

51. Ravaomanana J., Michaud V., Jori F. et al. First detection of African swine fever virus in *Ornithodoros porcinus* in Madagascar and new insights into tick distribution and taxonomy. *Parasit. Vectors*. 2010; 3: 115.
52. Ronish B., Hakhverdyan M., Ståhl K. et al. Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus. *J. Virol. Meth.* 2011; 172 (1—2): 8—15.
53. Rowlands R. J., Michaud V., Heath L. et al. African swine fever virus isolate, Georgia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14 (12): 1870—1874.
54. Ruiz Gonzalvo F., Carnero M.E., Caballero C., Martínez J. *Am. J. Vet. Res.* 1986; 47 (6): 1249—1252.
55. Sanchez-Botija C. Reservorios del virus de la Peste Porcina Africana. Investigación del virus de la PPA en los artrópodos mediante la prueba de la hemoadsorción. *Bull. OIE*. — 1963; 60: 895—899.
56. Sánchez-Vizcaino J. M., Slauson D. O., Ruiz-Gonzalvo F., Valero F. Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever. *Am. J. Vet. Res.* 1981; 42: 1335—1341.
57. Schlafer D.H. et al. African swine fever in neonatal pigs: Passive acquired protection from colostrum or serum from recovered pigs. *Am. J. Vet. Res.* 1984; 45: 1367—1372.
58. Sierra M. A., Bernabe A., Mozos E. et al. Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet. Pathol.* 1987; 24 (5): 460—462.
59. Sierra M. A., Carrasco L., Gómez-Villamandos J. C. et al. Pulmonary intravascular macrophages in lungs of pigs inoculated with African swine fever virus of differing virulence. *J. Comp. Pathol.* 1990; 102 (3): 323—334.
60. Suárez C., Gutiérrez-Berzal J., Andrés G. et al. African swine fever virus protein p17 is essential for the progression of viral membrane precursors toward icosahedral intermediates // *J Virol.* 2010; 84 (15): 7484—7499.
61. Tignon M., Gallardo C., Iscaro C. et al. Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus. *J. Virol. Methods.* 2011; 178 (1—2): 161—170.
62. United States Department of Agriculture (USDA), 2011. Russian Federation. Global Agricultural Information Network, Report RS1144, 2011. Foreign Agriculture Services. [www.thepigsite.com](http://www.thepigsite.com), 2011. Доклад размещен на сайте: <http://www.thepigsite.com/articles/3624/russian-federation-livestock-and-products-annual-2011>
63. Wieringa-Jelsma T., Wijnker J. J., Zijlstra-Willems E. M. et al. Virus inactivation by salt (NaCl) and phosphate supplemented salt in a 3D collagen matrix model or natural sausage casings // *Int J Food Microbiol.* 2011; 148 (2): 128—134.
64. Wilkinson P. J., Wardley R. C. The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. *Br. Vet. J.* 1978; 134 (3): 280—282.
65. Yáñez R. J., Rodríguez J. M., Nogal M. L. et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology.* 1995; 208 (1): 249—278.

Поступила 22.03.12

© Л. И. НИКОЛАЕВА, Г. В. САПРОНОВ, 2012  
УДК 615.281.8.03:578.891

Л. И. Николаева<sup>1</sup>, Г. В. Сапронов<sup>2</sup>

## Вирус гепатита С: мишени для терапии и новые лекарственные препараты

<sup>1</sup>ФГБУ НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва; <sup>2</sup>ГБОУ ДПО Российская медицинская академия последипломного образования, Москва

**Обсуждены факторы вируса и пациента, влияющие на эффективность лечения. Представлены современные данные о молекулярном механизме действия основных препаратов для терапии вирусного гепатита С. Рассмотрены новые противовирусные препараты, ингибиторы протеазы, и фармакологические вещества, находящиеся в разработке и направленные против полимеразы вируса и белка NS5A.**

Ключевые слова: вирус гепатита С, противовирусная терапия, препараты направленного действия

### Hepatitis C Virus: Therapeutic Targets and New Drugs

L. I. Nikolaeva<sup>1</sup> and G. V. Sapronov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia; <sup>2</sup> Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

**The viral and patient factors affecting the efficacy of therapy were discussed. The modern data on the molecular mechanism of action of main drugs for hepatitis C therapy were presented. New antiviral drugs (protease inhibitors) and pharmacological substances under development targeted against viral polymerase and protein NS5A were considered.**

Key words: hepatitis C virus, antiviral therapy, target-action drugs

Вирус гепатита С (ВГС) — представитель семейства *Flaviviridae* рода *Hepacivirus* [40]. Это сферический оболочечный вирус размером около 55 нм [17, 35, 50]. Под оболочкой вируса находится нуклеокапсид, диаметром около 45 нм, в который упакован геном ВГС — одноцепочечная линейная РНК. Вирусная РНК имеет положительную полярность и содержит около 9600 нуклеотидных остатков. В ней выявлена

одна открытая рамка считывания, ограниченная с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми областями (см. рисунок). Геном кодирует крупный белок-предшественник полипротеин, из которого с участием клеточных и вирусных ферментов образуются все 10 полипептидов ВГС. Структурные белки вируса, формирующие вирион, представлены нуклеокапсидным (core) протеином и двумя оболочечными гликопротеинами (Е1 и Е2). К

Контактная информация:

Николаева Людмила Ивановна, д-р биол. наук, вед. науч. сотр.; e-mail: [li.nikolaeva@mail.ru](mailto:li.nikolaeva@mail.ru)

неструктурным полипептидам ВГС, которые участвуют в процессах репликации, трансляции и инициации сборки вируса, относятся: виropин (p7), NS2-протеаза, сериновая протеаза-хеликаза (NS3), кофактор сериновой протеазы (NS4A), компоненты репликативного комплекса (NS4B и NS5A) и РНК-зависимая РНК-полимераза (NS5B). Для ВГС характерна генетическая неоднородность (полиморфизм), из-за которой вирус классифицируют по генетическим параметрам на 6 генотипов и около 80 подтипов (или субтипов) [45].

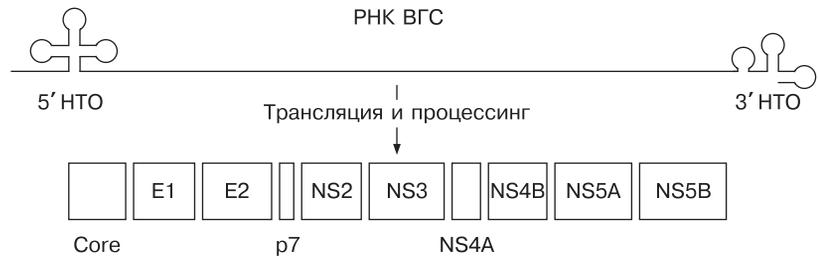
Помимо этого в каждом инфицированном пациенте вирус представлен набором близкородственных генетических вариантов.

ВГС — этиологический агент распространенного инфекционного заболевания, гепатита С, называемого ранее гепатитом ни А, ни В с парентеральной передачей. Острый гепатит С в 70—85% случаев переходит в хроническую форму, которая при естественном течении неуклонно прогрессирует, приводя к развитию фиброза, у 30% больных к циррозу печени и почти у 5% пациентов — к гепатоцеллюлярной карциноме [24]. В нашей стране с 2001 г. отмечается тенденция к снижению заболеваемости острым гепатитом С. Однако сохраняются высокими показатели регистрации случаев впервые выявленного хронического гепатита С (ХГС). Прогнозируется неблагоприятная эпидемиологическая ситуация по вирусному гепатиту С до 2020-х годов [1].

Терапия гепатита С базируется на комбинации препаратов пегилированного интерферона-α2а или интерферона-α2b и рибавирина (пегИФН/Р). У пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1, такая терапия позволяет достичь устойчивого вирусологического ответа (УВО) почти в 50% случаев, у хронически инфицированных ВГС генотипа 2 или 3 — почти в 80% [20, 42]. Однако у 15—25% пациентов после терапии пегИФН/Р наблюдается рецидив. Поскольку главное место в оценке эффективности терапии отводится обнаружению РНК ВГС в крови, этот тест должен обладать высокой чувствительностью, не менее 10—15 МЕ/мл [13]. Если лечение начато в острой фазе инфекции, то вероятность достичь УВО существенно выше — до 90%. Неудача при противовирусной терапии (ПВТ) связана как с ВГС, так и с организмом самого пациента. К вирусным факторам относят генотип, набор вариантов вируса, вирусную нагрузку, кинетику снижения РНК ВГС при терапии; к факторам пациента — возраст, пол, длительность заболевания, стадию фиброза, сопутствующие заболевания, этническую принадлежность и генетический полиморфизм генов.

### Терапия пегИФН и рибавирином

В современной ПВТ гепатита С используют конъюгированный с полиэтиленгликолем (пегилированный) ИФН-α в комбинации с рибавирином. ИФН-α — это цитокин, компонент врожденной иммунной системы человека. После подкожного введения больному молекула ИФН-α постепенно высвобождается из комплекса с полиэтиленгликолем и связывается специфически со своим рецептором IFNAR, который при-



Схематическое изображение РНК ВГС и полипептидов после протеолитического расщепления полипротеина.

НТО — нетранслируемая область.

сутствует на поверхности гепатоцитов и ряда других клетках. Процесс связывания завершается передачей сигнала на два ассоциированных с рецептором внутриклеточных белка — тирозиновые киназы Jak1 и Tyk2. Они фосфорилируются и активируют компоненты передачи сигнала и активации транскрипции, называемые STAT1 и STAT2, входящие в сигнальный путь Jak-STAT. Активированные STAT1 и STAT2 переносятся в ядро, где специфически связываются с промоторными элементами почти сотни ИФН-стимулируемых генов.

Продукты этих генов оказывают антивирусное, иммуномодулирующее и антипролиферативное действие. Они влияют на апоптоз инфицированной клетки, метаболизм липидов, синтез и деградацию белков и реакцию клетки на чужеродные молекулы. Наиболее известные белки, кодируемые ИФН-стимулируемыми генами, — это 2'—5' олигоаденилатсинтетаза (2'—5'OAS), протеинкиназа R (PKR), активируемая двуцепочечной РНК, и Mx-белки [12]. ИФН-α действует как на инфицированные клетки, так и на иммунную систему в целом: регулирует экспрессию МНС класса II и привлечение иммунных клеток, стимулирует секрецию цитокинов и деление иммунных клеток.

Как показано в экспериментах *in vivo*, рибавирин (нуклеозидный аналог) функционирует как легкий ингибитор репликации ВГС, но он эффективно предотвращает рецидив после терапии пегИФН/Р [13, 37]. Дискуссии о молекулярном механизме действия рибавирина продолжаются. Выдвинуто несколько гипотез: участие в усилении ответа Т-хелперов 1-го типа, в ингибировании инозитолмонофосфатдегидрогеназы (что приводит к снижению в клетке пула гуанозинтрифосфатов и дезоксигуанозинтрифосфатов), прямое ингибирование активности РНК-зависимой РНК-полимеразы и усиление внутриклеточных эффектов ИФН-α [23]. Вероятно, скоро вместо рибавирина будет использоваться другой препарат (tagybavirin), который дает минимальные побочные эффекты.

### Факторы ВГС, влияющие на эффективность лечения

Важный вирусный фактор, влияющий на эффективность пегИФН/Р, — генотип ВГС. Лечение завершается безуспешно почти у 50% пациентов, инфицированных ВГС генотипа 1 или 4, и у 20% больных, инфицированных вирусом генотипа 2 или 3 [20, 42]. Для пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1 или 4, снижение вирусной РНК в процессе лечения наступает позже, чем в случае вирусом генотипа 2 или 3. Причины этого еще не установлены.

Еще один вирусный компонент, влияющий на эффективность ПБТ, — отдельные вирусные белки, точнее их участки, где возможны неблагоприятные мутации. Такие мутации выявлены в белках NS5A, E2, NS3 и нуклеокапсидном протеине. Как впервые установили N. Enomoto и соавт. [14], мутации в участке ISDR (регион, определяющий чувствительность к ИФН, расположен в белке NS5A), предсказывают исход терапии у пациентов из Японии и Азии. Однако у пациентов из Европы и Америки такая зависимость не наблюдается [9, 25, 51]. Еще одна более протяженная зона, частично перекрывающаяся с участком ISDR, в белке NS5A может блокировать действие ИФН- $\alpha$ . Это участок PKR-BD, который способен связывать ИФН-индуцируемую и РНК-активируемую PKR, нарушая тем самым существенный компонент антивирусной защиты [33]. Мутации в этой зоне достоверно чаще обнаруживают у пациентов с УВО. Относительно роли еще одного участка этого же белка, петли V3, однозначное мнение отсутствует [33, 51].

Две мутации в зоне нуклеокапсидного белка, которые приводят к замене в 70-й и 91-й аминокислотных позициях этого протеина, влияют на эффективность терапии пегИФН/Р у японских больных ХГС, инфицированных вирусом субтипа 1b [2, 3]. Для европейских пациентов более значима мутация в 70 позиции нуклеокапсидного белка. Остаток аргинина в этом положении достоверно чаще выявляли у пациентов с УВО, и у них наблюдалось более быстрое снижение РНК ВГС в первые 8 нед лечения [4].

В СООН-концевой части белка E2 расположен участок, называемый RePHD, гомологичный по структуре фрагменту киназы PKR, индуцированной ИФН, и рибосомальному фактору eIF2 $\alpha$ . Из-за этого сходства нарушается фосфорилирование киназы и останавливается антивирусный эффект, проявляющийся на уровне регуляции активности рибосом [48]. Однако относительно влияния мутаций в этом регионе на эффективность терапии до сих пор продолжаются дискуссии [7, 48]. Возможно, еще в одном белке NS3 существуют мутации, влияющие на эффективность терапии пегИФН/Р на уровне регуляции компонента STAT1 [36, но этот аспект недостаточно изучен.

#### **Молекулярно-генетические факторы пациента, влияющие на результат терапии**

Среди наиболее значимых генетических факторов пациентов, влияющих на эффективность терапии, следует отметить полиморфизм гена интерферон- $\lambda$ 3 (ИФН- $\lambda$ 3). В 2009 г. три независимые группы исследователей, проводя полногеномные сравнения по многочисленным группам пациентов, достигших или не достигших УВО, показали, что однонуклеотидный полиморфизм (ОНП) около гена IL-28B ассоциирован с высокой вероятностью успеха терапии [18, 46, 47]. Ген IL-28B кодирует недавно открытый ИФН- $\lambda$ 3, аллельные варианты влияют и на вероятность самопроизвольной элиминации ВГС в острой фазе инфекции [49]. Выявлено 4 ОНП около гена IL-28B, но лишь для трех показана достоверная взаимосвязь с эффективностью ПБТ. Пока как предикторы чаще изучаются 2 ОНП в локусах rs12979860 и rs8099917 в разных этнических группах больных гепатитом С. Молекулярный механизм действия этих полиморфизмов на

вероятность достижения УВО пациентами при ПБТ не установлен. Есть предположение, что эти ОНП около гена IL-28B влияют на продукцию мРНК ИФН- $\lambda$ 3 [46, 47]. Как все интерфероны, ИФН- $\lambda$ 3 оказывает антивирусный и иммуномодулирующий эффект. Хотя молекулярный механизм антивирусного действия ИФН- $\lambda$ 3 при ВГС-инфекции еще не установлен, этот интерферон удачно дополняет и, возможно, усиливает антивирусные эффекты ИФН- $\alpha$ . Если у пациента выявлены аллельные варианты С/С в локусе rs12979860 и вариант Т/Т в локусе rs8099917 по полиморфизму гена IL-28B, вероятность достичь УВО высока (70–90%) [18, 46, 47].

Как установлено недавно, дисбаланс в экспрессии генов в гепатоцитах может быть связан с эффективностью ПБТ [43]. Было обнаружено, что еще до начала терапии уровень экспрессии некоторых ИФН-стимулируемых генов был повышен только у пациентов, у которых ПБТ закончилась безуспешно. Удалось идентифицировать 2 гена IFI27 и CXCL9, экспрессия которых в гепатоцитах с большой вероятностью (около 100%) предсказывают неуспех ПБТ и с меньшей вероятностью достижение УВО (70%) [5]. Аналогичные данные были получены при анализе мРНК в мононуклеарных клетках периферической крови и макрофагах печени [32]. Отсутствие мРНК белка MxA в макрофагах печени является с высокой вероятностью (до 98%) предиктором невозможности достичь УВО.

В экспрессии генов еще одной группы биологически важных веществ — хемокинов обнаружены различия у пациентов, достигших и не достигших УВО. Хемокины являются пептидными регуляторами процесса воспаления [10, 26]. Установлено, что у больных, которые не могут достичь УВО, повышен уровень мРНК хемокина CXCL10, называемого также IP-10 (ИФН- $\gamma$ -индуцируемый белок 10). При этом в крови присутствует укороченный вариант IP-10, который функционирует как антагонист полноразмерной формы хемокина и не может обеспечить привлечение Т-лимфоцитов в зону воспаления [11]. Это приводит к нарушению Т-клеточного звена, выполняющего важную роль в ограничении вирусной инфекции в печени. Недавно выявлена взаимосвязь между отдельными аллельными формами гена IL-28B и содержанием IP-10 [28]. Повышенное содержание в крови хемокина IP-10 достоверно чаще выявлялось у пациентов с неблагоприятными аллельными формами гена IL-28B.

#### **Ингибиторы протеазы как препараты направленного действия**

В 2011 г. стала возможной новая терапия для пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1, предусматривающая сочетание трех препаратов — пегИФН, рибавирина и телупревира или боцепревира. Это принципиально новая схема лечения, поскольку в ней появляется ингибитор вирусной сериновой протеазы — ключевого фермента нарезания почти всех неструктурных белков вируса. Результаты III фазы клинических испытаний этой тройной терапии, показали, что около 65–75% ранее не леченых пациентов и 40–50% больных, безуспешно завершивших терапию пегИФН/Р, могут достичь УВО благодаря новой терапии [38]. Разработка ингибиторов протеазы длилась долго — с 90-х годов прошлого века.

Одним из первых препаратов, показавших эффективность применения ингибиторов протеазы, было вещество BILN 2061 (фирма-разработчик «Boehringer Ingelheim»), которое снижало вирусную нагрузку в 100–1000 раз после 2 дней применения у пациентов, инфицированных ВГС генотипа 1 [22]. Однако препарат не прошел клинические испытания из-за выраженной кардиотоксичности.

Телапревир (разработчик «Vertex/Tibotec») и боцепревир (разработчик «Merck») прошли клинические испытания в США, Канаде и Европе и разрешены к применению. В США и Канаде теллапревил имеет другое торговое название Incivek™, в Европе — Incivotm. По структуре оба препарата представляют собой ингибиторы-пептидомиметики, которые выполняют роль ложного субстрата для NS3-протеазы. Телапревир по строению молекулы напоминает линейный тетрапептид с активной кетоамидной группой, которая реагирует с каталитическим серином вирусной протеазы с формированием ковалентного комплекса. В процессе применения теллапревира возможно накопление устойчивых мутантных вариантов вируса. Однако в большинстве случаев эти резистентные формы ВГС уже присутствуют до лечения как минорные варианты вирусной популяции, составляя 0,3—2% [6, 40]. Выявлены аминокислотные остатки протеазы, замены в которых влияют на чувствительность к ингибиторам (см. таблицу). Как установлено, резистентные к теллапревиру варианты ВГС имеют низкую скорость репликации и сохраняют чувствительность к пегИФН и рибавирину. Поэтому тройная терапия позволяет достичь УВО у 31—84% больных, в зависимости от того, как был завершен предыдущий курс лечения пегИФН/Р: без УВО либо с частичным ответом или с рецидивом [38]. Большинство пациентов теллапревир хорошо переносится, но возможны побочные проявления в виде зуда, диареи, сыпи и анемии. Чаще всего отмечается кожный зуд.

Боцепревир—кетоамидный пептидомиметик, который связывается обратимо с активным центром протеазы. У резистентных вариантов ВГС обнаружены замены по отдельным аминокислотным остаткам, что представлено в таблице [27]. Наиболее значимые побочные эффекты — это анемия и нарушения вкуса. В стадии изучения находятся следующие перспективные препараты: данопревир («Intermune», «Roche») и препарат ТМС435 («Medavir Incorporated»). Установлены аминокислотные остатки NS3-протеазы, которые приводят к нечувствительности к этим препаратам (см. таблицу).

#### Разработка ингибиторов вирусной полимеразы

Для ингибирования активности РНК-зависимой РНК-полимеразы ВГС создаются нуклеозидные (НА) и нунуклеозидные аналоги (ННА). Один из представителей НА — препарат RG7128, который является цитидиновым аналогом, напоминающим естественный субстрат полимеразы [19]. Он связывается с активным центром полимеразы и встраивается в растущую цепь РНК, приводя к терминации. Структура активного центра полимеразы ВГС консервативна, поэтому препарат эффективен для всех генотипов вируса. На фоне применения RG7128 редко образуются мутантные резистентные варианты. При тройной терапии пегИФН/Р и

#### Аминокислотные замены в сериновой протеазе ВГС, обнаруженные у резистентных к терапии ингибиторами вариантов вируса

Препарат	Варианты и позиции аминокислотных остатков протеазы NS3, с которыми связана резистентность к ингибиторам [27]
Телапревир	A156V/T, V36M/A+R155K/T, V36M/A+A156V/T, V36M/A, T54A, R155K/T, A156S
Боцепревир	V36M, T54S, R155K, T54A, V55A, R155T, A156S, V158I, V170A, V36A, V36L, I170T
Данопревир	R155K
ТМС435	80, 155, 156, 158
BI201335	155, 156, 168

препаратом RG7128 у 85% ранее не леченых пациентов с вирусом генотипа 1 достигался ранний вирусологический ответ [29]. Применение этого препарата в течение 4 нед одновременно с пегИФН/Р у больных, которые были инфицированы вирусом генотипа 2 или 3 и ранее завершили ПВТ безуспешно, показало возможность получить УВО в 63—67% случаев. Побочные эффекты от применения RG7128 умеренно выражены, клинические испытания препарата продолжаются.

Недавно была продемонстрирована высокая эффективность совместного применения двух ингибиторов ВГС: для вирусной полимеразы RG7128 и для сериновой протеазы RG2772 [15]. В течение 2 нед терапии у ранее не леченых больных с вирусом генотипа 1 удалось снизить содержание РНК ВГС почти на 5 логарифмов. При увеличении длительности приема этих ингибиторов до 24 нед вирусная РНК не определялась у всех пациентов. Продолжаются исследования по разработке схем лечения больных ХГС только ингибиторами протеазы и полимеразы с учетом ОНП гена IL-28B.

В стадии изучения находятся ННА к разным аллостерическим (влияющим на активность) участкам полимеразы. Применение такого типа ингибиторов чаще, чем в случае НА, приводит к формированию резистентных вариантов фермента. К 1-му участку полимеразы разработан ингибитор МК-3281 [8]. При 7-дневной монотерапии у больных с ВГС генотипами 1 (лучше при субтипе 1b) или 3 отмечено быстрое и значительное снижение вирусной РНК без серьезных побочных эффектов. Ко 2-му участку полимеразы одним из перспективных препаратов является VX-222, который проходит клинические испытания [41]. Монотерапия этим препаратом в течение 3 дней снижала вирусную нагрузку на 3 порядка, включая пациентов с генотипом 1 ВГС. Отмечены побочные эффекты в виде диареи, головной боли, которые были незначительно выражены. Как ингибитор 3-го участка исследуется препарат ANA-598, который планируется к использованию совместно с пегИФН/Р [30]. К 4-му участку одним из наиболее перспективных ингибиторов является компонент GS-9190 (тегобувир), которой находится в фазе клинических испытаний. Он планируется для применения в комбинированной терапии одновременно с пегИФН/Р [44].

#### Создание препаратов, направленных на вирусный белок NS5A

Вирусный белок NS5A выполняет много функций, но наиболее важная — сборка репликативного комплекса ВГС. Поэтому этот протеин является важной

мишенью для терапии направленного действия. Один из перспективных ингибиторов белка NS5A — препарат BMS-790052 [16]. Клинические испытания по применению этого препарата одновременно с пегИФН/Р у пациентов, инфицированных вирусом генотипа 1, позволили получить первичный (по окончании ПВТ) вирусологический ответ у 83% больных [34]. Изучение препарата продолжается. В стадии клинических испытаний находится еще один подобный препарат GS-5885, который, возможно, будут применять без ИФН/Р [31].

### Заключение

В настоящее время для больных вирусным гепатитом С возможна тройная комбинированная терапия, когда помимо традиционных пегИФН/Р используется ингибитор протеазы теллапревир или боцепревир. С этих препаратов начинается терапия нового уровня, при которой мишенью для лекарственных препаратов становятся ключевые белки ВГС. Впереди перспективные разработки, которые позволят надеяться на успешный результат даже у больных, не достигших УВО при существующей тройной терапии. Перспективные исследования направлены на создание веществ, нарушающих функциональную активность вирусной полимеразы и белка NS5A. Набор препаратов—ингибиторов для разных белков ВГС позволит подойти к специальной схеме лечения пациентов с ХГС, которым противопоказан ИФН- $\alpha$ .

### ЛИТЕРАТУРА

1. *Гайдаренко А. Д.* Прогнозирование проявлений эпидемиологического процесса гепатита С на основе компьютерного моделирования: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.; 2009.
2. *Akuta N., Suzuki F., Sezaki H.* et al. Association of amino acid substitution pattern in core protein of hepatitis C virus genotype 1b high viral load and non-virological response to interferon-ribavirin combination therapy. *Intervirology.* 2005; 48: 372—380.
3. *Akuta N., Suzuki F., Hirakawa M.* et al. A matched case-controlled study of 48 and 72 weeks of peginterferon plus ribavirin combination therapy in patients infected with HCV genotype 1b in Japan: amino acid substitutions in HCV core region as predictor of sustained virological response. *J. Med. Virol.* 2009; 81: 452—458.
4. *Alestig E., Arnholm B., Eilard A.* et al. Core mutations, IL-28B polymorphisms and response to peginterferon/ribavirin treatment in Swedish patients infected with hepatitis C virus genotype 1 infection. *BMC Infect. Dis.* 2011; 11: 124—130.
5. *Asselah T., Bieche I., Bedossa P.* et al. Gene expression and hepatitis C virus infection. *Gut.* 2009; 58: 846—858.
6. *Bartels D. J., Zhou Y., Zhang E. Z.* et al. Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3.4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. *J. Infect. Dis.* 2008; 198: 800—807.
7. *Boicic F., Sede M., Moretti F.* et al. Analysis of the PKR-eIF2 $\alpha$  phosphorylation homology domain (PePHD) of hepatitis C virus genotype 1 in HIV-coinfected patients by ultra-deep pyrosequencing and its relationship to pegylated interferon-ribavirin treatment. *Arch. Virol.* 2012; 157: 703—711.
8. *Brainard D. M., Anderson M. S., Petry A.* et al. Safety and antiviral activity of NS5B polymerase inhibitor MK-3281, in treatment-naïve genotype 1a, 1b and 3 HCV-infected patients. *Hepatology.* 2009; 50 (suppl. 4): 263A.
9. *Brillet R., Penin F., Hezode C.* et al. The nonstructural 5A protein of hepatitis C virus genotype 1b does not contain an interferon sensitivity-determination region. *J. Infect. Dis.* 2007; 195: 432—441.
10. *Butera D., Marukian S., Iwamaye A. E.* et al. Plasma chemokine levels correlate with the outcome of antiviral therapy in patients with hepatitis C. *Blood.* 2005; 106: 1175—1182.
11. *Casrouge A., Decalf J., Ahloulay M.* et al. Evidence for an antagonist form of the chemokine CXCL10 in patients chronically infected with HCV. *J. Clin. Invest.* 2011; 121: 308—317.
12. *Chevaliez S., Pawlotsky J. M.* Interferon-based therapy of hepatitis C. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007; 59: 1222—1241.
13. *Chevaliez S., Asselah T.* Mechanism of non-response to antiviral

- treatment in chronic hepatitis C. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* 2011; 35: S31—S41.
14. *Enomoto N., Sakuma I., Asahira Y.* et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J. Clin. Invest.* 1995; 96: 224—230.
15. *Gane E. J., Roberts S. K., Siedman C. A.* et al. Oral combination therapy with a nucleoside polymerase inhibitor (RG7128) and danoprevir for chronic hepatitis C genotype 1 infection (INFORM-1): a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Lancet.* 2010; 376: 1467—1475.
16. *Gao M., Nettles R. E., Beema M.* et al. Chemical genetics strategy identifies an HCV NS5A inhibitor with a potent clinical effect. *Nature.* 2010; 465: 96—100.
17. *Gastaminza P., Drysen K. A., Boyd B.* et al. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles, produced in cell culture. *J. Virol.* 2010; 84: 10999—11009.
18. *Ge D. I., Fellay J., Thompson A. J.* et al. Genetic variation in IL-28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance. *Nature.* 2009; 461: 399—401.
19. *Guedi J., Dahari H., Shudo E.* et al. Hepatitis C viral kinetics with the nucleoside polymerase inhibitor mericitabine (RG7128). *Hepatology.* 2012; 55: 1030—1037.
20. *Hadziyannis S. J., Sette H. Jr., Morgan T. R.* et al. Peginterferon-alpha2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C: a randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 2004; 140: 346—355.
21. *Hezode C., Forestier N., Dusheiko G.* et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360: 1839—1850.
22. *Hinrichsen H., Benhamou Y., Wedemeyer H.* et al. Short-term antiviral efficacy of BILN 2061, a hepatitis C virus serine protease inhibitor, in hepatitis C genotype 1 patients. *Gastroenterology.* 2004; 127: 1347—1355.
23. *Hofmann W. P., Herrmann E., Sarrazin C.* et al. Ribavirin mode of action in chronic hepatitis C: from clinical use back to molecular mechanisms. *Liver Int.* 2008; 28: 1332—1343.
24. *Hoofnagle J.* Course and outcome of hepatitis C. *Hepatology.* 2002; 36: S21—S29.
25. *Jardim A. C., Yamasaki L. H., de Queiroz A. T.* Quasispecies of hepatitis C virus genotype 1 and treatment outcome with peginterferon and ribavirin. *Infect. Genet. Evol.* 2009; 9: 689—698.
26. *Ji X., Cheung R., Cooper S.* et al. Interferon alpha regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C. *Hepatology.* 2003; 37: 610—621.
27. *Kwo P. Y., Vinayek R.* The therapeutic approaches for hepatitis C virus: protease inhibitors and polymerase inhibitors. *Gut Liver.* 2011; 5: 406—417.
28. *Lagging M., Askarieh G., Negro F.* et al. Response prediction in chronic hepatitis C by assessment of IP-10 and IL28B-related single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE.* 2011; 6: e17232.
29. *Lalezari J., Gane E., Rodriguez-Torres M.* et al. Potent antiviral activity of the HCV nucleoside polymerase inhibitor R7128 with PEG-IFN and ribavirin: interim results of R7128 500 mg bid for 28 days. *J. Hepatol.* 2008; 48 (suppl. 2): S29.
30. *Lawitz E., Rodriguez-Torres M., Rustgi V. K.* et al. Safety and antiviral activity of ANA-598 in combination with pegylated interferon alpha2a plus ribavirin in treatment-naïve genotype 1 chronic HCV patients. *J. Hepatol.* 2010; 52 (suppl. 1): S467.
31. *Lawitz E. J., Gruener D., Hill J. M.* et al. A phase 1, randomized, placebo-controlled, three-day, dose-ranging study of GS-5885, an NS5A inhibitor, in patients with genotype 1 hepatitis C. *J. Hepatol.* 2012; doi 10.1016/j.jhep.2011.12.029.
32. *McGilvray I., Feld J. J., Chen L.* et al. Hepatic cell-specific gene expression better predicts HCV treatment outcome than IL28B genotype. *Gastroenterology.* 2012; 142: 1122—1131.
33. *Munoz de Rueda P., Casado J., Paton R.* et al. Mutation in E2-PeRHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin therapy responses. *J. Virol.* 2008; 82: 6644—6653.
34. *Nettles R., Chien C., Chung E.* et al. BMS-790052 is a first-in-class potent hepatitis C (HCV) NS5A inhibitor for patients with chronic HCV infection: results from a proof-of-concept study. *Hepatology.* 2008; 48 (suppl. 1): 1025A.
35. *Nielsen S. U., Bassendine M. F., Martin C.* et al. Characterization of hepatitis C RNA-containing particles from human liver by density and size. *J. Gen. Virol.* 2008; 89: 2507—2517.
36. *Noguchi T., Otsubaki T., Ando I.* et al. Isolation and gene analysis of interferon alpha-resistant cell clones of the hepatitis C virus subgenome. *Virology.* 2008; 375: 424—432.

37. Pawlotsky J. M., Dahari H., Neumann A. U. et al. Antiviral action of ribavirin in chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. 2004; 126: 703—714.
38. Pawlotsky J. M. The results of phase III clinical trial with telaprevir and boceprevir presented at The Liver Meeting 2010: a new standard of care for hepatitis C virus genotype 1 infection, but with issues still pending. *Gastroenterology* 2011; 140: 746—754.
39. Robbins P. S., Myers G., Howard C. et al. Classification, nomenclature, and database development for hepatitis C virus (HCV) and related viruses: proposals for standardization. International Committee on Virus Taxonomy. *Arch. Virol.* 1998; 143: 2493—2503.
40. Robinson M., Tian Y., Delaney W. E. et al. Preexisting drug-resistance mutations reveal unique barriers to resistance for distinct antivirals. *PNAS USA*. 2011; 108: 10290—10295.
41. Rodriguez-Torres M., Lawitz E., Conway B. et al. Safety and antiviral activity of the HCV non-nucleoside polymerase inhibitor VX-222 treatment-naïve genotype 1 HCV-infected patients. *J. Hepatol.* 2010; 52 (suppl. 1): S14.
42. Roulot D., Bourcier V., Grando V. et al. Epidemiological characteristics and response to peginterferon plus ribavirin treatment of hepatitis C virus genotype 4 infection. *J. Viral. Hepatol.* 2007; 14: 460—467.
43. Sarasin-Filipowicz M., Oakeley E. J., Duong F. H. et al. Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C. *PNAS USA*. 2008; 105: 7034—7039.
44. Shih I., Vliegen I., Peng B. et al. Mechanistic characterization of GS-9190 (tegobuvir), a novel non-nucleoside inhibitor of HCV NS5B polymerase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55: 4196—4203.
45. Simmonds P., Bukh J., Combet C. et al. Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology*. 2005; 42: 962—973.
46. Suppiah V., Moldovan M., Ahlensiel G. et al. IL-28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1100—1104.
47. Tanaka Y., Nishida N., Sugiyama M. et al. Genome-wide association with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Nat. Genet.* 2009; 41: 1105—1109.
48. Taylor D. R., Shi S. T., Romano P. R. et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PRK by HCV E2 protein. *Science*. 1999; 285: 107—110.
49. Thomas D. L., Thio C. L., Martin M. P. et al. Genetic variation in IL-28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus. *Nature*. 2009; 461: 798—801.
50. Yu X., Qiao M., Atanasov I. et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology*. 2007; 367: 126—134.
51. Yuan H. J., Jain M., Snow K. K. et al. Evolution of hepatitis C virus NS5A region in breakthrough patients during pegylated interferon and ribavirin therapy. *J. Viral Hepatit.* 2010; 17: 208—216.

Поступила 22.03.12

---

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

---

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 578.833.3:578.23].083.2

*Л. В. Урываев, К. С. Ионова, А. В. Дедова, Л. В. Дедова, Т. К. Селиванова, Н. А. Парасюк, М. В. Мезенцева, Л. В. Костина, Е. А. Гущина, Р. Я. Подчерняева, Т. В. Гребенникова*

### Анализ контаминации клеточных культур пестивирусом BVDV и микоплазмами

ФГБУ НИИ вирусологии им. Д.И.Ивановского Минздравсоцразвития России, Москва

---

Проанализирована частота контаминации клеточных линий и эмбриональных сывороток телят (ЭТС), используемых в биологических и вирусологических исследованиях, нецитотоксичным пестивирусом (поп-ср-BVDV — bovine viral diarrhea virus) и микоплазмами. С использованием моноклональных антител к гликопротеину оболочки вириона BVDV был выявлен в 33% образцов клеток (из 131 клеточной линии и отливок) и более чем в 60% случаев — в ЭТС (из 37 проверенных партий). Установлена способность вируса инфицировать широкий спектр клеток разной видовой, тканевой и органной специфичности. Выявлена контаминация среди изученных 69 клеточных культур разными видами микоплазм в 20% случаев. Показано, что BVDV-контаминация клеток влияет не только на показатели функциональной активности клеточного генома (уровни активности генов цитокинов и экспрессия генов ИФН- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ ), но и репродукцию вирусов.

Ключевые слова: клеточные линии, фетальная сыворотка телят, контаминация BVDV и микоплазмами, ОТ-ПЦР

#### Analysis of the Cell Tissue Culture Contamination with the Bovine Viral Diarrhea Virus and Mycoplasmas

*L. V. Uryvaev, K. S. Ionova, A. V. Dedova, L. V. Dedova, T. K. Selivanova, N. A. Parasjuk, M. V. Mesentseva, L. V. Kostina, E. A. Gushina, R. Ja. Podchernjaeva, and T. V. Grebennikova*

Ivanovsky Institute of Virology, Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow, Russia

Different cell tissue cultures and commercial fetal calf sera (FCS) used in biological and virological research were screened for the bovine viral diarrhea virus (BVDV, Pestivirus genus, Flaviviridae family) and mycoplasma contamination. BVDV was detected using RT-PCR and indirect immunofluorescence (with monoclonal antibodies) methods in 33% cases of the studied cell lines and in >60% cases of FCS. BVDV was shown to present and reproduce in high spectra of human cell lines, as well as in monkey, pig, rabbit, goat, dog, and cat cells at high