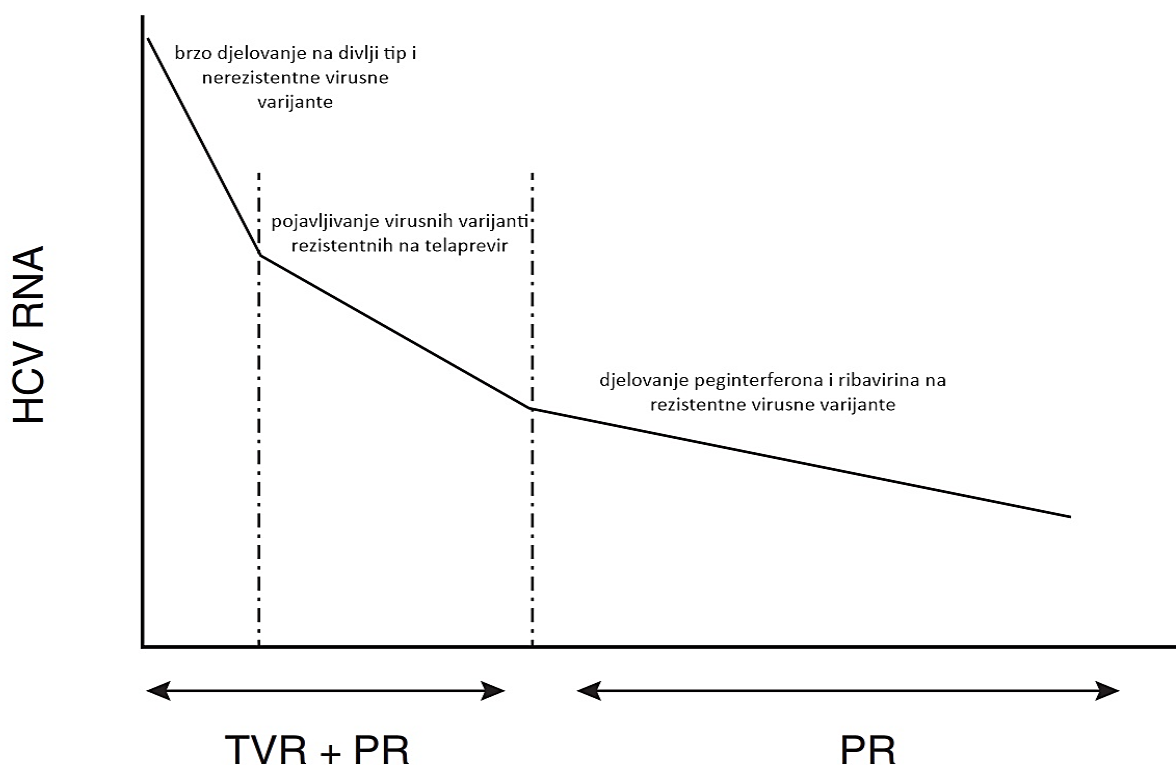
odgovoru na nju. Uvodna terapija od 4 tjedna nije se prevodila u slučaju telaprevira (Butt i Kanwal, 2012).



Slika 9. Kemijska struktura decapeptida iz kojeg je započeo razvoj boceprevira (Kwong i sur., 2011)



Slika 10. Kemijska struktura telaprevira (Kwong i sur., 2011)



Slika 11. Grafički prikaz trofaznog djelovanja terapijskog režima telaprevir (TVR) + peginterferon alfa + ribavirin (PR) (preuzeto i prilagođeno prema Kwong i sur., 2011)

U početku terapije kombinacija TVR i PR vrlo uspješno djeluje na divlji tip virusa (razina HCV RNA ubrzano opada). Nakon određenog vremena pojavljuju se virusne varijante rezistentne na TVR i tada njegovo djelovanje opada, a nastavlja se djelovanje PR kojim se postiže konačno smanjenje HCV RNA.

4.5. Razvoj DAA terapije

U narednim godinama dolazi do ubrzanog razvoja izravnih antivirusika za hepatitis C. Njihove su mete bile NS3/4A proteaza, NS5B RNA ovisna RNA polimeraza i NS5A protein. Zbog visoke učinkovitosti sve su se više koristile njihove kombinacije, a peginterferon alfa i ribavirin sve su više padali u zaborav. Većina odobrenih lijekova bile su upravo takve kombinacije, uglavnom u jednoj tableti. U Tablici 6. prikazan je kronološki slijed odobrenja izravnih antivirusika za hepatitis C.

Tablica 6. Kronološki slijed prvih odobrenja izravnih antivirusika za hepatitis C (<https://www.hepmag.com/blog/hepatitis-c-treatment-history-timeline>)

| Godina | Odobreni lijekovi – crveno su označeni inhibitori NS3/4A proteaze, ljubičasto inhibitori NS5B RNA ovisne RNA polimeraze i zeleno inhibitori NS5A proteina |
|--------|--|
| 2011. | boceprevir telaprevir |
| 2013. | simeprevir sofosbuvir |
| 2014. | sofosbuvir + ledipasvir paritaprevir + ombitasvir + ritonavir + dasabuvir |
| 2015. | daklatasvir asunaprevir (Japan) |
| 2016. | beklabuvir (Japan) grazoprevir + elbasvir sofosbuvir + velpatasvir |
| 2017. | sofosbuvir + velpatasvir + voksilaprevir glekaprevir + pibrentasvir |

4.5.1. Novi inhibitori NS3/4A proteaze

Ubrzo nakon razvoja inhibitora NS3/4A proteaze prve generacije (boceprevir i telaprevir), razvijaju se i inhibitori druge generacije. To je bilo potrebno zbog mnogobrojnih nedostataka inhibitora prve generacije – djelovanje samo na genotip 1, razvoj virusne rezistencije, potreba za korištenjem visokih doza i izražene nuspojave.

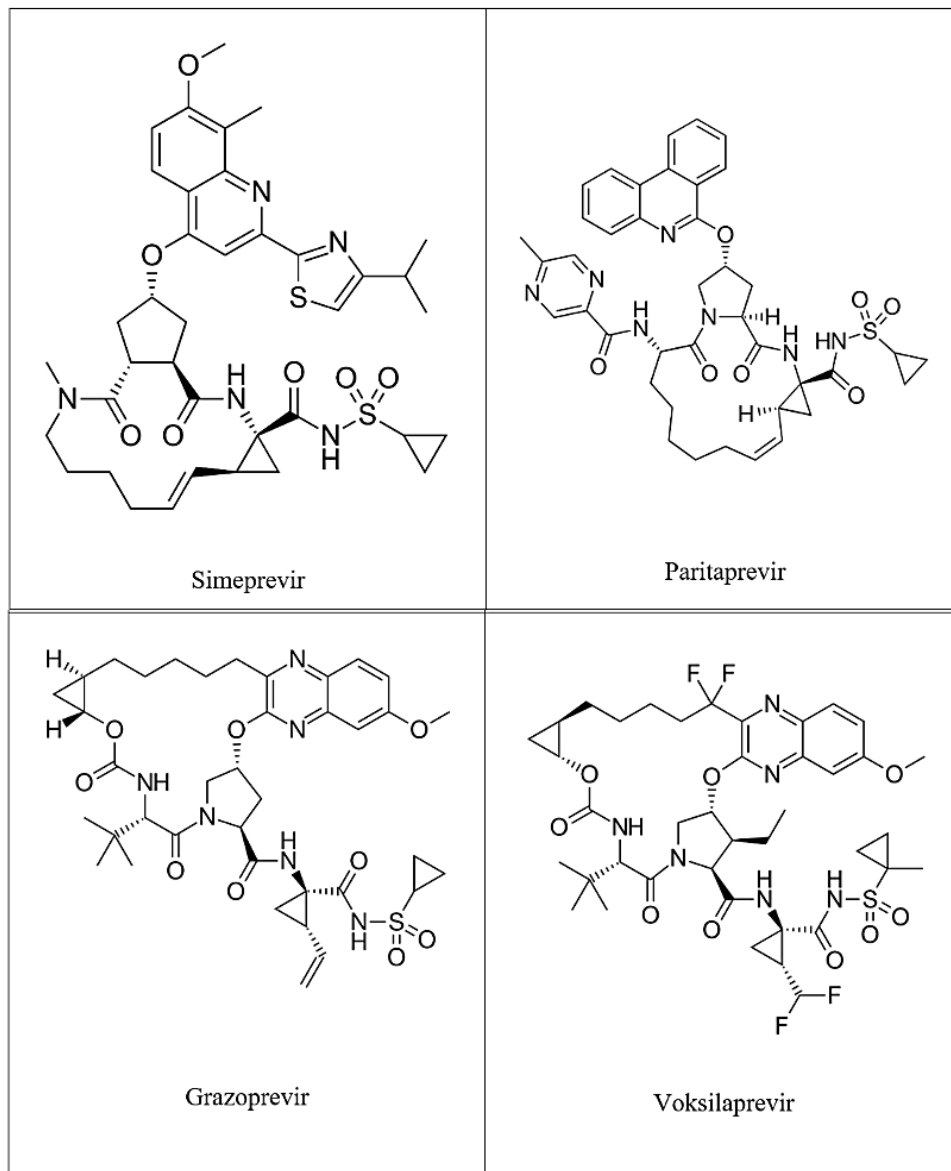
Inhibitori druge generacije djeluju reverzibilno nekovalentno. Ostvaruju nekovalentne interakcije s aktivnim mjestom NS3/4A proteaze te sporo disociraju iz aktivnog mjesta.

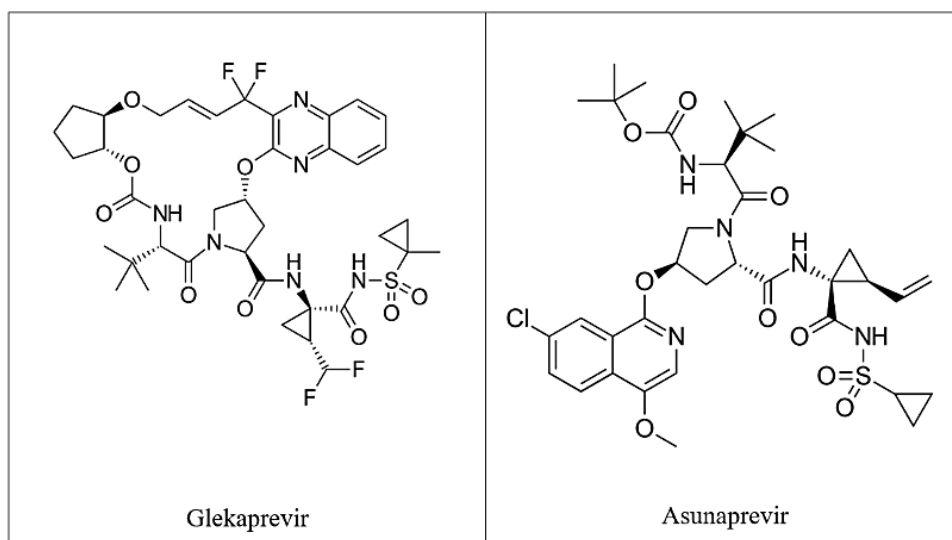
Iako ih je mnogo bilo u razvoju, samo su neki odobreni i to: simeprevir, paritaprevir, grazoprevir, voksilaprevir, glekaprevir i asunaprevir (u Japanu).

Svi oni u svojoj strukturi sadrže makrociklički prsten koji osigurava rigidnost molekule i optimalnu konformaciju (Slika 12.)

Novi inhibitori NS3/4A proteaze HCV-a, također su, kao i inhibitori prve generacije, razvijani molekulskim modeliranjem. Međutim, problem genotipske selektivnosti nije u potpunosti bio riješen njihovom razvojem jer ih je većina i dalje najbolje djelovala na genotip 1, uz nešto slabija djelovanja na ostale genotipove (de Leuw i Stephan, 2018).

U Tablici 7. i Tablici 8. prikazane su informacije o inhibitorima NS3/4A proteaze druge generacije.





Slika 12. Kemijske strukture inhibitora NS3/4A proteaze druge generacije (preuzeto i prilagođeno prema Sharma i sur., 2017)

Tablica 7. Osnovne informacije o inhibitorima NS3/4A proteaze druge generacije (de Leuw i Stephan, 2018)

| | Simeprevir | Paritaprevir | Grazoprevir |
|--------------------------|--|---|---|
| Djelovanje na genotipove | 1, 4 i 6 – bio odobren samo za genotip 1 | 1 i 4 | 1 i 4 |
| Najčešće nuspojave | dispneja, mučnina, fotoosjetljivost | anemija, mučnina, nesanica, astenija, pruritus (u kombinaciji s ombitasvirom i ritonavirovom) | astenija, mučnina, glavobolja (u kombinaciji s elbasvirom) |
| Doziranje | oralna kapsula u dozi od 150 mg jednom dnevno uz obrok kroz 12-24 tjedna | dvije oralne tablete u dozi od 75 mg jednom dnevno uz obrok kroz 12-24 tjedna (u istoj su tableti ombitasvir i ritonavir) | oralna tableta u dozi od 100 mg kroz 12 tjedana (u istoj je tableti elbasvir) |

| | | | |
|------------------|--|---|------------------------------------|
| Kombinacije | simeprevir + peginterferon alfa + ribavirin ili simeprevir + sofosbuvir + ribavirin | paritaprevir + ombitasvir + ritonavir + dasabuvir ili paritaprevir + ombitasvir + ritonavir + dasabuvir + ribavirin ili paritaprevir + ombitasvir + ritonavir + ribavirin | grazoprevir + elbasvir |
| Koristi se danas | Ne | Ne | Da (u kombinaciji s elbasvirom) |

| | Voksilaprevir | Glekaprevir | Asunaprevir |
|-----------------------------|---|--|--|
| Djelovanje na genotipove | 1-6 | 1-6 | 1, 4, 5 i 6 – odobren samo za genotip 1 |
| Najčešće nuspojave | glavobolja, mučnina, proljev | glavobolja, mučnina, pruritus | glavobolja, astenija, osip |
| Doziranje | oralna tableta u dozi od 100 mg jednom dnevno uz obrok kroz 8-12 tjedana (u istoj su tableti sofosbuvir i velpatasvir) | tri oralne tablete u dozi od 100 mg jednom dnevno uz obrok kroz 8-16 tjedana (u istoj je tableti pibrentasvir) | oralna kapsula u dozi od 100 mg dva puta dnevno uz obrok kroz 24 tjedna |
| Kombinacije | voksilaprevir + sofosbuvir + velpatasvir | glekaprevir + pibrentasvir | asunaprevir + daklatasvir ili asunaprevir + daklatasvir + peginterferon alfa + ribavirin |

| | | | |
|------------------|--|-------------------------------------|----------|
| Koristi se danas | Da (u kombinaciji s sofosbuvvirom i velpatasvirom) | Da (u kombinaciji s pibrentasvirom) | u Japanu |
|------------------|--|-------------------------------------|----------|

Tablica 8. Farmakokinetika inhibitora NS3/4A proteaze druge generacije (de Leuw i Stephan, 2018)

| Lijek | Oralna bioraspoloživost (%) / utjecaj hrane | Vrijeme poluživota u plazmi ($t_{1/2}$) | Metabolizam | Eliminacija |
|---------------|---|--|----------------------------|--------------------|
| Simeprevir | 62% / povećava se uz hranu | kod zdravih ispitanika 10-13 h, kod osoba s hepatitisom C 41 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Paritaprevir | 50% / povećava se uz hranu | 5,5 h (u kombinaciji s ritonaviirom ³⁵) | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Grazoprevir | 27% / nema utjecaja hrane | 31 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Voksilaprevir | nepoznat podatak / povećava se uz hranu | 33 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Glekaprevir | nepoznat podatak / povećava se uz hranu | 6 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Asunaprevir | 9,3% / povećava se uz masnu hranu | 15-20 h | dominantno CYP3A4 i CYP3A5 | dominantno fecesom |

³⁵ antiretrovirusni lijek koji djeluje kao inhibitor metaboličkog enzima CYP3A4 preko kojeg se metabolizira paritaprevir te se tako postižu veće koncentracije paritaprevira u organizmu

4.5.2. Inhibitori NS5B RNA ovisne RNA polimeraze

NS5B protein HCV ima funkciju RNA ovisne RNA polimeraze – na temelju postojećeg RNA predloška sintetizira novi RNA lanac. Kao i većini virusnih polimeraza, i njezina struktura nalikuje na desnu ruku tj. sadrži tri domene – dlan, prsti i palac. Aktivno se mjesto nalazi unutar domene dlana i sadrži tri očuvane aminokiseline – DDD motiv (tri asparaginske kiseline). Te se tri aminokiseline vežu s dva iona magnezija koji stabiliziraju čitav kompleks te olakšavaju nukleofilni napad 3'-hidroksilne grupe prethodnog nukleotida na α -fosfat novodolazećeg nukleotida (Gentile i sur., 2015).

Blokiranjem ovog enzima sprječava se stvaranje novih virusnih čestica te je zato NS5B protein odlična meta djelovanja izravnih antivirusika.

Razvijene su dvije skupine lijekova – nukleotidni (NI) i nenukleozidni inhibitori (NNI).

Jedini nukleotidni inhibitor NS5B RNA ovisne RNA polimeraze koji je prošao sva klinička ispitivanja i došao do razine primjene je sofosbuvir čija je kemijska struktura prikazana na Slici 13. Jedna je od hidroksilnih skupina fosfata u njegovoj strukturi zamijenjena amidom (fosforamidat). Kaskadom enzimskih i kemijskih metaboličkih reakcija iz prolijeka u hepatocitima nastaje aktivni trifosfat. Sofosbuvir je supstrat RNA polimeraze i ugrađuje se u rastući RNA lanac, ali njegova struktura, točnije metil na C2', sterički ometa vezanje idućeg nukleotida – dolazi do terminacije RNA lanca (Gentile i sur., 2015).

Budući da je nukleotidno vezno mjesto na NS5B proteinu isto za sve genotipove HCV-a, te različito od veznih mjesta ljudskih DNA i RNA polimeraza, sofosbuvir djeluje selektivno na virus i to na sve njegove genotipove. Rezistencija nije opažena.

Sofosbuvir je razvijen molekulskim modeliranjem nukleozida. Lijek je morao biti u obliku monofosfata budući da se nukleozid ne može fosforilirati u stanici.

Vrijeme poluživota sofosbuvira je 0,4 h. Hrana mu povećava bioraspoloživost. Dominantno se metabolizira enzimima Cat A³⁶ i CES1³⁷ te se izlučuje urinom.

Najčešće su nuspojave su glavobolja, nesаница, nazofaringitis, pruritus, povišen bilirubin i anemija.

Danas se na tržištu nalazi zasebno (može se kombinirati s ribavirinom) te u fiksnim kombinacijama s ledipasvirom ili velpatasvirom ili velpatasvirom + voksilaprevirom. U svim

³⁶ katepsin A

³⁷ karboksil-esteraza 1

se tim opcijama primjenjuje u obliku oralnih tableta u dozi od 400 mg jednom dnevno kroz 8-24 tjedna, ovisno o kombinaciji i stanju pacijenta. U početku se kombinirao i s peginterferonom alfa i ribavirinom.

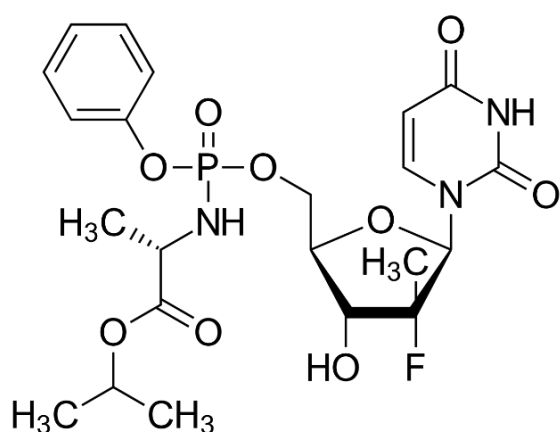
Kombinacija sofosbuvira i velpatasvira, odobrena 2016. godine bila je prva odobrena terapija za sve genotipove – pokazala je visoku učinkovitost i male nuspojave (Gentile i sur., 2015).

Dva su nenukleozidna inhibitora NS5B RNA ovisne RNA polimeraze došla do razine primjene za liječenje hepatitisa C – dasabuvir te beclabuvir u Japanu. Njihove su kemijske strukture prikazane na Slici 14. Oni djeluju kao alosterički inhibitori – vežu se na alosteričko mjesto na domeni dlana enzima te uzrokuju konformacijske promjene enzima koje dovode do njegove neaktivnosti (El Kassas i sur., 2017).

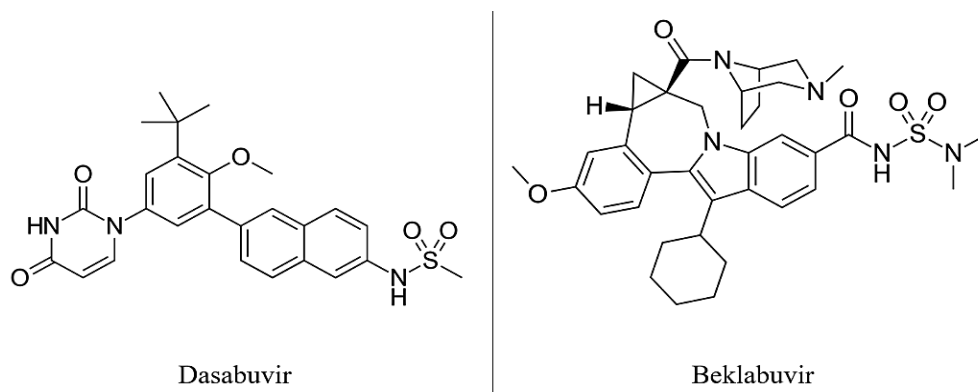
Također djeluju selektivno na virus, odnosno ne djeluju na ljudske polimeraze, ali, za razliku od sofosbuvira, djeluju isključivo na genotip 1 HCV-a. Problem predstavlja i ubrzani razvoj rezistencije.

Vrijeme poluživota dasabuvira je 6 h. Oralna bioraspoloživost iznosi 70% i hrana je dodatno povećava.

Zbog razvoja boljih lijekova dasabuvir danas više nije u primjeni. Ranije se primjenjivao u kombinaciji s paritaprevirom, ombitasvirom i ritonavirovom u obliku oralne tablete u dozi od 250 mg dva puta dnevno kroz 12-24 tjedna. Najčešće nuspojave takve kombinacije bile su nesаница, mučnina i anemija (El Kassas i sur., 2017).



Slika 13. Kemijska struktura sofosbuvira (Gentile i sur., 2015)



Slika 14. Kemijske strukture dasabuvira i beklabuvira (preuzeto i prilagođeno prema El Kassas i sur., 2017)

4.5.3. Inhibitori NS5A proteina

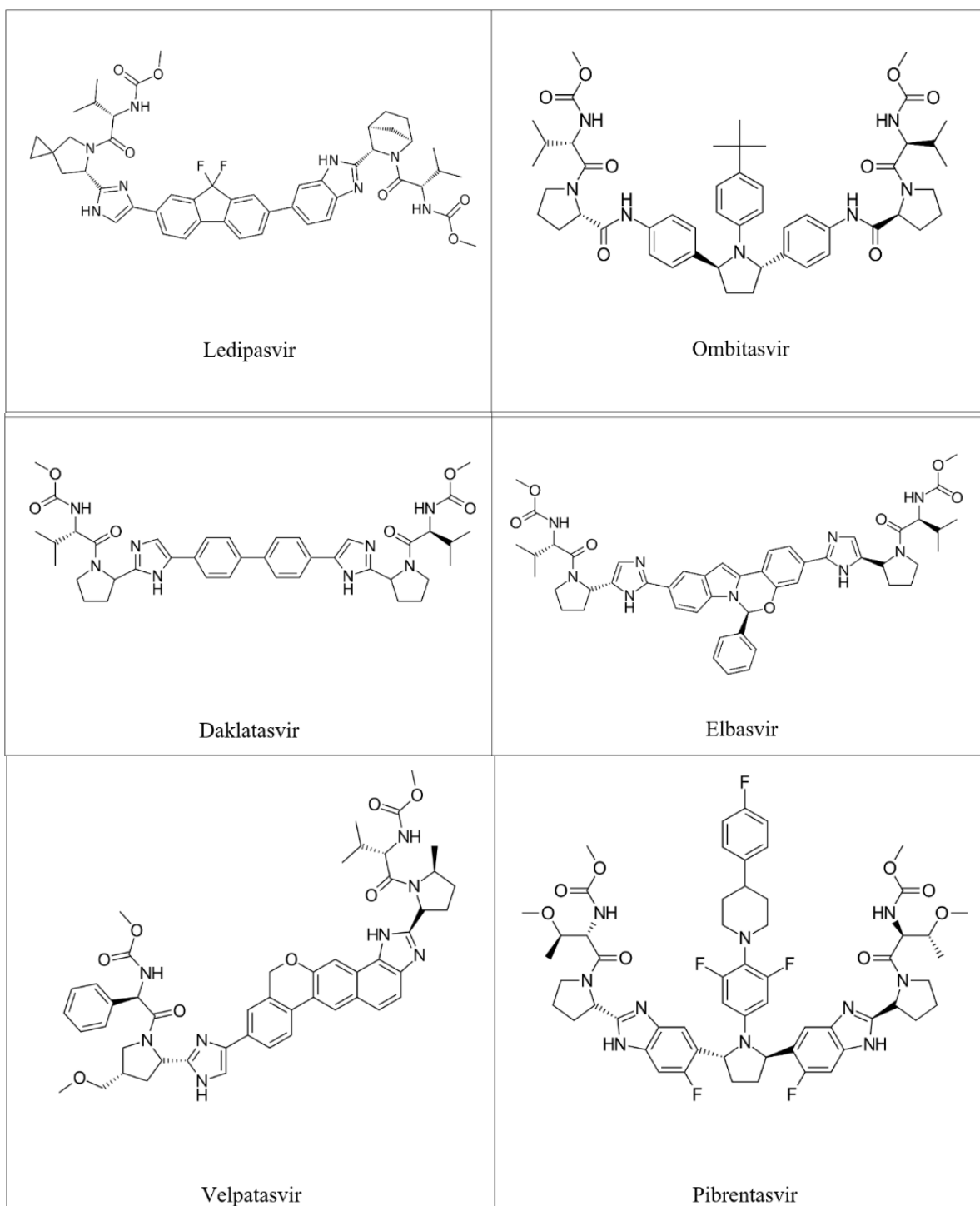
NS5A protein hidrofilni je fosfoprotein bogat prolinom. Sastoji se od tri domene i u svojoj strukturi sadrži ion cinka. Javlja se u dva različito fosforilirana oblika – p56 i p58. N-terminalni dio oblikuje amfipatski α -heliks važan za lokalizaciju NS5A proteina u membranu endoplazmatskog retikuluma (Gitto i sur., 2017).

Mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali zna se da ovaj protein ima važnu ulogu u replikaciji i patogenezi virusa budući da stabilizira replikacijski kompleks te stupa u interakcije s ostalim virusnim proteinima, ali i s proteinima stanice domaćina te tako pomaže u razvoju i širenju virusa. Iz tih je razloga prepoznat kao vrlo dobra meta izravnih antivirusa za hepatitis C (Gitto i sur., 2017).

Više je inhibitora NS5A proteina uspješno prošlo klinička ispitivanja i ušlo u primjenu – ledipasvir, ombitasvir, daklatasvir, elbasvir, velpatasvir i pibrentasvir. Svi se oni vežu na domenu 1 proteina te ga tako inhibiraju i to djelujući na sve genotipove HCV-a. Većina se primjenjivala u kombinaciji s drugim DAA te su u primjeni i danas. Njihove su kemijske strukture prikazane na Slici 15. (Gitto i sur., 2017)

Iako ne i prvi odobreni, prvi otkriveni inhibitor NS5A proteina bio je daklatasvir. Razvijen je procesima fenotipskog probiranja i pretraživanja visokog kapaciteta. Fenotipski je probir postupak u kojem se provjerava dolazi li do promijene određenog fenotipa stanice nakon primjene lijeka kandidata. Pretraživanje visokog kapaciteta je postupak koji omogućava ispitivanje svojstava puno spojeva u kratkom vremenu (Belema i Meanwell, 2014).

U Tablici 9. i Tablici 10. prikazane su informacije o inhibitorima NS5A proteina.



Slika 15. Kemijske strukture inhibitora NS5A proteina (preuzeto i prilagođeno prema go.drugbank.com)

Tablica 9. Osnovne informacije o inhibitorima NS5A proteina (Gitto i sur., 2017)

| | Ledipasvir | Ombitasvir | Daklatasvir |
|--------------------|---|---|--|
| Najčešće nuspojave | problemi sa spavanjem, glavobolja, mučnina | problemi sa spavanjem, mučnina, pruritus | umor, glavobolja, mučnina |
| Doziranje | oralna tableta u dozi od 90 mg jednom dnevno uz obrok kroz 12-24 tjedna (u istoj je tableti sofosbuvir) | dvije oralne tablete u dozi od 12,5 mg jednom dnevno uz obrok kroz 12-24 tjedna (u istoj su tableti paritaprevir i ritonavir) | oralna tableta u dozi od 60 mg jednom dnevno kroz 12-24 tjedna |
| Kombinacije | ledipasvir + sofosbuvir | ombitasvir + paritaprevir + ritonavir + dasabuvir ili ombitasvir + paritaprevir + ritonavir + dasabuvir + ribavirin ili ombitasvir + paritaprevir + ritonavir + ribavirin | / |
| Koristi se danas | Da (u kombinaciji sa sofosbuvikom) | Ne | Ne |

| | Elbasvir | Velpatasvir | Pibrentasvir |
|--------------------|---|---|--|
| Najčešće nuspojave | glavobolja, mučnina, bolovi u abdomenu | problemi sa spavanjem, glavobolja, osip | umor, glavobolja, pruritus |
| Doziranje | oralna tableta u dozi od 50 mg jednom dnevno kroz 12-24 tjedna (u istoj je tableti grazoprevir) | oralna tableta u dozi od 100 mg jednom dnevno kroz 12 tjedana (u istoj je tableti sofosbuvir (i voksilaprevir)) | tri oralne tablete u dozi od 40 mg jednom dnevno uz obrok kroz 8-16 tjedana (u istoj je tableti glekaprevir) |
| Kombinacije | elbasvir + grazoprevir | velpatasvir + sofosbuvir ili velpatasvir + sofosbuvir + voksilaprevir | pibrentasvir + glekaprevir |
| Koristi se danas | Da (u kombinaciji s grazoprevirom) | Da (u kombinaciji sa sofosbuvvirom ili sofosbuvvirom i voksilaprevirom) | Da (u kombinaciji s glekaprevirom) |

Tablica 10. Farmakokinetika inhibitora NS5A proteina (Gitto i sur., 2017)

| Lijek | Oralna bioraspoloživost (%) / utjecaj hrane | Vrijeme poluživota u plazmi ($t_{1/2}$) | Metabolizam | Eliminacija |
|-------------|---|---|-------------------|--------------------|
| Ledipasvir | 76% / povećava se uz hranu | 47 h | nije izražen | dominantno fecesom |
| Ombitasvir | 48% / povećava se uz hranu | 21-25 h | dominantno CYP2C8 | dominantno fecesom |
| Daklatasvir | 67% / nema utjecaja hrane | 12-15 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |

| | | | | |
|--------------|---|------|-------------------------|--------------------|
| Elbasvir | 32% / nema utjecaja hrane | 24 h | dominantno CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Velaptasvir | 25-30% / nema utjecaja hrane | 15 h | CYP2B6, CYP2C8 i CYP3A4 | dominantno fecesom |
| Pibrentasvir | nepoznat podatak / povećava se uz hranu | 13 h | nije izražen | dominantno fecesom |

4.6. Terapija danas

Danas u terapiji hepatitisa C dominiraju izravni antivirusici uz rjeđu primjenu ribavirina. Razlog tome je njihova velika učinkovitost i mali spektar nuspojava. Terapijski režim ovisi o genotipu virusa i stanju bolesnika. Većina ih uključuje kombinacije izravnih antivirusika čime se postiže bolja učinkovitost i smanjena mogućnost za razvoj rezistencije.

U idućim su tablicama (11 – 13) sažeti prikazi terapijskih režima dostupnih u Republici Hrvatskoj, kao i njihovih indikacija.

Tablica 11. Lijekovi za hepatitis C dostupni u Republici Hrvatskoj 2021. godine (<https://bfm.hr/hepatitis-c/>)

| Lijek | Oblik | Doziranje |
|--|------------------------------------|--------------------------------------|
| sofosbuvir | tablete (400 mg) | 1 tableta dnevno |
| sofosbuvir + ledipasvir | tablete (400 mg + 90 mg) | 1 tableta dnevno |
| sofosbuvir + velpatasvir | tablete (400 mg + 100 mg) | 1 tableta dnevno |
| sofosbuvir + velpatasvir + voksilaprevir | tablete (400 mg + 100 mg + 100 mg) | 1 tableta dnevno uz obrok |
| glekaprevir + pibrentasvir | tablete (100 mg + 40 mg) | 3 tablete jednom dnevno uz obrok |
| grazoprevir + elbasvir | tablete (100 mg + 50 mg) | 1 tableta dnevno |
| Ribavirin (dodatak DAA kombinacijama kod dekompenzirane ciroze jetre ili prisustva NS5A rezistencije) | kapsule (200 mg) | 2 kapsule ujutro i 3 kapsule navečer |

Tablica 12. Hrvatske preporuke za liječenje bolesnika s kroničnim hepatitisom C bez ciroze jetre ili s kompenziranom cirozom jetre 2021. godine (<https://bfm.hr/hepatitis-c/>)

| Genotip | Stadij fibroze | Prethodno liječenje | Sofosbuvir + velpatasvir | Glekaprevir + pibrentasvir | Grazoprevir + elbasvir | Sofosbuvir + ledipasvir | |
|--------------------|-----------------|---------------------|--|----------------------------|---------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 1a, 1b, 2, 4, 5, 6 | F1-F3 | ne | 12 tjedana | 8 tjedana | 12 tjedana (samo za genotip 1b) | 12 tjedana (genotip 1 i 4) | |
| | | da | | | | Ne | |
| | kompenz. ciroza | ne | | 12 tjedana | | 12 tjedana | 12 tjedana (genotip 1 i 4) |
| | | da | | | | | Ne |
| 3 | F1-F3 | ne | 12 tjedana | 8 tjedana | Ne | Ne | |
| | | da | | 8 tjedana | | | |
| | kompenz. ciroza | ne | 12 tjedana uz ribavirin ili 24 tjedna bez ribavirina | 12 tjedana | | | |
| | | da | | 16 tjedana | | | |

Tablica 13. Hrvatske preporuke za liječenje djece s kroničnim hepatitisom 2021. godine (<https://bfm.hr/hepatitis-c/>)

| Genotip | Dob | Sofosbuvir + velpatasvir | Glekaprevir + pibrentasvir |
|---------|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| 1-6 | 6-12 godina (17-30 kg) | 12 tjedana | Ne |
| | 6-12 godina (> 30 kg) | 12 tjedana | Ne |
| | > 12 godina | 12 tjedana | 12 tjedana |

Preporuke za liječenje bolesnika s kroničnim hepatitisom C s dekompenziranom cirozom jetre (MELD *score*³⁸ < 18-20³⁹) bez HCC prije transplantacije 2021. godine su iduće za sve genotipove: kombinacija sofosbuvira, velpatasvira i ribavirina kroz 12 tjedana ili sofosbuvira i velpatasvira kroz 24 tjedna (<https://bfm.hr/hepatitis-c/>).

Preporuka za liječenje bolesnika s kroničnim hepatitisom C koji su prethodno neuspješno liječeni izravnim antivirusicima (izuzev prethodno liječene kombinacijom sofosbuvira i ribavirina, koji se liječe kako je navedeno u Tablici 12.) 2021. godine je iduća za sve genotipove: kombinacija sofosbuvira, velpatasvira i voksilaprevira kroz 12 tjedana (<https://bfm.hr/hepatitis-c/>)

4.7. Terapija sutra

S obzirom na veliku učinkovitost postojećih lijekova za hepatitis C (> 90%), razvoj novih lijekova pomalo stagnira. Veća se pažnja posvećuje smanjenju općepopulacijske incidencije hepatitisa C kao i reinfekcije među rizičnim skupinama – zbog zdravstvenih, ali i ekonomskih razloga (lijekovi za hepatitis C vrlo su skupi i predstavljaju velik trošak za zdravstveni sustav). Jedan od načina za postizanje toga je edukacija stanovništva o zarazi i putevima prijenosa HCV-a, ali svakako bi najbolji način bio razvoj cjepiva protiv HCV-a. To je otežano iz nekoliko razloga. Prvo, činjenica da postoji više genotipova koji se međusobno razlikuju u 30% nukleotidne sekvence i koji se dalje dijele u mnoštvo podtipova koji se međusobno razlikuju u 15% nukleotidne sekvence. Drugo, HCV ima razvijene mehanizme "skrivanja" od imunskog odgovora domaćina. Treće, incidencija hepatitisa C nije velika u razvijenim gradovima i državama. Bolest je uglavnom raširena u zemljama u razvoju gdje je otežano provođenje kliničkih ispitivanja. Ipak, znanost se razvija i znanstvenici ne odustaju – iz dana u dan rade na novim otkrićima i na razvoju cjepiva protiv hepatitisa C. Tako je danas u tijeku više kliničkih ispitivanja usredotočenih na razvoj cjepiva – neka su cjepiva ušla i u fazu 2 kliničkih ispitivanja (Todryk i sur., 2021).

Od novijih lijekova valja spomenuti kombinaciju uprifosbuvira (inhibitor NS5B RNA ovisne RNA polimeraze) i ruzasvira (inhibitor NS5A proteina) koja je trenutno u fazi 3 kliničkih ispitivanja (<https://newdrugapprovals.org/2021/06/28/uprifosbuvir/>).

³⁸ model for end-stage liver disease – sustav bodovanja za procjenu težine kronične bolesti jetre

³⁹ kod bolesnika s MELD *scoreom* > 18-20 preporuča se prvo obaviti transplantaciju, a zatim započeti terapiju

Također se radi na inhibitorima ulaska HCV-a u stanicu – ti bi lijekovi bili korisni u slučajevima kada je potrebno obaviti i transplantaciju organa zaraženog pacijenta, ali i za terapiju ostalih pacijenata kako bi se liječenje dodatno poboljšalo i skratilo.

Ulazak virusa u stanicu proces je od više koraka i više potencijalnih meta djelovanja – moguće je djelovati na virusne ili stanične faktore. Potencijalne virusne mete su virusni glikoproteini važni za vezanje i fuziju virusa (npr. E2). Potencijalne stanične mete su receptori i faktori koji osiguravaju vezanje virusa – CD81, SR-B1 i CLDN1. Spojevi koji djeluju na neke od tih meta već su u različitim fazama razvoja – npr. mali spoj ITX5061 koji je inhibitor SR-B1 receptora. Jedna od perspektivnijih strategija jest razvoj monoklonskih protutijela koja bi djelovala na te virusne ili stanične faktore (Colpitts i sur., 2017).

5. ZAKLJUČCI

- Hepatitis C je upala jetrenog tkiva uzrokovana istoimenim virusom (HCV) otkrivenim 1989. godine.
- Klinički se razlikuju akutni i kronični oblik hepatitisa C.
- HCV je mali RNA virus građen od strukturnih i nestrukturnih proteina, a svi oni imaju važnu ulogu u životnom ciklusu i patogenezi virusa te su neki od njih iskorišteni kao mete antivirusnih lijekova.
- Postoji 7 genotipova HCV-a, različito prisutnih u određenim dijelovima svijeta.
- HCV se prenosi isključivo parenteralnim putem (dijeljenje igala i šprica, tetoviranje i stavljanje *piercinga* nesteriliziranim priborom te slični postupci koji uključuju korištenje pribora koji je bio u dodiru sa zaraženom krvlju).
- Većina oboljelih s kroničnim hepatitisom C je asimptomatsko desetljećima – simptomi se uglavnom razvijaju kada je jetra već jako oštećena.
- Za dijagnostiku hepatitisa C razvijeni su serološki testovi, antigenski testovi i testovi amplifikacije nukleinske kiseline.
- Prvi lijekovi koji su se koristili za liječenje hepatitisa C bili su neizravni antivirolici odnosno djelovali su na imunski sustav domaćina, a ne na sam virus – (peg)interferon alfa i ribavirin. Slaba učinkovitost i brojne nuspojave bile su nedostatak ovih lijekova.
- Godinama su se postepeno proučavale potencijalne virusne mete za nove generacije izravnih antivirusa – oni ostvaruju djelovanje preko inhibicije NS3/4A proteaze, NS5B RNA ovisne RNA polimeraze ili NS5A proteina virusa.
- Izravni antivirolici pokazuju veliku učinkovitost i dobru podnošljivost s malo nuspojava.
- Danas su u primjeni različite kombinacije izravnih antivirusa kako bi se poboljšala učinkovitost te smanjio rizik razvoja rezistencije na terapiju.
- Budući cilj je razvoj cjepiva protiv HCV-a i potpuna eliminacija virusa iz populacije.

6. LITERATURA

1. Haji Abdolvahab M, Mofrad MR, Schellekens H. Interferon Beta: From Molecular Level to Therapeutic Effects. *Int Rev Cell and Mol Biol*, 2016, 326, 343-372.
2. Basyte-Bacevice V, Kupcinskas J. Evolution and Revolution of Hepatitis C Management: From Non-A, Non-B Hepatitis Toward Global Elimination. *Dig Dis*, 2020, Jan 6, 1-6.
3. Belema M, Meanwell NA. Discovery of Daclatasvir, a Pan-Genotypic Hepatitis C Virus NS5A Replication Complex Inhibitor with Potent Clinical Effect. *J Med Chem*, 2014, 57(12), 5057-5071.
4. Botelho-Souza LF, Vasconcelos MPA, dos Santos AO, Salcedo JMV, Vieira DS. Hepatitis delta: virological and clinical aspects. *Virol J*, 2017, 14(1), 177.
5. Butt AA, Kanwal F. Boceprevir and Telaprevir in the Management of Hepatitis C Virus-Infected Patients. *Clin Infect Dis*, 2012, 54(1), 96-104.
6. Clemente MG, Schwarz K. Hepatitis: General principles. *Pediatr Rev*, 2011, 32(8), 333-340.
7. Colpitts CC, Chung RT, Baumert TF. Entry Inhibitors: A Perspective for Prevention of Hepatitis C Virus Infection in Organ Transplantation. *ACS Infect Dis*, 2017, 3(9), 620-623.
8. Damodaran VB, Fee C. Protein PEGylation: An overview of chemistry and process considerations. *Eur Pharm Rev*, 2010.
<https://www.europeanpharmaceuticalreview.com/article/494/protein-pegylation-process/>, pristupljeno 4.8.2021.
9. de Leuw P, Stephan C. Protease inhibitor therapy for hepatitis C virus-infection. *Expert Opin Pharmacother*, 2018, 19(6), 577-587.
10. De Luca A, Bianco C, Rossetti B. Treatment of HCV infection with the novel NS3/4A protease inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*, 2014, 18, 9-17.

11. Drug Bank – ledipasvir, ombitasvir, daklatasvir, elbasvir, velpatasvir i pibrentasvir
go.drugbank.com, pristupljeno 23.8.2021.
12. El Kassas M, Elbaz T, Hafez E, Wifi MN, Esmat G. Discovery and preclinical development of dasabuvir for the treatment of hepatitis C infection. *Expert Opin Drug Discov*, 2017, 12(6), 635-642.
13. Gentile I, Maraolo AE, Buonomo AR, Zappulo E, Borgia G. The discovery of sofosbuvir: a revolution for therapy of chronic hepatitis C. *Expert Opin Drug Discov*, 2015, 10(12), 1363-1377.
14. Ginn C, Khalili H, Lever R, Brocchini S. PEGylation and its impact on the design of new protein-based medicines. *Future Med Chem*, 2014, 6(16), 1829-1846.
15. Gitto S, Gamal N, Andreone P. NS5A inhibitors for the treatment of hepatitis C infection. *J Viral Hepat*, 2017, 24(3), 180-186.
16. Han R, Zhou J, François C, Toumi M. Prevalence of hepatitis C infection among the general population and high-risk groups in the EU/EEA: a systematic review update. *BMC Infect Dis*, 2019, 19(1), 655.
17. Hep Mag – Hepatitis C Treatment History Guideline
<https://www.hepmag.com/blog/hepatitis-c-treatment-history-timeline>, pristupljeno 19.8.2021.
18. Hepatitis C Online – Peginterferon alfa-2a
<https://www.hepatitisc.uw.edu/page/treatment/drugs/peginterferon-alfa-drug>, pristupljeno 4.8.2021.
19. Howe AY, Venkatraman S. The Discovery and Development of Boceprevir: A Novel, First-generation Inhibitor of the Hepatitis C Virus NS3/4A Serine Protease. *J Clin and Transl Hepatol*, 2013, 1(1), 22-32.
20. Hu W, Zhang C, Shi JJ, Zhang JY, Wang FS. Hepatitis C: milestones from discovery to clinical cure. *Mil Med Res*, 2020, 7(1), 59.

21. Intron[®] A – sažetak opisa svojstava lijekova (European Medicines Agency)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/introna-epar-product-information_hr.pdf, pristupljeno 26.7.2021.
22. Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Primers*, 2017, 3, 17086.
23. Khuroo MS, Sofi AA. The Discovery of Hepatitis Viruses: Agents and Disease. *J Clin Exp Hepatol*, 2020, 10(4), 391-401.
24. Klinika za infektivne bolesti Fran Mihaljević – preporuke za liječenje hepatitisa C 2021. godine
<https://bfm.hr/hepatitis-c/>, pristupljeno 25.8.2021.
25. Kwong AD, Kauffman RS, Hurter P, Mueller P. Discovery and development of telaprevir: an NS3-4A protease inhibitor for treating genotype 1 chronic hepatitis C virus. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11), 993-1003.
26. Loustaud-Ratti V, Debette-Gratien M, Jacques J, Alain S, Marquet P, Sautereau D, Rousseau A, Carrier P. Ribavirin: Past, present and future. *World J Hepatol*, 2016, 8(2), 123-130.
27. Mahajan BB, Kaur S. Interferons. *Indian Journal Dermatol Venereol and Leprol*, 2015, 81(1), 51-55.
28. Meštrović T. Ribavirin History. *News medical*, 2021.
<https://www.news-medical.net/health/Ribavirin-History.aspx>, pristupljeno 1.8.2021.
29. Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol*, 2018, 10(2), 186-212.
30. Nagabhushan TL, Reichert P, Walter MR, Murgolo NJ. Type I interferon structures: Possible scaffolds for the interferon-alpha receptor complex. *Canadian J Chem*, 2002, 80(8), 1166-1173.

31. Nawaz A, Zaidi SF, Usmanghani K, Ahmad I. Concise review on the insight of hepatitis C. *J Taibah Univ Medical Sciences*, 2015, 10(2), 132-139.
32. New Drug Approvals – uprifosbuvir
<https://newdrugapprovals.org/2021/06/28/uprifosbuvir/>, pristupljeno 26.8.2021.
33. Nyström K, Waldenström J, Tang KW, Lagging M. Ribavirin: pharmacology, multiple modes of action and possible future perspectives. *Fut Virol*, 2019, 14(3), 153-160.
34. Pegasys® – sažetak opisa svojstava lijekova (European Medicines Agency)
https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/pegasys-epar-product-information_hr.pdf, pristupljeno 4.8.2021.
35. Pestka S. The Interferons: 50 Years after Their Discovery, There Is Much More to Learn. *J Biol Chem*, 2007, 282(28), 20047-20051.
36. Rabuffetti M, Bavaro T, Semproli R, Cattaneo G, Massone M, Morelli CF, Speranza G, Ubiali D. Synthesis of Ribavirin, Tecadenoson, and Cladribine by Enzymatic Transglycosylation. *Catalyst*, 2019, 9(4), 355.
37. Razavi H. Global Epidemiology of Viral Hepatitis. *Gastroenterol Clin North Ame*, 2020, 49(2), 179-189.
38. Sanford Guide – New or Updated Treatment Guidelines (november 2019)
<https://www.sanfordguide.com/2019-11-15-id-update/>, pristupljeno 28.7.2021.
39. Schaller A. A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases. *Planta*, 2004, 220(2), 183-197.
40. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annu Rev Immunol*, 2014, 32(1), 513-545.
41. Sharma A, Gupta SP, Siddiqui AA, Sharma N. HCV NS3/4A Protease and its Emerging Inhibitors. *J Anal Pharm Research*, 2017, 4(4), 00108.

42. Sugiyama R, Murayama A, Nitta S, Yamada N, Tasaka-Fujita M, Masaki T, Aly HH, Shiina M, Ryo A, Ishii K, Wakita T, Kato T. Interferon sensitivity-determining region of hepatitis C virus influences virus production and interferon signaling. *Oncotarget*, 2017, 9(5), 5627-5640.
43. Tate P.M, Mastrodomenico V, Mounce BC. Ribavirin Induces Polyamine Depletion via Nucleotide Depletion to Limit Virus Replication. *Cell Rep*, 2019, 28(10), 2620- 2633.
44. Thuener J. Hepatitis A and B Infections. *Prim Care*, 2017, 44(4), 621-629.
45. Todryk SM, Bassendine MF, Bridge SH. Revisiting the Elusive Hepatitis C Vaccine. *Vaccines (Basel)*, 2021, 9(2), 114.
46. Todt D, Walter S, Brown R, Steinmann E. Mutagenic Effects of Ribavirin on Hepatitis E Virus – Viral Extinction versus Selection of Fitness-Enhancing Mutations. *Viruses*, 2016, 8(10), 283.
47. Trepo C. A brief history of hepatitis milestones. *Liver Int*, 2014, 34(1), 29-37.
48. Webster DP, Klenerman P, Dusheiko GM. Hepatitis C. *Lancet*, 2015, 385(9973), 1124-1135.
49. Yadav D, Dewangan HK. PEGylation: An important Approach for Novel Drug Delivery System. *J Biomater Sci Polym Ed*, 2021, 32(2), 266-280.

7. SAŽETAK/SUMMARY

7.1. Sažetak

Hepatitis C je upalna bolest jetre uzrokovana virusom hepatitisa C otkrivenim 1989. godine. Virus se prenosi parenteralnim putem i predstavlja veliki javnozdravstveni problem, osobito u nerazvijenim zemljama gdje je izražena nedostupnost sterilnog medicinskog pribora i lijekova. U početku se bolest liječila neizravnim antivirusicima – (peg)interferonom alfa i ribavirinom koji su djelovali imunomodulatorno, a ne na sam virus. Oni nisu uvijek bili učinkoviti te su imali široki spektar nuspojava.

Istraživanjem virusa i njegove strukture, otkrivene su specifične virusne mete te nove generacije izravno djelujućih antivirusnih lijekova. To su inhibitori NS3/4A proteaze, NS5B RNA ovisne RNA polimeraze i NS5A proteina. Sve su te mete važne za životni ciklus virusa te njihova inhibicija dovodi do postupne eliminacije virusa iz domaćina. Problem potencijalnog razvoja otpornosti na lijekove rješava se primjenom kombinacija izravnih antivirusika.

Današnji lijekovi pokazuju veliku učinkovitost (> 90%) i dobru podnošljivost te je daljnji cilj razvoj cjepiva protiv HCV-a i potpuna eliminacija virusa iz opće populacije.

7.2. Summary

Hepatitis C is an inflammatory liver disease caused by hepatitis C virus, which was discovered in 1989. The virus is blood-borne and represents a big public health problem, especially in developing countries where sterile medical supplies and medicines are usually unavailable.

At first hepatitis C was treated with indirect antivirals – (peg)interferone alpha and ribavirin, which have immunomodulatory effect. They were not always so effective and they also had a wide spectrum of side effects.

Through research on virus and its structure, specific viral targets and a new generation of direct acting antivirals were discovered. These are inhibitors of NS3/4A protease, NS5B RNA dependent RNA polymerase and NS5A protein. All of those targets are important for life cycle of a virus and their inhibition leads to gradual elimination of the virus from the host. The problem of potentially developing a resistance to these drugs is solved through the use of drug combinations.

Today's medicines are very effective (> 90%) and have good durability. Therefore, the goal in the future is to develop antiviral vaccine which would lead to the global elimination of hepatitis C.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za Farmakologiju
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

POVIJESNI RAZVOJ TERAPIJE ZA HEPATITIS C

Laura Cesarec

SAŽETAK

Hepatitis C je upalna bolest jetre uzrokovana virusom hepatitisa C otkrivenim 1989. godine. Virus se prenosi parenteralnim putem i predstavlja veliki javnozdravstveni problem, osobito u nerazvijenim zemljama gdje je izražena nedostupnost sterilnog medicinskog pribora i lijekova. U početku se bolest liječila neizravnim antivirusicima – (peg)interferonom alfa i ribavirinom koji su djelovali imunomodulatorno, a ne na sam virus. Oni nisu uvijek bili učinkoviti te su imali široki spektar nuspojava.

Istraživanjem virusa i njegove strukture, otkrivene su specifične virusne mete te nove generacije izravno djelujućih antivirusnih lijekova. To su inhibitori NS3/4A proteaze, NS5B RNA ovisne RNA polimeraze i NS5A proteina. Sve su te mete važne za životni ciklus virusa te njihova inhibicija dovodi do postupne eliminacije virusa iz domaćina. Problem potencijalnog razvoja otpornosti na lijekove rješava se primjenom kombinacija izravnih antivirusika.

Današnji lijekovi pokazuju veliku učinkovitost (> 90%) i dobru podnošljivost te je daljnji cilj razvoj cjepiva protiv HCV-a i potpuna eliminacija virusa iz opće populacije.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 55 stranica, 15 grafičkih prikaza, 13 tablica i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: hepatitis C, terapija, interferon, peginterferon, ribavirin, DAA

Mentor: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Dr. sc. Lidija Bach-Rojecky**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Maja Šegvić-Klarić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Hrvoje Rimac, viši asistent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: Rujan 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Pharmacology
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

HISTORICAL DEVELOPMENT OF THE HEPATITIS C TREATMENT

Laura Cesarec

SUMMARY

Hepatitis C is an inflammatory liver disease caused by hepatitis C virus, which was discovered in 1989. The virus is blood-borne and represents a big public health problem, especially in developing countries where sterile medical supplies and medicines are usually unavailable.

At first hepatitis C was treated with indirect antivirals – (peg)interferone alpha and ribavirin, which have immunomodulatory effect. They were not always so effective and they also had a wide spectrum of side effects.

Through research on virus and its structure, specific viral targets and a new generation of direct acting antivirals were discovered. These are inhibitors of NS3/4A protease, NS5B RNA dependent RNA polymerase and NS5A protein. All of those targets are important for life cycle of a virus and their inhibition leads to gradual elimination of the virus from the host. The problem of potentially developing a resistance to these drugs is solved through the use of drug combinations.

Today's medicines are very effective (> 90%) and have good durability. Therefore, the goal in the future is to develop antiviral vaccine which would lead to the global elimination of hepatitis C.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 55 pages, 15 figures, 13 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: hepatitis C, therapy, interferon, peginterferon, ribavirin, DAA

Mentor: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Lidija Bach-Rojecky, Ph.D.** *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Maja Šegvić Klarić, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Hrvoje Rimac, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2021.