

**UNIVERZITA KARLOVA**

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie



**VÍRUSOVÉ HEPATITÍDY: NOVÉ POZNATKY A NOVÉ  
MOŽNOSTI LIEČBY**

Diplomová práca

Vedúci diplomovej práce: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Bc. Eva Davidovová

## PREHLÁSENIE

*„Prehlasujem, že táto práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Celá literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola použitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.“*

V Hradci Králové dňa .....

.....

podpis

*Ďakujem prof. PharmDr. Petrovi Pávkovi, Ph.D. za vedenie tejto diplomovej práce a za prínosné konzultácie, ktoré mi veľmi pomohli pri vypracovaní práce.*

## **ABSTRAKT**

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakológie a toxikológie

Študentka: Bc. Eva Davidovová

Školiteľ: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Názov diplomovej práce: Vírusové hepatitídy: nové poznatky a nové možnosti liečby.

Vírusové hepatitídy sú všeobecne známym celosvetovým problémom. Vírus hepatitídy B (HBV) a vírus hepatitídy C (HCV) sú charakteristické vznikom závažných komplikácií, najmä čo sa týka prechodu do chronického štádia ochorenia, ktoré je spojené s rozvojom fibrózy, cirhózy a hepatocelulárneho karcinómu (HCC). Interakcie medzi vírusmi a hostiteľskými bunkami sú vcelku komplikované a nie vždy úplne pochopené. Vo všeobecnosti je infekčný cyklus vírusov viackrokovým procesom. Bližšie pochopenie celého životného cyklu vírusu je hlavným predpokladom na vynájdenie účinných liečiv. Vírusová hepatitída B a C bola dlhú dobu liečená najmä interferónom alfa. Neskôr sa pridala do liečby HCV aj ribavirín a pri HBV sa začali používať nukleozidové / nukleotidové analógy (NA). Interferón sa neskôr pegyloval, čím sa jeho vlastnosti vylepšili. Tieto liečivá však neposkytovali dostatočnú účinnosť a navyše boli spojené s množstvom nežiadúcich účinkov. Práve kvôli týmto nevýhodám doterajšej liečby sa vyvinula snaha na vynájdenie nových a účinnejších terapeutík. Vynájdenie nových liečebných postupov však brzdil do značnej miery nedostatok modelových systémov, ktoré sú nevyhnutné nie len na pochopenie samotného životného cyklu vírusu, ale aj na následný vývoj liečiv. Dôležité je, že pomocou modelových systémov bol objavený NTCP, ako hlavný vstupný receptor pre HBV (aj HDV) a taktiež mohol byť bližšie preskúmaný replikačný cyklus HCV. Toto, ale aj množstvo ďalších zistení spôsobilo veľký zlom v možnostiach liečby. Novodobé priamo pôsobiace antivirotiká (DAA) a antivírusové látky zamerané na hostiteľa (HTA) sa stali veľmi sľubnými možnosťami liečby.

Predložená diplomová práca rozoberá životný cyklus vírusov, mechanizmy a faktory, ktoré sa na procese infekcie podieľajú a zároveň sú hlavným cieľom pre vývoj nových liečebných postupov. Následne budú spomenuté najnovšie možnosti liečby HBV a HCV a posledná časť sa bližšie zameria na najčastejšie používané modelové systémy v súvislosti s týmito hepatitídami.

## **ABSTRACT**

Charles University

Faculty of Pharmacy in Hradec Králové

Department of Pharmacology & Toxicology

Student: Bc. Eva Davidovová

Supervisor: prof. PharmDr. Petr Pávek, Ph.D.

Title of diploma thesis: Viral hepatitis: novel insights and novel therapeutic interventions.

Viral hepatitis is a well-known worldwide problem. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) are characterized by the development of serious complications, especially with regard to the transition to the chronic stage of the disease, associated with the development of fibrosis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC). Interactions between viruses and host cells are quite complicated and not always fully understood. In general, the infection cycle of viruses is a multi-step process. A closer understanding of the entire life cycle of the virus is a major prerequisite for the invention of effective drugs. Viral hepatitis B and C have long been treated mainly with interferon alfa. Ribavirin was later added to HCV treatment and nucleoside / nucleotide analogs (NA) were introduced for HBV. Interferon was later pegylated to improve its properties. However, these drugs did not provide sufficient efficacy and were additionally associated with a number of side effects. It is precisely because of these disadvantages of the current treatment that an effort has been made to find new and more effective therapies.

However, the invention of new treatments has been hampered to a large extent by the lack of model systems, which are necessary not only to understand the life cycle of the virus, but also to develop drugs. Importantly, NTCP has been discovered as a major input receptor for HBV (also HDV) using model systems, and the HCV replication cycle could also be further investigated. This, as well as a number of other findings, caused a major breakthrough in treatment options. Modern direct-acting antivirals (DAAs) and host-targeting antivirals (HTAs) have become very promising treatment options.

The presented diploma thesis analyzes the life cycle of viruses, mechanisms and factors that participate in the process of infection and are also the main goal for the development of new treatments. Subsequently, the latest treatment options for HBV and HCV will be mentioned, and the last part will focus on the most commonly used model systems in connection with these hepatitis.

## Obsah

1. ZOZNAM SKRATIEK.....	8
2. ÚVOD A CIEĽ .....	14
3. VÍRUSY A ICH ŽIVOTNÝ CYKLUS .....	16
3.1 Adsorpcia .....	17
3.2 Prestup cez bunkovú membránu .....	17
3.3 Odbalenie a uvoľnenie .....	21
3.4 Replikácia genómu.....	22
3.5 Skladanie, maturácia a výstup nových vírusových častíc .....	22
3.6 Zmeny v regulácii životného cyklu.....	23
3.7 Vírus hepatitídy B .....	25
3.7.1 Genotypy HBV.....	26
3.7.2 Pripojenie častíc HBV k povrchu bunky.....	27
3.7.2.1 Nízkoafinitná väzba na heparánsulfátové proteoglykány .....	27
3.7.2.2 Vysokoafinitná väzba na NTCP receptor.....	27
3.7.3 Vírusový vstup .....	29
3.7.3.1 Faktory hostiteľskej bunky zapojené do internalizácie HBV.....	29
3.7.3.2 Endocytóza sprostredkovaná väzbou na receptory .....	29
3.7.4. Vírusový únik z endozómov a odbalenie .....	30
3.7.5 Tvorba cccDNA .....	31
3.7.6 Prepis a preklad .....	32
3.7.7 Zabalenie a syntéza vírusovej genómovej DNA .....	34
3.7.8 Zhromaždenie a uvoľnenie.....	35
3.8 Vírus hepatitídy C .....	36
3.8.1 Genóm HCV a jeho produkty .....	37
3.8.2 Genetická variabilita vírusu .....	38
3.8.3 Pripojenie HCV .....	39
3.8.3.1 Faktory pripojenia a vstupu vírusu.....	40
3.8.4 Endocytóza HCV .....	45
3.8.5 Replikačný cyklus HCV.....	46
3.8.7 Zabalenie a vylúčenie.....	48
3.8.8 Prenos z bunky na bunku .....	48
4. TERAPIA.....	50
4.1 Interferóny.....	50
4.2 Ribavirín.....	51
4.3 Liečba vírusovej hepatitídy B .....	54

4.3.1 Nukleozidové / nukleotidové analógy .....	56
4.3.2 Inhibítory pripojenia / vstupu HBV .....	57
4.3.3 Zacielenie na cccDNA a jej transkripčnú aktivitu .....	61
4.3.4 Inhibícia génovej expresie.....	63
4.3.5 Zacielenie na RNázu H .....	64
4.3.6 Inhibítory zostavy nukleokapsidu a základné inhibítory.....	64
4.3.7 Inhibítory uvoľňovania HBsAg.....	65
4.3.8 Imunoterapia .....	66
4.3.8.1 Agonisti TLR .....	66
4.3.8.2 Agonisti RIG-I .....	67
4.3.8.3 Agonisti STING .....	67
4.3.8.4 Inhibítory kontrolných bodov PD1 .....	68
4.4 Liečba hepatitídy C .....	69
4.4.1 Priamo pôsobiace antivirotiká.....	71
4.4.1.1 Inhibítory proteázy NS3 / NS4.....	73
4.4.1.2 Inhibítory komplexu NS5A.....	74
4.4.1.3 Inhibítory NS5B (RNA-dependentnej RNA polymerázy).....	74
4.4.2 Antivirotiká zamerané na hostiteľa .....	77
4.4.2.1 Inhibítory cyklofilínu .....	79
4.4.2.2 Antagonosti miR-122 .....	80
4.4.2.3 Statíny zamerané na HMG-CoA reductázu .....	80
5. POUŽÍVANÉ MODELOVÉ SYSTÉMY .....	82
5.1 Primárne ľudské hepatocyty.....	87
5.2 HepaRG.....	88
5.3 HepG2 .....	89
5.4 Huh-7 .....	90
5.5 HCVpp .....	91
5.6 HCVcc.....	92
5.7 Kmeňové bunky .....	92
5.8 Zvieracie modely.....	94
7. DISKUSIA .....	99
8. ZÁVER .....	106
9. LITERATÚRA.....	107

## 1. ZOZNAM SKRATIEK

AASLD	Americká asociácia pre štúdium chorôb pečene (American Association for the Study of Liver Diseases)
AP-2	proteínový adaptér typu 2
Apo	apolipoproteín
ATP	adenozíntrifosfát
cccDNA	kovalentne uzavretá kruhová DNA
CD	klaster diferenciácie (cluster of differentiation)
cGAS	cyklická GMP-AMP syntáza (cyclic GMP-AMP synthase)
CHB	chronická hepatitída B (chronic hepatitis B)
CHC	chronická hepatitída C (chronic hepatitis C)
CHC	klatrinový ťažký reťazec (clathrin heavy chain)
CLDN1	klaudín 1 (claudin 1)
CME	klatrinom sprostredkovaná endocytóza
CN	kalcineurín (calcineurin)
CpAM	alosterický modulátor jadrového proteínu (core protein allosteric modulator)
CRISPR	zoskupené pravidelné medzipriestorové krátke palindromické opakovania
CsA	cyklosporín A (cyclosporin A)
CTL	cytotoxické T lymfocyty (cytotoxic T lymphocytes)
CYP	cytochróm
DAA	priamo pôsobiace antivirotiká (directly acting antivirals)
DCV	daklatasvír
DHBV	kačací vírus hepatitídy B (duck hepatitis B virus)
DMSO	dimethylsulfoxid
DMV	dvojité membránové vezikuly



DNM2	dynamín 2
EASL	Európska asociácia pre štúdium pečene (European Association for the Study of the Liver)
EGFR	receptor epidermálneho rastového faktora (epidermal growth factor receptor)
EL	extracelulárna slučka (extracellular loop)
ENT1	ekvilibratívny nukleozidový transportér 1 (equilibrative nucleoside transporter 1)
EphA2	efrínový receptor 2 typu A (ephrin type A receptor 2)
ER	endoplazmatické retikulum
ESC	embryonálne kmeňové bunky (embryonic stem cells)
ETV	entekavir
FDA	Správa potravín a liečiv (Food and Drug Administration)
FEN1	klapková endonukleáza 1 (flap endonuclease 1)
GAG	glykozaminoglykány
Gt	genotyp
GTP	guanozíntrifosfát
HAP	heteroaryldihydropyrimidín
HBc	jadrový proteín vírusu hepatitídy B (HBV core protein)
HBcAg	jadrový antigén hepatitídy B (hepatitis B core antigen)
HBeAg	obalový antigén hepatitídy B (hepatitis B envelope antigen)
HBIG	imunoglobulín hepatitídy B (hepatitis B immune globulin)
HBsAg	povrchový antigén hepatitídy B
HBV	vírus hepatitídy B
HBx	x proteín hepatitídy B
HCC	hepatocelulárny karcinóm
HCV	vírus hepatitídy C

HCVcc	bunková kultúra HCV (HCV cell culture)
HCVpp	pseudočastice HCV (HCV pseudoparticles)
HDL	lipoproteín s vysokou hustotou (high density lipoprotein)
HepaRG	ľudská bipotentná progenitorová bunková línia získaná z hepatómu
HepG2	bunková línia ľudského hepatómu
HLC	bunky podobné hepatocytom (hepatocyte-like cells)
HSPG	proteoglykány heparan sulfátu (heparan sulfate proteoglycans)
HTA	antivirotiká zamerané na hostiteľa (host-targeting antivirals)
Huh-6, Huh-7	bunkové línie ľudského hepatómu
HVR1	hypervariabilná oblasť (hypervariable region)
IFITM	interferénom indukované transmembránové proteíny (interferon-induced transmembrane proteins)
IFN	interferón (interferon)
IFN- $\alpha$	interferón alfa
IFN- $\gamma$	interferón gama
IFN- $\lambda$	interferón lambda
IL	interleukín
IMP	inozín-monofosfát (inosine-monophosphate)
IMPDH	inozín-monofosfát-dehydrogenáza (inosine-monophosphate-dehydrogenase)
iPSC	indukované pluripotentné kmeňové bunky (induced pluripotent stem cells)
iPSC-HLC	bunky podobné hepatocytom pochádzajúce z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (induced pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells)
IRES	interné ribozómové vstupné miesto (internal ribosome entry site)
IRF3	interferónový regulačný faktor 3 (interferon regulatory factor 3)
ISG	gén stimulovaný interferénom (interferon-stimulated gene)

JFH-1	izolát HCV genotypu 2a získaný od pacienta s fulminantnou hepatitídou
LD	lipidová kvapôčka (lipid droplet)
LDL	lipoproteín s nízkou hustotou (low density lipoprotein)
LDLR	receptor lipoproteínov s nízkou hustotou (low density lipoprotein receptor)
LDV	ledipasvir
LHB	veľký povrchový proteín hepatitídy B
lncRNA	dlhé nekódujúce RNA
MDR1	gén mnohopočetnej liekovej rezistencie (multidrug resistance gene)
MHB	stredný povrchový proteín hepatitídy B
miRISC	miRNA indukovaný umlčovací komplex (miRNA-induced silencing complex)
miRNA	mikroRNA
mRNA	mediátorová RNA (messenger RNA)
MRP	proteín spojený s mnohopočetnou liekovou rezistenciou (multidrug resistance-associated protein)
MW	membránová sieť (membranous web)
NA	nukleozidové / nukleotidové analógy
NAP	polyméry nukleovej kyseliny
NEDD8	neurónový prekursor (neuronal precursor cell-expressed developmentally down-regulated protein 8)
NFκB	nukleárny faktor kappa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
NI	nukleozidové / nukleotidové analógové inhibítory
NNI	nenukleozidové / nenukleotidové analógové inhibítory

NOD-2	proteín obsahujúci nukleotidovú oligomerizačnú doménu 2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2)
NPC1L1	Niemann-Pick C1-Like 1 proteín
NS	neštruktúralne proteíny
NTCP	sodno-taurocholátový kotransportný polypeptid (sodium taurocholate co-transporting polypeptide)
OATP	transportné polypeptidy pre organické anióny (organic anion transporting polypeptides)
OCLN	okludín (occludin)
ORF	otvorený čítací rámec (open reading frame)
PAMP	molekulárne vzory asociované s patogénom (pathogen-associated molecular patterns)
PCR	polymerázová reťazová reakcia
PD-1	programovaný proteín bunkovej smrti 1
PD-L1	programovaný ligand smrti 1
PEG-IFN	pegylovaný interferón
pgRNA	pregenomická RNA
PPA	fenylpropenamidy
PTH	primárne hepatocyty Tupaia (primary Tupaia hepatocytes)
RAR	receptor kyseliny retinovej (retinoic acid receptor)
RBV	ribavirín
rcDNA	uvoľnená kruhová DNA (relaxed circular DNA)
RGN	nukleázy riadené RNA (RNA-guided nucleases)
RIG-I	gén I indukovaný kyselinou retinovou (retinoic acid-inducible gene I)
RNAi	RNA interferencia (RNA interference)
RNáza H	ribonukleáza H
RT	reverzná transkriptáza

sE2	rozpustná forma glykoproteínu E2
SHB	malý povrchový proteín hepatitídy B
SIM	simeprevir
siRNA	malá interferujúca RNA (small interfering RNA)
SOF	sofosbuvir
SR-BI	scavengerový receptor triedy B typu 1 (scavenger receptor class B type I)
SVP	subvírusové častice (subviral particles)
SVR	trvalá virologická odpoveď (sustained virologic response)
TAF	tenofovir-alafenamid fumarát
TALENs	transkripčné aktivátorové efektorové nukleázy
TDF	tenofovir-dizoproxil fumarát
TfR1	transferínový receptor 1
Th	pomocné T-lymfocyty
TJ	proteíny tesného spojenia (tight junction proteins)
TLR	toll-like receptory (toll-like receptors)
TNF- $\alpha$	tumor nekrotizujúci faktor alfa (tumor necrosis factor $\alpha$ )
UTR	neprekladaná oblasť (untranslated region)
VLDL	lipoproteín s veľmi nízkou hustotou (very low-density lipoprotein)
VLDLR	receptor lipoproteínov s veľmi nízkou hustotou (very low-density lipoprotein receptor)
WHV	vírus hepatitídy svišťa (woodchuck hepatitis virus)
XMP	xantosínmonofosfát
XRN 1, 2	5'-3' exoribonukleáza 1, 2 (5'-3' exoribonuclease 1, 2)
ZEB2	homeobox viažúci E-box zinkového prstu 2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2)
ZFN	nukleázy so zinkovým prstom (zinc finger nuclease)

## 2. ÚVOD A CIEĽ

Vírusy by sme mohli charakterizovať ako najrozmanitejšie biologické entity, ktoré sú zaujímavé svojou variabilitou, či už ide o rôznorodú štruktúru častíc, alebo aj charakterom informácie v sekvencii nukleových kyselín, vďaka čomu dokážu nie len ovplyvňovať, riadiť, ale aj vo svoj prospech modifikovať najkomplexnejšie deje na úrovni bunky a organizmu. Vírusy nie sú schopné podporovať infekciu svojimi vlastnými metabolickými aktivitami alebo mobilitou a namiesto toho si vyvinuli schopnosť využívať kapacity svojich hostiteľov už od prvého kroku procesu infekcie resp. od vstupu do bunky (Herrscher et al. 2020, Kostrábová et al. 2017). Infekčný cyklus vírusov vo všeobecnosti zahŕňa viacero fáz, od napojenia vírusu na bunkovú membránu prostredníctvom rôznych faktorov pripojenia, cez penetráciu, odbalenie a uvoľnenie nukleovej kyseliny, replikácie genómu až po následné skladanie, dozrievanie a sekréciu nových vírusov z bunky. Vstup vírusov do bunky je viackrokový proces na ktorom sa podieľa množstvo mechanizmov a faktorov pripojenia. Najčastejšie sa pri vstupe vírusov spomína klatrínom sprostredkovaná endocytóza a kaveolínom sprostredkovaná endocytóza, ktoré sú najlepšie študované vírusové vstupné cesty (Herrscher et al. 2020). Poškodenie pečene rôznymi vírusmi patrí medzi najčastejšie choroby vôbec. Zároveň majú niektoré vírusy (HBV, HCV) potenciál iniciovať vznik fibrózy a cirhózy pečene a prechod do hepatocelulárneho karcinómu (HCC). HBV a HCV sú charakteristické svojou schopnosťou pretrvávajúť v organizme aj po vymiznutí primárnej infekcie, čo má za následok vznik relapsu daného ochorenia. V prípade HBV je kľúčovým aspektom pre perzistenciu vírusu v organizme cccDNA. RNA vírusy ako je HCV väčšinou spôsobujú skôr akútne ako chronické ochorenie, avšak práve HCV je výnimkou, nakoľko vo veľkom počte prípadov v organizme pretrváva (Lohmann 2019).

Aj keď pripojenie vírusu a jeho následný vstup do bunky sú kľúčovými procesmi na spustenie infekcie, tak vzhľadom na terapiu je potrebné zamerať sa na rôzne fázy v životnom cykle vírusu. Dlhú dobu bola terapia hepatitídy B (ešte pred vynájdením perorálnych nukleozidových/nukleotidových analógov) založená najmä na interferóne alfa a v prípade hepatitídy C na kombinácii interferónu s ribavirínom. Pokrok nastal, keď sa interferón pegyloval, čím sa zlepšili jeho farmakokinetické vlastnosti a antivírusové účinky. Tieto liečebné režimy však vykazovali stále nízku účinnosť a množstvo nežiadúcich účinkov. Z toho dôvodu sa nové úsilie zameriava na vývoj nových a účinnejších terapeutík (Kang et al. 2015). Nevyhnutnosťou na vynájdenie nových antivírusových liekov je pochopenie rôznych mechanizmov, ktoré sa odohrávajú v samotnom životnom cykle vírusu na čo nám slúžia rôzne bunkové modely. Vyvinutie takýchto modelov na štúdium vírusovej hepatitídy bolo všeobecne náročné, ale generovaním nových komplexných systémov sa dosiahol značný pokrok. Primárne hepatocyty Tupaia a bunková línia HepaRG boli kľúčové pri identifikácii NTCP ako receptora pre HBV a HDV. Objav NTCP v roku 2012 mal za následok nie len pochopenie molekulárnych mechanizmov vstupu vírusu do buniek a objasnenie

niektorých doposiaľ neznámych krokov v životnom cykle HBV, ale aj vývoj nových infekčných systémov in vitro umožňujúcich efektívnejší skrining antivírusových liekov (Herrscher et al. 2020). Vo zvládaní liečby chronickej infekcie hepatitídy C nastal taktiež podstatne veľký zlom. Štúdie replikácie HCV v bunkovej kultúre boli prakticky nemožné až do vývoja subgenomického HCV RNA replikónu, schopného replikácie v bunkovej línii ľudského hepatómu Huh-7. Tento objav výrazne zlepšil pochopenie replikácie HCV (Vercauteren et al. 2015, Blight a Norgard 2006). Identifikácia neštrukturálnych proteínov spolu s lepším porozumením ich úloh v životnom cykle vírusu umožnilo nájsť látky, ktoré blokujú dôležité kroky v HCV replikačnom cykle (Spengler 2018). Liečivá sa častokrát užívajú v rôznych kombináciách za účelom zaistenia dostatočnej účinnosti (Lohmann 2019). Imunomodulačné látky, priamo pôsobiace antivirotiká (DAA) a antivirotiká zamerané na hostiteľa (HTA) sa zdajú byť sľubným cieľom v manažmente liečby týchto ochorení.

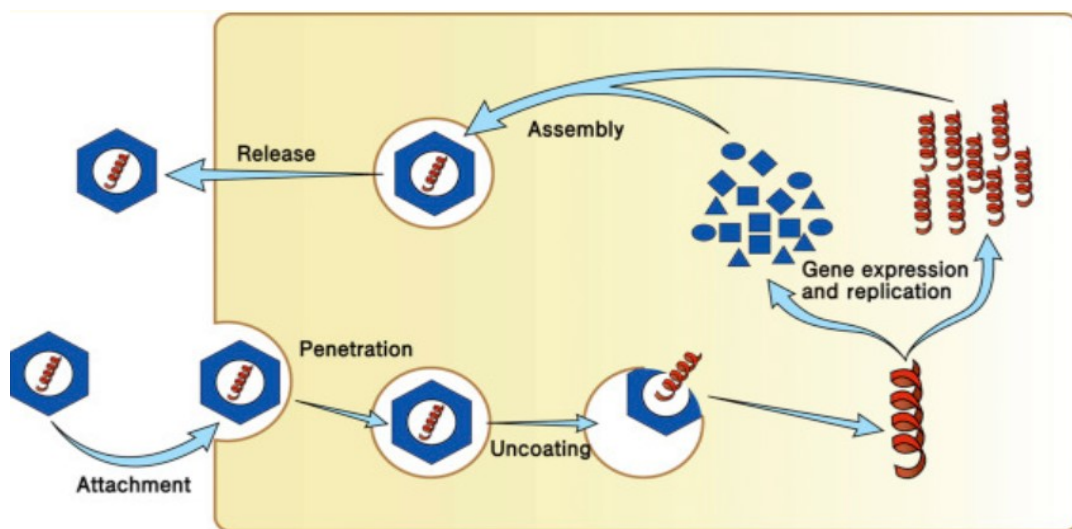
Cieľom tejto predloženej diplomovej práce je zhrnutie súčasných poznatkov o životnom cykle vírusov (konkrétnejšie HBV a HCV), vrátane ich súčasných možných liečebných postupov, ale aj ďalších možných cieľov na výskum nových liečiv. Posledná časť je venovaná používaným modelovým systémom, ktoré sú nevyhnutné na štúdium mechanizmu infekcie vírusov a na následné vynájdenie nových účinných terapeutík.

### 3. VÍRUSY A ICH ŽIVOTNÝ CYKLUS

Vírusy sú malé organizmy s jednoduchou štruktúrou a zložením, pričom je možné ich zaradiť do rôznych kategórií v závislosti od ich chemických a fyzikálnych vlastností, ako je forma nukleovej kyseliny, prítomnosť/nepítomnosť obalu, režimu replikácie, hostiteľského organizmu a typom ochorenia, ktoré spôsobujú (Dai et al. 2020). Zo všeobecného hľadiska sú vírusy charakteristické svojou diverzitou. Oproti bunkovým organizmom majú vírusy veľkú škálu možností, čo sa týka nie len ukladania svojej genetickej informácie, ale tiež aj spôsobov replikácie. Na základe ich genetického materiálu ich možno kategorizovať na DNA a RNA vírusy, pričom prevažujú (v pomere 2:1) RNA vírusy. Vírusy disponujú veľkou premenlivosťou, ktorá im zabezpečuje rýchlejšie prispôbovanie sa novým podmienkam (Kostrábová et al. 2017). Vírusy ako tzv. intracelulárne parazity, musia získať vstup do cieľových buniek a uzurpovať bunkové mechanizmy hostiteľa na produkciu vírusového potomstva. Viaceré kroky, ktoré sa podieľajú na množení vírusu v bunkách sa súhrnne nazývajú „životný cyklus vírusu“ (Ryu 2017) a všeobecne pozostáva zo šiestich základných fáz:

1. adsorpcia (pripojenie) vírusu na bunku
2. penetrácia (prestup) cez membránu bunky
3. odbalenie a uvoľnenie nukleovej kyseliny
4. replikácia genómu
5. skladanie a dozrievanie nových vírusových častíc
6. uvoľnenie vírusových častíc z bunky

(Kostrábová et al. 2017, Ryu 2017).



Obr.1 Hlavné kroky životného cyklu vírusov (Prevzaté od: Ryu 2017)



### 3.1 Adsorpcia

Proces vstupu začína rozpoznaním vírusového receptora vírusovou časticou a následným pripojením, pri ktorom sa vírusová častica stretne s hostiteľskou bunkou a pripojí sa k bunkovému povrchu (Ryu 2017, Xing et al. 2020). Vírusy sa všeobecne najprv viažu na proteíny bunkového povrchu pred samotnou interakciou so špecifickými receptormi, čo vedie k aktivácii bunkových signálnych dráh (Herrscher et al. 2020). Vírusové receptory na bunkových povrchoch môžu byť proteíny (zvyčajne glykoproteíny) prípadne sacharidové zvyšky prítomné na glykoproteínoch alebo glykolipidoch (Cann 2008). Všeobecne sa jedná najmä o makromolekuly, ktoré majú špecifické a pre bunku nevyhnutné fyziologické funkcie. Počas kroku adsorpcie sa vírus prichytáva na bunku, prostredníctvom vzájomného pôsobenia svojich štruktúr s receptormi na povrchu bunky (Kostrábová et al. 2017). Dôležité je podotknúť, že prítomnosť receptora v danej bunke je determinantom citlivosti na určitý vírus. Určuje tak typy buniek v ktorých je vírus schopný replikácie (Ryu 2017). Kostrábová et al. (2017) uvádzajú, že vírus sa môže viazať na viaceré odlišné receptory bunky a zároveň, že jeden bunkový receptor môže slúžiť pre viacero druhov vírusov. Bunky, ktoré sú voči vírusu rezistentné nemajú pre daný vírus príslušný receptor (Kostrábová et al. 2017, Cann 2008). Fáza pripojenia má preto zásadný vplyv na vírusovú patogenézu a na určovanie priebehu vírusovej infekcie (Cann 2008). Väčšina vstupných vírusových receptorov má svoje vlastné bunkové funkcie. Vírusy podkopávajú bunkové proteíny, ktoré majú svoje fyziologické funkcie a využívajú ich ako vstupné receptory. Príkladom môže byť receptor LDL, ktorého fyziologická funkcia je absorpcia častíc LDL do buniek a vírusy ho využívajú ako vstupný receptor (Ryu 2017).

### 3.2 Prestup cez bunkovú membránu

Po pripojení vírusovej častice na cieľové bunky je ďalším krokom penetrácia do cytoplazmy (Ryu 2017). K vstupu vírusovej častice do hostiteľskej bunky zvyčajne dôjde krátko po pripojení vírusu k receptoru. Na rozdiel od pripojenia je proces vstupu do bunky všeobecne závislý od energie, to znamená, že bunka musí byť metabolicky aktívna, aby k tomu mohlo dôjsť (Cann 2008). Virióny vo všeobecnosti vstupujú do hostiteľských buniek endocytózou, fúziou, alebo priamou penetráciou, pričom dominantným vstupným mechanizmom je práve endocytóza (Dai et al. 2020). Mechanizmus prieniku sa líši v závislosti od typu vírusu (Ryu 2017). Zatiaľ čo endocytóza je rozšírená medzi rôznymi typmi vírusov, fúzia je špecifická pre obalené vírusy (Dai et al. 2020, Barrow et al. 2013).

Receptorom sprostredkovaná endocytóza je vlastný bunkový mechanizmus, ktorý sa využíva na prijímanie extracelulárnych molekúl do buniek a na ich koncentráciu. Ide pravdepodobne o najbežnejší mechanizmus vstupu vírusu do buniek. (Ryu 2017, Cann 2008). Existujú dva typy bunkovej endocytózy: fagocytóza a pinocytóza (Dai et al. 2020). Zatiaľ čo fagocytóza sa typicky používa na trávenie veľkých častíc a baktérií, pinocytóza je zodpovedná za bunkový príjem

tekutín, makromolekúl a malých patogénov. Vírusy vo veľkej miere využívajú pinocytózu na pomoc pri vstupe do buniek sprostredkovaným endocytózou (Dai et al. 2020). Samotnú endocytózu je možné rozdeliť do troch podtypov, podľa použitých vezikúl: endocytóza sprostredkovaná klatrínom, endocytóza sprostredkovaná kaveolínom a endocytózu, ktorá nie je sprostredkovaná ani kaveolínom ani klatrínom (Kostrábová et al. 2017, Dai et al. 2020). Endocytózy sprostredkované klatrínom či kaveolínom sú najlepšie študované endocytózne cesty, bežne používané v súvislosti s vírusmi, pričom dynamín hrá v týchto dráhach rozhodujúcu úlohu tým, že odštiepi endocytové vezikuly z plazmatickej membrány (Herrscher et al. 2020).

#### Klatrínmi sprostredkovaná endocytóza

Ide o jednu z najlepšie charakterizovaných typov endocytózy pre vstup vírusu (Dai et al. 2020), ktorá je nevyhnutná pre veľké množstvo vírusov na dosiahnutie produktívnej infekcie (Grove a Marsh 2011). Endocytózu sprostredkovanú klatrínom možno rozdeliť do štyroch etáp, a to na: iniciáciu, stabilizáciu, zrenie a štiepenie membrány (Mettlen et al. 2018). Po naviazaní vírusovej častice na receptor sa vytvorí jamka pokrytá klatrínom (clathrin-coated pits) (Ryu 2017, Dai et al. 2020). Tieto jamky sú internalizované za vzniku klatrínom potiahnutých vezikúl (Dai et al. 2020, Ryu 2017). V nasledujúcich krokoch sú potiahnuté vezikuly uvoľnené, rýchlo odbalené a prechádzajú mnohými fúznymi dejmi až nakoniec dodajú svoj náklad do skorých endozómov (Mettlen et al. 2018, Dai et al. 2020, Ryu 2017).

#### Kaveolínom sprostredkovaná endocytóza

V prípade kaveolínom sprostredkovanej endocytózy slúži kaveolín namiesto klatrínu ako plášťový proteín. Inak je to podobné ako pri klatrínmi sprostredkovanej endocytóze (Grove a Marsh 2011).

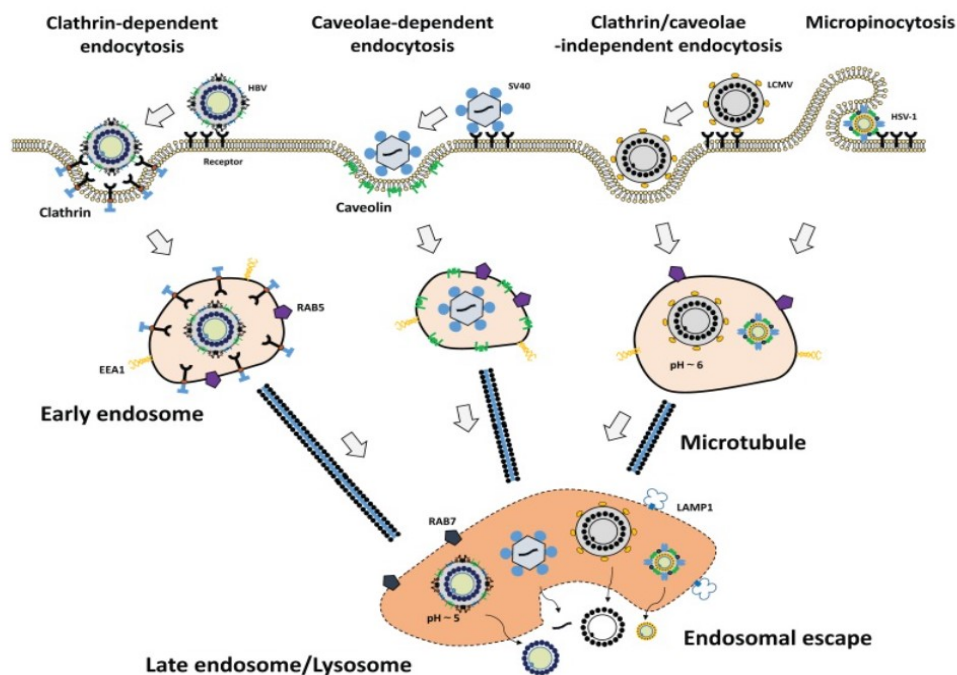
#### Endocytóza nezávislá od klatrínu ani kaveolínu

Dráha endocytózy ktorá nie je sprostredkovaná ani klatrínom ani kaveolínom, zdieľa mnoho funkcií s profesionálnou fagocytózou, ktorá pravdepodobne vyžaduje preskupenie aktínu, zostavenie dynamínu, zapojenie RhoA (Ras homolog family member A) GTPázy a tyrozínkinázy. K adsorpcii dochádza na povrchu buniek po ktorej nasleduje absorpcia podobná fagocytóze a transport sprostredkovaný fagozómami (Dai et al. 2020).

#### Makropinocytóza

Makropinocytóza je prechodný proces, ktorý je indukovaný rastovým faktorom a je závislý od aktínu, ktorý často zahŕňa tvorbu membránových „volánikov“ a veľkých vakuol. Tento mechanizmus zvyčajne sprostredkúva príjem veľkého množstva extracelulárnej tekutiny a objemného nákladu, ako sú apoptické telieska (Grove a Marsh 2011, Barrow et al. 2013). Používa

sa ale aj na vstup častíc s väčšou veľkosťou (Ryu 2017) a môže tiež riadiť absorpciu vírusov (Barrow et al. 2013). Vírusová častica najskôr aktivuje signalizačné dráhy, ktoré vyvolávajú aktívnymi sprostredkované „rozvlnenie“ a praskanie membrány. Po vytvorení veľkých vakuol (makropinozómov) na plazmatickej membráne nasleduje internalizácia vírusových častíc a penetrácia vírusov, alebo ich kapsidov do cytosolu (Ryu 2017). Makropinocytóza sa môže vyskytnúť konštitutívne v profesionálnych fagocytoch, ako sú dendritické bunky, ale môže byť indukovaná aj v iných bunkových typoch aktiváciou tyrozínkináz, ako je EGFR (Grove a Marsh 2011).



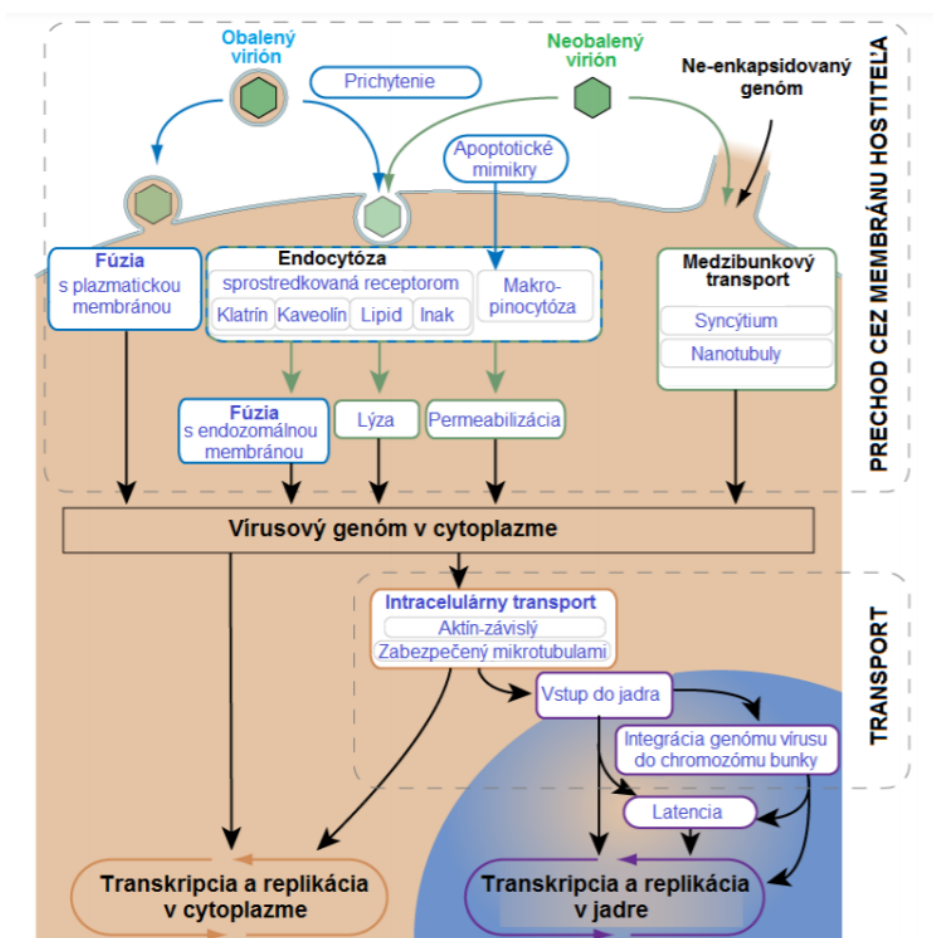
Obr. 2 Typy dráh endocytózy pri prijímaní vírusov bunkami (Prevzaté od: Somiya et al. 2017)

### Fúzia

Fúzia je typický proces pre obalené vírusy, pri ktorom sa spájajú dve membrány (tj. vírusový obal a bunková membrána), pričom vírusy prenikajú do buniek bez narušenia bunkovej membrány (Ryu 2017, Dai et al. 2020). V tomto prípade je vírusový nukleokapsid priamo dodávaný do cytoplazmy a zanecháva vírusový obal na plazmatickej membráne (Ryu 2017). Je dôležité podotknúť, že fúzia vírusového obalu (ak je prítomný) s bunkovou membránou nastáva buď priamo na povrchu bunky, alebo aj po endocytóze v cytoplazmatickej vezikule (viď kapitolu 3.3) (Cann 2008). V oboch prípadoch je ale táto fúzia sprostredkovaná vírusovým fúznym peptidom. Jeho aktivita sa spúšťa rôznym spôsobom, v závislosti od typu vírusu (Kostrábová et al. 2017).

### Prenos z bunky na bunku

Kedysi sa verilo, že vírusy môžu infikovať susedné bunky iba extracelulárnym uvoľňovaním z infikovaných buniek. Na rozdiel od tejto domnienky bol opísaný nový mechanizmus, pri ktorom môže vírus infikovať susednú bunku bez toho, aby sa uvoľnil. Boli opísané odlišné spôsoby mechanizmov prenosu z bunky na bunku. Prvý alternatívny spôsob preniknutia vírusov do bunky je sprostredkovaný fúziou plazmatickej membrány medzi dvoma bunkami. Vírusové kapsidy sa prenášajú z infikovanej bunky do neinfikovaných buniek bez toho, aby boli obalené. Za ďalšie, k prenosu medzi bunkami môže dochádzať aj úzkym spojením. Vírus vychádza bazolaterálne z infikovanej bunky a je zachytený medzi infikovanou a neinfikovanou bunkovou membránou v tesných spojoch. Pomocou vírusových vstupných receptorov na cieľovej bunke vstupujú virióny do neinfikovaných cieľových buniek. Tento spôsob prenosu z bunky na bunku je opísaný u herpesvírusu a HCV (Ryu 2017). Kostrábová et al. (2017) uviedli, že transport z bunky do bunky je sprostredkovaný pomocou nanotubúl, alebo vytváraním syncýtií. To, že sa prenos medzi bunkami zistil iba pri obalených vírusoch je možné z dôvodu, že pre neobalené vírusy je zbytočný, keďže sa pri rozpade bunky náhle uvoľní veľké množstvo viriónov (Ryu 2017).

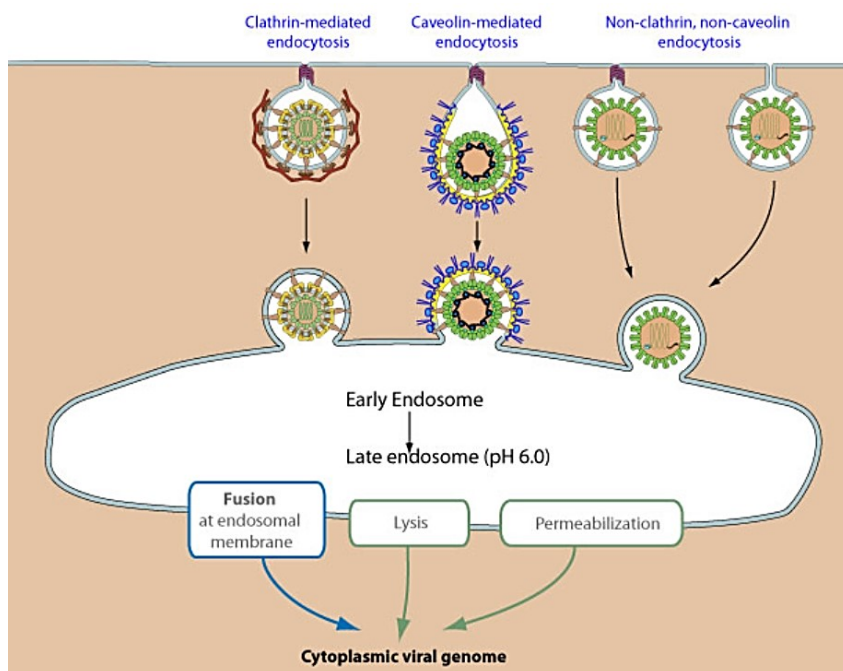


Obr. 3 Mechanizmy vstupu vírusov do bunky (Prevzaté od: Kostrábová et al. 2017)

### 3.3 Odbalenie a uvoľnenie

Bez ohľadu na mechanizmus absorpcie sa väčšina vírusov internalizovaných endocytózou dodáva do endozómov (Grove a Marsh 2011). V tomto okamihu je akýkoľvek vírus stále odrezaný od cytoplazmy, a preto sa striktné nedostal do bunky (Cann 2008). Častice vírusu tým pádom musia transportovať genetický materiál cez obmedzujúce membrány (Grove a Marsh 2011). Vstup do endocytovej dráhy je pre vírusy nebezpečný proces, pretože ak zostanú vo vezikule príliš dlho, tak budú nenávratne poškodené nízkym pH alebo lyzozomálnymi enzýmami (Cann 2008). Endozomálnym dozrievaním k neskorým endozómom a lyzozómom dochádza ku znižovaniu luminálneho pH a zároveň ku zvýšeniu hladín aktívnych hydrolytických (degradačných) enzýmov a zmenám lipidového zloženia (Cann 2008, Grove a Marsh 2011). Vírus teda musí opustiť vezikulu a vstúpiť do cytoplazmy skôr, ako dôjde k jeho degradácii (Cann 2008). V závislosti od okolitého prostredia sa vírusy aktivujú tak, aby vykonali funkcie na takýto únik z endozómov (endocytických vezikúl) (Somiya et al. 2017).

Z endocytickej vezikuly sa vírus môže uvoľniť buďto fúziou s endozomálnou membránou, lýzou alebo permeabilizáciou, pričom membránová fúzia je mechanizmom penetrácie obalových vírusov, zatiaľ čo lýza membrány je mechanizmom penetrácie pre neobalené vírusy (Ryu 2017, Kostrábová et al. 2017). V prípade fúzie je fúzny peptid zabudovaný do obalového glykoproteínu a stane sa exponovaným (tj. aktivovaným) v dôsledku konformačnej zmeny pri nízkom pH. V prípade neobalených nahých vírusov je lýza endozómov vyvolaná jedným z kapsidových proteínov (Ryu 2017).



Obr. 4 Endocytózy a endozomálny únik (Prevzaté zo: SIB Swiss Institute of Bioinformatics; Viral Zone) Dostupné z: [https://viralzone.expasy.org/977?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/977?outline=all_by_species)

Konečný produkt odbaľovania závisí od štruktúry genómu / nukleokapsidu vírusu. V niektorých prípadoch je výsledná štruktúra pomerne jednoduchá, avšak v iných prípadoch je zostávajúce jadro vírusu veľmi zložitá a odbaľovanie prebieha v dvoch fázach (Cann 2008).

Po úspešnej penetrácii do buniek sa musia vírusové častice dostať na príslušné miesto v bunke na replikáciu genómu (Ryu 2017). Vírusy sa môžu replikovať buď v cytoplazme, alebo v jadre. Pre vírusy, ktoré sa replikujú v cytoplazme je potrebné smerovať vírusové nukleokapsidy na miesto replikácie. V druhom prípade, keď sa vírusy replikujú v jadre, tak prechádzajú cez jadrové póry, alebo vyčkáujú na delenie bunky, kedy dochádza k rozrušeniu jadrovej membrány (Kostrábová et al. 2017, Ryu 2017).

### **3.4 Replikácia genómu**

Nato, aby sa vírusy udržali, tak sa množstvo z nich musí neustále replikovať. Spravidla DNA vírusy replikujú svoje genómy priamo na DNA, zatiaľ čo RNA vírusy replikujú svoje genómy priamo na RNA. Niektoré DNA vírusy však kopírujú svoje genómy prostredníctvom RNA medziproduktu a niektoré RNA vírusy kopírujú svoje genómy prostredníctvom DNA medziproduktu (Wang et al. 2017). To, že sa vírusy môžu replikovať v jadre alebo v cytoplazme je dané typom vírusu, najmä jeho nukleovou kyselinou, enzymatickou výbavou alebo požiadavkami pri gémovej transkripcii (Kostrábová et al. 2017).

### **3.5 Skladanie, maturácia a výstup nových vírusových častíc**

K posledným krokom patrí samotné skladanie (montáž), dozrievanie (maturácia) a až potom nasleduje uvoľnenie nových vírusových častíc. Tieto kroky prebiehajú taktiež odlišne v závislosti od typu vírusu (Kostrábová et al. 2017). Počas montáže sa formuje základná štruktúra vírusovej častice, pretože všetky zložky potrebné na tvorbu zrelého viriónu sa zhromažďujú na konkrétnom mieste bunky. Miesto zhromaždenia závisí od spôsobu replikácie vírusu a mechanizmu, ktorým sa vírus nakoniec uvoľní z bunky, a tak sa líši pre rôzne vírusy. Aj keď sa niektoré častice vírusu DNA tvoria v jadre, tak cytoplazma je najbežnejším miestom zhromažďovania častíc (Cann 2008).

Rastúce intracelulárne hladiny vírusových proteínov a genómov dosahujú kritickú koncentráciu, čo spúšťa ich zhromaždenie (Cann 2008). Keď sa kapsidy zhromaždia v bunke, získa sa najčastejšie produkt, ktorý ale ešte nedosiahol svoju plne infekčnú formu (San Martín 2019). Na dosiahnutie tohto cieľa slúži maturácia resp. dozrievanie vírusu, čo je štádiom replikačného cyklu v ktorom sa vírusové častice stávajú infekčnými (Cann 2008, San Martín 2019, Veessler a Johnson 2012, Steven et al. 2005). Tento proces sa pozoruje prakticky u všetkých dobre študovaných živočíšnych aj bakteriálnych vírusov (Veessler a Johnson 2012).

Mechanizmy dozrievania sú pri porovnaní rôznych skupín vírusov odlišné, čo naznačuje konvergentný vývoj smerom k vyššej sofistikovanosti tohto základného procesu (Veesler a Johnson 2012). Maturácia vírusu si vyžaduje zmeny v konformácii a stabilite v novovzniknutej častici. Tieto štrukturálne zmeny sú často riadené proteolytickým štiepením (San Martín 2019, Cann 2008, Steven et al. 2005). Proteázy sa často podieľajú na dozrievaní. Môžu sa použiť vírusom kódované enzýmy, bunkové proteázy, alebo ich zmes. Vírusom kódované proteázy sú zvyčajne vysoko špecifické pre konkrétne aminokyselinové sekvencie, štruktúry a štiepia konkrétnu peptidovú väzbu v konkrétnom proteíne (Cann 2008).

Ak sú vírusy neobalené, tak ich skladanie zahŕňa reorganizáciu štruktúr v mieste ich formovania. Dochádza ku spájaniu predformovaných kapsomérov za účelom tvorby prázdnych kapsidov, resp. viriónových prekursorov. Na druhej strane, formovanie nukleokapsidu, ktoré zahŕňa syntézu proteínových častí na cytoplazmatických ribozómoch a ich následné poskladanie na komponenty kapsidu je charakteristické pre obalené vírusy. Tento nukleokapsid je následne obalený membránou (Kostrábová et al. 2017).

U väčšiny neobalených vírusov je uvoľnenie jednoduchý proces - infikovaná bunka sa rozbije a vírus sa uvoľní. Dôvody na lýzu infikovaných buniek nie sú vždy jasné, avšak vírusom infikované bunky sa často rozpadajú, pretože vírusová replikácia narúša normálnu bunkovú funkciu (napríklad expresiu základných génov). Mnoho vírusov tiež kóduje proteíny, ktoré stimulujú (alebo v niektorých prípadoch potláčajú) apoptózu, čo môže tiež viesť k uvoľňovaniu vírusových častíc. Na druhej strane, obalené vírusy získavajú svoj lipidový obal, keď vyrážajú z bunky cez bunkovú membránu, alebo do intracelulárnej vezikuly, pred následným uvoľnením. Vírusové obalové proteíny sa počas tohto procesu zachytávajú pri extrúzii vírusových častíc. Tento proces sa nazýva pučanie (Cann 2008).

### **3.6 Zmeny v regulácii životného cyklu**

Na replikáciu svojich genómov v bunkách a na generovanie nových potomkov si vírusy vyžadujú faktory poskytované bunkami, ktoré infikovali. Vírusy si vyvinuli viacero mechanizmov na manipuláciu s prostredím infikovaných buniek s cieľom efektívnejšej replikácie a využívania rôznych stratégií na dereguláciu kontrolných bodov bunkového cyklu a moduláciu dráh bunkovej proliferácie (Bagga a Bouchard 2014).

Množstvo DNA vírusov indukuje pokojové bunky aby vstúpili do bunkového cyklu a predpokladá sa, že to zvyšuje zásoby deoxynukleotidov, čím sa uľahčí vírusová replikácia. Niektoré vírusy na druhej strane môžu zadržať bunky v konkrétnej fáze bunkového cyklu, ktorá je priaznivá pre ich replikáciu. Takéto zastavenie bunkového cyklu môže inhibovať včasnú bunkovú smrť infikovaných buniek, umožniť bunkám vyhnúť sa imunitnej ochrane, alebo podporiť zhromažďovanie vírusov (Bagga a Bouchard 2014).

Tieto mechanizmy umožnia vírusom vytvoriť ideálne prostredie, ktoré podporuje samotné ochorenie, vrátane jeho rozvoja či progresie, alebo môže priamo ovplyvňovať onkogénny potenciál tohto vírusu (Bagga a Bouchard 2014). Narušenie normálnych mechanizmov, ktoré regulujú bunkový cyklus, prispieva k rozvoju mnohých druhov rakoviny (Bagga a Bouchard 2014). Stimulácia syntézy hostiteľskej DNA, mRNA a proteínov, ktorú sú niektoré vírusy schopné vyvolať je dôležitým aspektom pre vznik a rozvoj rakoviny (Kostrábová et al. 2017). Medzi vírusy, ktoré spôsobujú u ľudí rakovinu patrí (okrem iných) aj HBV a HCV (Bagga a Bouchard 2014).

Rast rakovinových buniek si navyše vyžaduje aj preprogramovanie metabolizmu bunky. Tieto zmeny v metabolizme v rakovinových bunkách zahŕňajú zvýšené vychytávanie a metabolizáciu glukózy hlavnou cestou glykolýzy. Spotreba kyslíka je však spomalená, ale nie úplne zrušená, zatiaľ čo bunky vylučujú veľké množstvo laktátu. Tento stav sa nazýva aeróbná glykolýza resp. „Warburgov efekt“. Zatiaľ čo Otto Warburg považoval tento účinok za príčinu rakoviny, teraz vieme, že rakovinu indukujú v bunkách zmeny génovej expresie ovplyvňujúce reguláciu rastu, apoptózy a bunkového cyklu. Aeróbná glykolýza je však stav, ktorý sa všeobecne pozoruje v mnohých rakovinových bunkách. V súlade s preprogramovaním rakovinových buniek, aby tiež rástli za podmienok s nízkym obsahom kyslíka sa preukázalo, že replikácia HCV sa pri nízkom tlaku kyslíka ešte zvyšuje. Aj keď progresia pečňových buniek k histologicky detekovateľnej fibróze, cirhóze a nakoniec k HCC zvyčajne trvá roky, tak sa zdá, že HCV indukuje metabolické zmeny, ktoré smerujú bunku k Warburgovmu efektu pomerne rýchlo (niekoľko dní alebo týždňov po infikovaní bunky) (Gerresheim et al. 2019).

Aj keď väčšinu faktorov o ktorých je známe, že regulujú životný cyklus vírusov tvoria proteíny, bolo overené, že v týchto procesoch zohrávajú úlohu aj dlhé nekódujúce RNA (lncRNA), ktoré sa nachádzajú okrem iného aj vo vírusoch (Wang et al. 2017).

#### *Dlhé nekódujúce RNA*

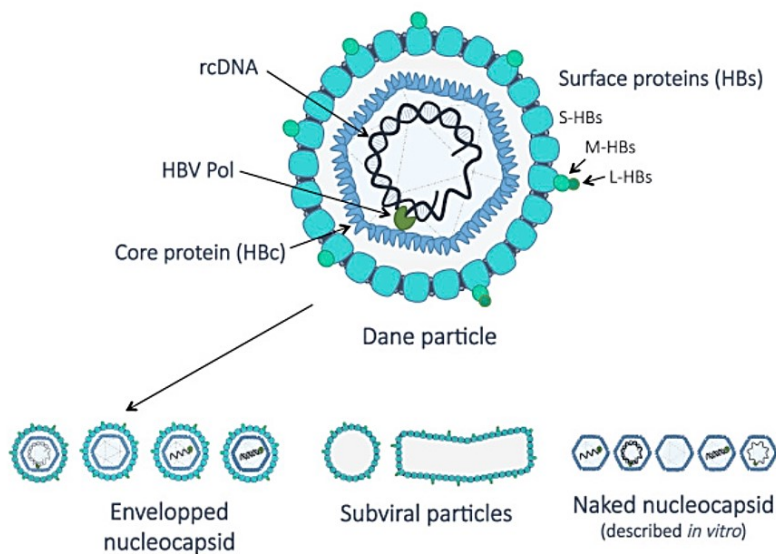
Posledné objavy naznačujú, že lncRNA majú rôzne regulačné úlohy vo viacerých hlavných biologických a patologických procesoch. Počas životných cyklov vírusu sú lncRNA zapojené do série krokov, vrátane zvýšenia expresie vírusového génu, podpory replikácie vírusu, zabalenia genómu, podpory uvoľňovania viriónu, udržiavania latencie vírusu a podpory transformácie vírusu. Okrem toho lncRNA antagonizujú hostiteľské antivírusové vrodene imunitné reakcie. Počas vírusovej infekcie vírusy generujú lncRNA na uľahčenie indukcie cytopaticity a patogenity. Niektoré lncRNA generované vírusmi, preukázali svoju úlohu aj pri zabezpečovaní rezistencie na antivírusové imunitné odpovede a niektoré nekódujúce gény môžu navyše pôsobiť ako bifunkčné faktory na podporu vstupu vírusu, alebo na udržanie latentného stavu (Wang et al. 2017).



### 3.7 Vírus hepatitídy B

Vírus hepatitídy B (HBV) spôsobuje akútnu aj chronickú infekciu a predstavuje viac ako 600 000 úmrtí ročne (Baudi et al. 2020, He et al. 2016). Aj napriek vysoko účinnej (profylaktickej) vakcíne zostáva teda infekcia HBV veľkou záťažou pre verejné zdravie s vysokým počtom obetí (Hu et al. 2019b). Na celom svete sú infikované vírusovou hepatítidou B približne 2 miliardy ľudí a viac ako 350 miliónov sú chronickí prenášači (He et al. 2016). Chronická infekcia vírusom hepatitídy B je na celom svete hlavnou príčinou fibrózy, cirhózy pečene a HCC (He et al. 2016, Megahed et al. 2020). Táto parenterálne prenosná vírusová hepatitída B je jedným z najzávažnejších rizík zdravotných pracovníkov v rozvojových krajinách (Hůlek a Urbánek 2018).

HBV je malý, obalený DNA vírus, patriaci do rodu Orthohepadnavirus a čelade Hepadnaviridae (Hůlek a Urbánek 2018). HBV sa nachádza v krvi v niekoľkých rôznych formách (Herrscher et al. 2020, Tsukuda a Watashi 2020). V sére infikovaných pacientov sa pozorujú najmenej tri typy častíc HBV. Sférické štruktúry s priemerom 42 nm, ďalšie s priemerom 22 nm a vlákna s premenlivou dĺžkou s priemerom 22 nm (Tsukuda a Watashi 2020).



Obr. 5 Schematické znázornenie častíc HBV (Prevzaté od: Tsukuda a Watashi 2020)

Prvé 42 nm častice s globulárnou štruktúrou, tiež nazývané aj Daneove častice sú infekčné virióny pozostávajúce z lipidovej membrány s tromi vírusovými povrchovými proteínmi (HBs), veľkými (L-HBs), strednými (M-HBs) a malými (S-HBs), ktoré obklopujú nukleokapsid. Nukleokapsid je zložený z jadrového proteínu hepatitídy B (HBc), vírusovej polymerázy a DNA vírusového genómu. Čiastočne dvojvláknový kruhový genóm HBV je tiež známy ako uvoľnená kruhová DNA (rcDNA) a vírusová polymeráza (proteín P) je kovalentne zosieťovaná s touto rcDNA (Hwang a Park 2018, Tsukuda a Watashi 2020, Herrscher et al. 2020). Obalové

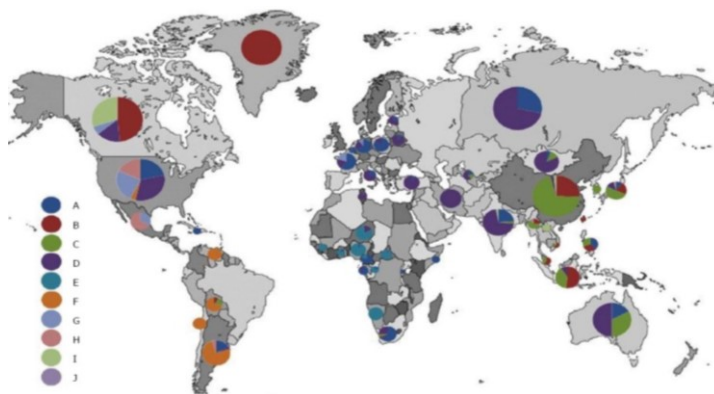
proteíny obsahujú domény, nevyhnutné pre pripojenie k hepatocytom (Herrscher et al. 2020). C-koncová S doména je spoločná pre všetky tri obalové proteíny. M proteín obsahuje aj extra N-koncovú doménu preS2 a L proteín obsahuje okrem preS2 a S aj doménu preS1 (Herrscher et al. 2020).

Medzi 22 nm častice patria subvírusové častice (SVP), ktoré sú v sére pacienta omnoho početnejšie, nakoľko sa vylučujú v oveľa väčšom množstve ako virióny, avšak chýba im ale nukleokapsid a sú teda neinfekčné (Herrscher et al. 2020, Tsukuda a Watashi 2020). V súčasnosti je tiež známe, že existujú aj ďalšie neinfekčné častice produkované infekciou, vrátane obalených častíc, ktorým chýba vírusový genóm, tých ktoré obsahujú vírusovú RNA a častíc bez obalu (nahé nukleokapsidy) (Tsukuda a Watashi 2020). Relevantnosť SVP v životnom cykle zostáva nejasná. Bolo navrhnuté, že SVP pôsobia ako návnada pre imunitný systém a chránia Daneove častice pred neutralizujúcou humorálnou odpoveďou (Herrscher et al. 2020). Je nutné podotknúť, že široké použitie vakcín na báze HBV SVP významne znížilo mieru infekcie HBV (Herrscher et al. 2020).

### 3.7.1 Genotypy HBV

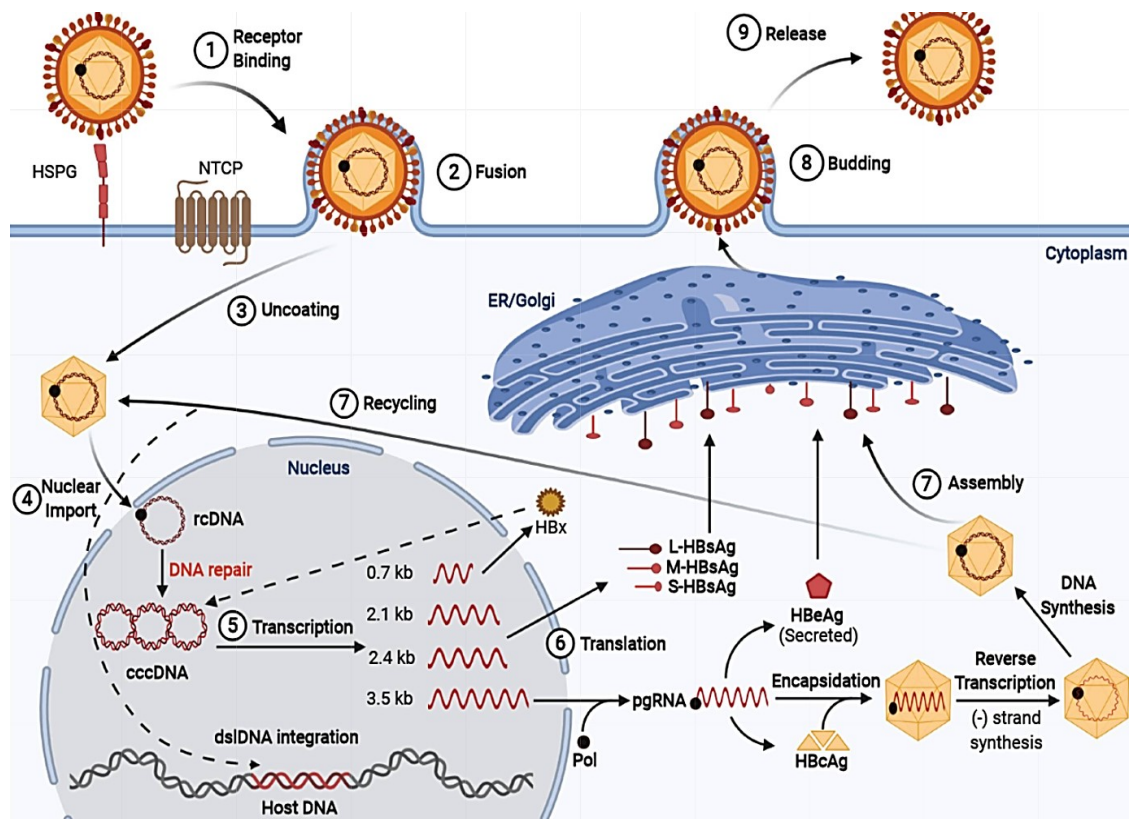
HBV je podľa sekvencie genómu diferencovaný do mnohých genotypov. Doteraz bolo definovaných osem známych genotypov (A-H) genómu HBV. Okrem toho boli tiež identifikované dva nové genotypy, I a J. Niektoré genotypy HBV sa ďalej klasifikujú ako subgenotypy. Sekvencia HBV je charakterizovaná > 8% nukleotidovými rozdielmi pre genotyp a 4% až 8% nukleotidovými rozdielmi pre subgenotyp. Doteraz bolo určených viac ako 30 príbuzných subgenotypov patriacich ku genotypom HBV. Genotypy A-D a F sú rozdelené do rôznych subgenotypov, pričom pre genotypy E, G a H neboli definované žiadne subgenotypy.

Mechanizmy rôznych patogénnych charakteristík genotypov HBV nie sú s určitosťou známe. Mnoho štúdií ale uvádza, že rôzne genotypy a subgenotypy vykazujú rozdielne geografické rozloženie a súvisia s progresiou ochorenia, klinickou progresiou, odpoveďou na antivírusovú liečbu a prognózou (Sunbul 2014).



Obr. 6 Geografické rozloženie genotypov HBV na celom svete (Prevzaté od: Sunbul 2014)

### 3.7.2 Pripojenie častíc HBV k povrchu bunky



Obr. 7 Životný cyklus HBV (Prevzaté od: D'souza et al. 2020).

#### 3.7.2.1 Nízkoafinitná väzba na heparánsulfátové proteoglykány

Životný cyklus HBV začína v okamihu, keď sa vírus pripojí k membráne hostiteľskej bunky (Sai et al. 2016). HBV sa pripája k hepatocytom interakciou medzi doménou preS1 proteínu LHB na obale HBV a na povrchu hepatocytov heparánsulfátovými proteoglykánmi (HSPG) (Sai et al. 2016, Hwang a Park 2018), ako je glypican 5, nešpecifickým a nízkoafinitným spôsobom (Tsukuda a Watashi 2020, D'souza et al. 2020). HSPG sú glykoproteíny, obsahujúce jeden alebo viac reťazcov heparan sulfátu, nachádzajúcich sa na povrchu buniek a v extracelulárnej matrici takmer všetkých buniek. HSPG majú dôležité fyziologické funkcie a sú zapojené do pripojenia mnohých vírusov (Herrscher et al. 2020).

#### 3.7.2.2 Vysokoafinitná väzba na NTCP receptor

Vstup HBV do ľudských hepatocytov je sprostredkovaný prostredníctvom polypeptidu kotransportujúceho taurocholát sodný (NTCP) a nedávne údaje naznačujú, že zahŕňa aj receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR) (Hu et al. 2019b)

Po nízkoafinitnej väzbe k HSPG, nasleduje väzba vysokoafinitná na NTCP receptor, ktorý uľahčuje vstup (D'souza et al. 2020, Mitra et al. 2018, Herrscher et al. 2020).

Vysokoafinitná interakcia medzi myristoylovanou N-terminálnou oblasťou PreS1 L proteínu s NTCP a pravdepodobne ďalšími hosťiteľskými faktormi spúšťa absorpciu viriónu (pravdepodobne endocytózou) (Nassal 2015).

Hlavným prielomom bol práve objav NTCP, ako diferenciačne závislého, hepatocytovo a druhovo špecifického HBV receptora bunkovej membrány (König et al. 2019). NTCP je kódovaný génom SLC10A1 a nachádza sa predovšetkým na bazolaterálnej membráne hepatocytov (Herrscher et al. 2020). Okrem toho, že je NTCP zodpovedný za absorpciu konjugovaných žlčových kyselín z krvi do pečene (Donkers et al. 2019, Tsukuda a Watashi 2020), tak je aj vstupným receptorom pre vírus hepatitídy B a D (Donkers et al. 2019, Tsukuda a Watashi 2020). Identifikácia tohto dlho hľadaného receptora špecificky exprimovaného v pečeni (Tsukuda a Watashi 2020, Allweiss a Dandri 2016, König et al. 2019) pripravila cestu pre vývoj nových infekčných systémov in vitro, umožňujúcich efektívnejší skrining antivírusových liekov a objasnenie niektorých doposiaľ neznámych krokov v životnom cykle HBV (Allweiss a Dandri 2016).

V roku 2012 identifikovali vedeckí pracovníci NTCP ako receptor pre vírusy HBV, HDV a následne toto zistenie nezávisle potvrdili aj ďalší, ktorí porovnávali profily génovej expície diferencovaných a nediferencovaných buniek HepaRG a demonštrovali, že eliminácia NTCP blokovala infekciu HBV. Navyše exogénna expresia NTCP učinila ľudské a Tupaia bunkové línie hepatómu citlivými na infekciu HBV (viď kapitolu 5) (Herrscher et al. 2020). NTCP bol identifikovaný ako faktor -48 oblasti preS1, o ktorej sa už vedelo, že je nevyhnutná pre väzbu na receptor (Tsukuda a Watashi 2020). Doména preS1 je nevyhnutná pre infekčnosť HBV, pretože sprostredkováva interakciu vírusu s bunkami. Oblasť medzi aminokyselinami 2 a 47 v preS1 bola zahrnutá do väzby na hepatocyty. Zistilo sa, že delécia 11 aminokyselín v oblasti preS1 zvyšuje infekčnosť častíc HBV (Herrscher et al. 2020). V posledných rokoch sa ako možné receptory pre HBV navrhlo množstvo hosťiteľských faktorov, vrátane asiaglykoproteínového receptora, transferínového receptora, IL-6 receptora a polymerizovaného ľudského albumínového receptora, avšak žiadny z týchto faktorov nečinil bunky hepatómu náchylným na infekciu HBV (Herrscher et al. 2020).

NTCP je vyjadrený v stredných až vysoko diferencovaných HCC, ale nie v slabo diferencovaných HCC. Jeho expresia je znížená pri väčšine ochorení pečene. Expresia NTCP sa po izolácii primárnych ľudských hepatocytov rýchlo stráca. Tieto pozorovania môžu vysvetliť, prečo zhubné bunky hepatómu nepodporujú infekciu HBV a HDV a prečo sú primárne hepatocyty citlivé na HBV iba niekoľko dní po izolácii (Herrscher et al. 2020).

### **3.7.3 Vírusový vstup**

#### **3.7.3.1 Faktory hostiteľskej bunky zapojené do internalizácie HBV**

NTCP je jednoznačne nevyhnutný, ale nie dostatočný na účinnú infekciu. To, či HBV interaguje s inými receptormi počas penetrácie bunkami zostáva nejasné. Je známe, že vírusy interagujú s niekoľkými hostiteľskými faktormi, aby iniciovali vstup. Faktory koreceptorov a hostiteľských buniek požadované pre vstup do HBV neboli ešte ale úplne objasnené. Zistenie, že v bunkových líniiach nadmerne exprimujúcich NTCP bola účinnosť infekcie relatívne nízka naznačuje, že sú potrebné ďalšie faktory hostiteľa pre citlivosť na infekciu HBV, potenciálne prostredníctvom vytvorenia komplexu a viacstupňového procesu vstupu (Herrscher et al. 2020).

Jedna štúdia identifikovala receptor epidermálneho rastového faktora (EGFR) ako kofaktor vstupu hostiteľa, ktorý spúšťa internalizáciu HBV (D'souza et al. 2020, Herrscher et al. 2020). V súlade s týmto zistením sa ukázalo, že bunková línia HepG2 má oveľa nižšie hladiny EGFR ako iné bunkové línie hepatocytov, čo je potenciálne zodpovedné za nízku mieru infekcie (Herrscher et al. 2020). Tsukuda a Watashi (2020) vo svojom článku uvádza, že receptorová tyrozínkináza, epidermálny rastový faktor (EGFR), spúšťa internalizáciu HBV/HDV prostredníctvom jeho priamej interakcie s NTCP. Taktiež bolo publikované, že NTCP môže byť oligomerizovaný a stav oligomerizácie moduluje schopnosť NTCP sprostredkovať vírusovú internalizáciu. Predpokladá sa, že internalizácia vo vezikulách indukuje fúziu medzi vírusovým obalom a vezikulárnou membránou pochádzajúcou z buniek, hoci tento mechanizmus zostáva do značnej miery neznámy (Tsukuda a Watashi 2020).

Ďalšia štúdia odhalila požiadavku na proteín hostiteľskej bunky E-kadherín, na vápniku závislý proteín adhézie buniek, pri vstupe do HBV. Ukázalo sa, že E-kadherín hrá rozhodujúcu úlohu pri vstupe do HBV ovplyvnením distribúcie NTCP. Tento proteín sa viaže na glykozylovaný NTCP a uľahčuje relokalizáciu NTCP na bazolaterálnu plazmatickú membránu. Bunková polarizácia bola opísaná ako povinný mechanizmus pre produktívny vstup HBV. Pretože polarizácia buniek indukuje relokalizáciu proteínov bunkovej adhézie ako je E-kadherín na plazmatickú membránu, tak by sa toto pozorovanie dalo čiastočne vysvetliť dôležitosťou E-kadherínu pre absorpciu HBV. Zaujímavý je fakt, že polarizácia buniek na druhej strane obmedzuje vstup HCV cez tesné spojenia (TJ), ktoré vytvárajú fyzickú bariéru a obmedzujú prístup vírusu k receptorom (Herrscher et al. 2020).

#### **3.7.3.2 Endocytóza sprostredkovaná väzbou na receptory**

Po naviazaní na hepatocyt prostredníctvom NTCP musí HBV vstúpiť do bunky (Herrscher et al. 2020, Megahed et al. 2020, Hwang a Park 2018). Predpokladá sa, že k tomuto vstupu dochádza prostredníctvom endocytózy (Tsukuda a Watashi 2020, Herrscher et al. 2020). Je ale potrebné

ešte určiť podrobné mechanizmy, ktorými NTCP sprostredkováva vstup HBV (Herrscher et al. 2020).

Ukázalo sa, že HBV využíva vstupnú cestu sprostredkovanú kaveolínom-1 na iniciáciu produktívnej infekcie v bunkách HepaRG. Ďalšia štúdia uvádzala, že ošetrovanie primárnych hepatocytov Tupaia (PTH) chemickými inhibítormi endocytózy sprostredkovanej kaveolínom, nezhoršila infekciu HBV (Herrscher et al. 2020).

Niekoľko iných štúdií na druhej strane uvádza protichodné výsledky podporujúce použitie klatrínmi sprostredkovanej endocytózy (CME) na vstup HBV do buniek (Herrscher et al. 2020). Toto tvrdenie uviedli okrem iného vo svojom článku aj Hwang a Park (2018), kde tvrdia, že NTCP umožňuje viriónu HBV prechádzať cez plazmatickú membránu práve pomocou klatrínmi sprostredkovanej endocytózy. Skutočne sa ukázalo, že doména preS1 obalových proteínov HBV interaguje s klatrínom a proteínovým adaptérom 2 (AP-2) počas vstupu do imortalizovaných ľudských primárnych hepatocytov. Tento výsledok bol potvrdený významným poklesom infekcie HBV po stlmení klatrínového ťažkého reťazca (CHC) a AP-2 (Herrscher et al. 2020).

Mechanizmy, ktoré sú základom krokov pri vstupe do HBV, boli len nedávno študované priamo v bunkových líniiach hepatómu nadmerne exprimujúcich NTCP, čo predstavuje zaujímavý nástroj na dešifrovanie mechanizmov absorpcie HBV. Štúdia uskutočnená v roku 2018 skúmala absorpciu HBV do buniek HepG2-NTCP a preukázala, že silibinín, liek, o ktorom je známe, že inhibuje klatrínom sprostredkovanú endocytózu, znižoval vstup HBV. Po tomto zistení, nedávna štúdia preukázala účasť AP-2 a adaptorového proteínu EPS15 na infekcii buniek HepG2-NTCP a PHH HBV (Herrscher et al. 2020).

V súlade s výsledkami týchto dvoch štúdií, ďalšia štúdia ukázala, že umlčanie kaveolínu-1 v bunkách HepG2-NTCP neznížilo infekciu HBV, zatiaľ čo umlčanie CHC, dynamínu-2 (DNM2) a AP-2 malo za následok veľmi veľké zníženie úrovne infekcie. Navyše v tejto štúdii analýzou elektrónovej mikroskopie odhalili, že častice HBV boli prítomné vo vezikulách potiahnutých klatrínom v skorom štádiu infekcie. Niekoľko ďalších línii dôkazov podporuje predstavu, že CME je hlavným spôsobom vstupu pre HBV in vivo. Ukázalo sa, že CME skutočne hrá množstvo dôležitých úloh v hepatocytoch, v homeostáze železa, steatóze pečene a vírusových infekciách pečene (Herrscher et al. 2020).

#### **3.7.4. Vírusový únik z endozómov a odbalenie**

U väčšiny vírusov je vstup do bunky sprostredkovaný endocytickou dráhou. Po dosiahnutí neskorých endozómov následný proces odbalenia pomáha pri úniku z endozómov. V opačnom prípade by sa vírusy degradovali v lyzozómoch. Rovnako ako v prípade iných obalených vírusov sa predpokladalo, že HBV uniká z endozómov aj pomocou mechanizmov membránovej fúzie (Liu et al. 2016a).

Po svojej endocytóze pokračujú obalené vírusy endocytovou cestou a nakoniec sa dostanú do cytoplazmy v skorých endozómoch, neskorých endozómoch, alebo lyzozómoch, v závislosti od kompartmentu s vhodnými podnetmi na spustenie a podporenie fúzie. Závislosť na pH je najdôležitejším faktorom pri spúšťaní fúzie u väčšiny obalených vírusov internalizovaných endocytózou. Pre HBV nie je úplne jasné ani presné miesto vírusovej fúzie, ani podnety spúšťajúce fúziu. V proteíne L bolo identifikovaných niekoľko fusogénnych domén: C-koncová polovica oblasti preS2 (fusogénna doména nezávislá od pH z aminokyselinových zvyškov 149 až 160), N-koncová časť S oblasti (fusogénna doména závislá od nízkeho pH zo zvyškov aminokyselín 164 až 186), oblasť preS1 (závislá od nízkeho pH) a N-koncová časť oblasti preS1 (závislá od nízkeho pH z aminokyselinových zvyškov 9 až 24) (Liu et al. 2016a, Herrscher et al. 2020).

Chlorid amónny, ktorý zvyšuje endozomálne pH však nemá žiadny vplyv na infekciu vírusom kačacej hepatitídy B (DHBV). Bafilomycín A1, silný inhibítor vakuolárnych protónových ATPáz, ktorý je zodpovedný za okyslenie a nastavenie gradientu pH v endozóme, inhibuje prenos zo skorých na neskoré endozómy. Ukázalo sa, že ošetrovanie buniek bafilomycínom A1 inhibuje infekcie DHBV a HBV. V inej štúdii viedlo umlčanie malých GTPáz zapojených do prepravy nákladu medzi membránami Rab5 alebo Rab7 k významnému zníženiu infekcie HBV. Rab5 je zodpovedný za transport z plazmatickej membrány do skorých endozómov a Rab7 je zodpovedný za transport do neskorých endozómov a lyzozómov. Tieto objavy podporujú hypotézu, že HBV sa prenáša zo skorých do neskorých endozómov. Navyše nedávna štúdia ukázala, že EGFR sprostredkováva internalizáciu NTCP viazaného HBV prostredníctvom svojej cesty endocytózy / triedenia. Ukázalo sa, že aktivácia EGFR spúšťa transport HBV do neskorých endozómov / lyzozómov. Všetky tieto údaje silne naznačujú, že HBV je ko-transportovaný s EGFR a NTCP do neskorých endozómov (Herrscher et al. 2020).

### **3.7.5 Tvorba cccDNA**

Po endocytóze sa nukleokapsid uvoľní z vírusového obalu a transportuje sa do jadra. Podkladový proces nie je ale úplne jasný. Jedným z možných mechanizmov je však to, že C-koncová doména jadrového proteínu, bohatá na arginín môže poskytovať transportný signál do jadrových pórov (Hwang a Park 2018). Toto potvrdzujú vo svojich článkoch aj He et al. (2016) a Alexopoulou et al. (2020), ktorí udávajú, že nukleokapsid sa odbúrava v komplexe jadrových pórov. rcDNA sa následne uvoľní a preniesie do jadra (Hwang a Park 2018, Herrscher et al. 2020, Alexopoulou et al. 2020, Sai et al. 2016, Bissig et al. 2010, He et al. 2016, Tong a Revill 2016, Megahed et al. 2020).

Po dosiahnutí jadra sa genómová rcDNA HBV prevedie na cccDNA, ktorá slúži ako transkripčný templát pre všetky vírusové RNA, vrátane pregenomickej RNA (pgRNA), a tak je

molekulárnym základom na stanovenie a udržanie vírusovej infekcie (Sai et al. 2016, Bissig et al. 2010, Megahed et al. 2020, Hwang a Park 2018, He et al. 2016, Tong a Revill 2016, D'souza et al. 2020, Hu et al. 2019b).

Konverzia rcDNA na cccDNA si vyžaduje demontáž kapsidy HBV, deproteinizáciu rcDNA a ligáciu rcDNA na cccDNA (Nguyen et al. 2020). Tento proces zahŕňa množstvo etáp, pri ktorých sa vírusová polymeráza kovalentne viaže na 5' koniec záporného reťazca DNA. Krátky RNA oligomér z 5' konca kladného reťazca DNA, ktorý sa používa na prípravu syntézy pozitívneho reťazca DNA sa odstráni, variabilný pozitívny reťazec sa dokončí a nakoniec sa konce dvoch teraz úplných vlákien spoja dohromady. V takejto forme je cccDNA dostatočne stabilná (Alexopoulou et al. 2020).

cccDNA je udržiavaná v jadre hostiteľských hepatocytov ako stabilný epizóm, ktorý vytvára minichromozóm, prostredníctvom asociácie s histónmi a nehistónovými proteínmi (Tong a Revill 2016, Hwang a Park 2018, Alexopoulou et al. 2020). Jeho funkcia je regulovaná aktivitou rôznych nukleárných transkripčných faktorov, ktoré zahŕňajú transkripčné represory, koaktivátory a enzýmy modifikujúce chromatín. Takmer všetky prvky regulujúce vírusovú transkripciu obsiahnuté vo vírusovom genóme majú väzbové miesta pre pečeneňové špecifické transkripčné faktory. Z tohto dôvodu cccDNA využíva bunkové transkripčné mechanizmy na produkciu proteínov a vírusovú morfogénu (Alexopoulou et al. 2020). Je pozoruhodné, že cccDNA je syntetizovaná z rcDNA buď z infikovania viriónov, alebo z nasledujúcich intracelulárnych nukleokapsidov, prostredníctvom dráhy amplifikácie cccDNA, čím poskytuje kritický mechanizmus na perzistenciu vo forme minichromozómu v strede infikovaných buniek (Nguyen et al. 2020).

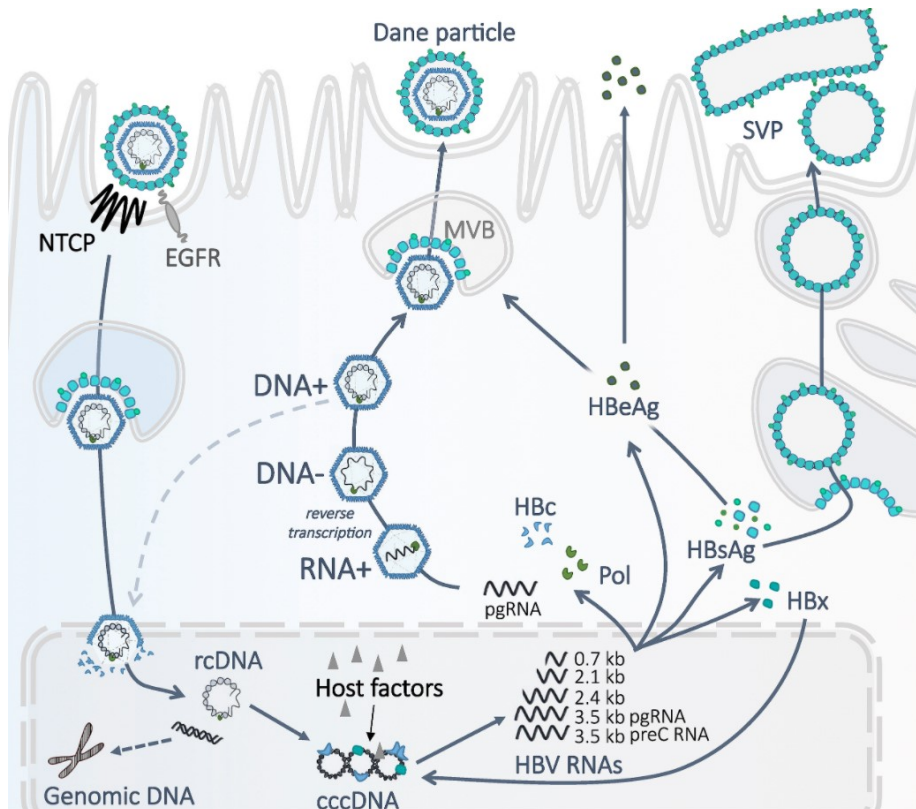
CccDNA je hlavnou príčinou chronickej infekcie HBV (Hwang a Park 2018). Stále však nie je známe to, ako je cccDNA v jadre udržiavaná. cccDNA je vo svojej podstate stabilná, a teda dlhodobo slúži ako templát pre vírusovú replikáciu. Nedávna analýza ukázala, že počas rozpadu cccDNA v bunkách HepG2 nadmerne exprimujúcich NTCP je asi 40 dní. V klinickom prostredí to bude ale pravdepodobne oveľa dlhšie. Odhaduje sa, že to môže byť aj viac ako 9 mesiacov u pacientov s hepatitídou B, pričom imunitné odpovede a stimulácia cytokínmi sú hlavnými faktormi, ktoré ovplyvňujú udržiavanie cccDNA (Tsukuda a Watashi 2020).

### **3.7.6 Prepis a preklad**

cccDNA je intracelulárnym zárodkom na zahájenie životného cyklu vírusu (Tong a Revill 2016). CccDNA slúži ako templát na transkripciu vírusových mRNA hostiteľskou bunkovou RNA polymerázou II (Bissig et al. 2010, Sai et al. 2016, Tong a Revill 2016, He et al. 2016, Hwang a Park 2018, Jiang a Hildt 2020).



Vírusové RNA sa transkribujú, následne sa transkripty exportujú do cytoplazmy a buď sa prekladajú do štruktúrnych, regulačných alebo replikatívnych proteínov (Jiang a Hildt 2020, Balagopal et al. 2020), alebo sa balia do nových viriónov (viď kapitolu 3.7.6) (Balagopal et al. 2020). Vírusové transkripty zahŕňajú pregenomickú RNA (pgRNA) a subgenomické RNA (Jiang a Hildt 2020, He et al. 2016). Exportovaná pgRNA a subgenomické transkripty sú následne preložené na produkciu jadrového proteínu (HBc), povrchových proteínov vírusového obalu (HBs), HBeAg, X proteínu (HBx) a polymerázy (D'souza et al. 2020).



Obr. 8 Schematický prehľad životného cyklu HBV (Prevzaté od: Tsukuda a Watashi 2020)

Konkrétnejšie, existujú štyri rôzne HBV mRNA, ktoré sa líšia svojou dĺžkou. Najdlhšia 3,5 kB mRNA, pregenomická RNA (pgRNA), kóduje polymerázový a jadrový / prejadrový proteín. Druhá 2,4 kB preS mRNA kóduje proteíny LHB a MHB. S mRNA dlhá 2,1 kB kóduje proteín SHB. Ďalšia X mRNA s dĺžkou 0,7 kB kóduje proteín X (Hwang a Park 2018). Skupina krátkych a dlhých vírusových mRNA sa transkribuje hostiteľskou RNA polymerázou II (Balagopal et al. 2020). Táto transkripcia je riadená hlavne štyrmi promótormi (jadro, preS1, preS2 a X) a dvoma zosilňovačmi (EN I a EN II) (He et al. 2016, Hwang a Park 2018).

Prejadrový proteín obsahuje celú sekvenciu jadrového proteínu plus amino-terminálne predĺženie o 29 aminokyselín (sekvenciu „precore“). Prvých 19 aminokyselín prejadrového proteínu predstavuje signálny peptid, ktorý smeruje prejadrový proteín na vylučovanie do endoplazmatického retikula (ER). Tento signálny peptid je odstránený signálnou peptidázou,

ktorá sa nachádza v lúmene ER, za vzniku 22-kDa prekursorového proteínového derivátu p22, ktorý je ďalej štiepený na svojom karboxylovom konci furínovou proteázou v Golgiho aparáte. Vylučovaný prejadrový proteínový derivát je známy ako antigén e (HB<sub>e</sub>Ag) (Megahed et al. 2020).

HBx je regulačný proteín, ktorý prilákal pozornosť veľkého počtu výskumných pracovníkov a je jednoznačne potrebný na vírusovú replikáciu (Tsukuda a Watashi 2020, Hu et al. 2019b). Ukázalo sa, že prispieva k patogenéze ochorenia, vrátane nepriameho prispievania do počiatkových štádií HCC prostredníctvom signálnych transdukčných dráh, ako aj zmenou expresie hostiteľského génu. HBx bol lokalizovaný v jadre, aj v cytoplazme, čo mu umožňuje zohrávať rôzne úlohy v regulácii génovej expresie a signálnej transdukcii. V jadre sa HBx viaže na cccDNA minichromozómy a uplatňuje svoj vplyv epigeneticky. HBx neviaže priamo DNA, ale môže sa viazať na hostiteľské transkripčné faktory, ktoré sa viažu na príbuzné sekvencie promótorov (Hu et al. 2019b). Tsukuda a Watashi (2020) uvádzajú, že HBx sa asociuje s minichromozómom cccDNA úzko paralelne s kinetikou acetylácie H3 viazanej na cccDNA. HBx moduluje nábor enzýmov modifikujúcich chromatín a riadi epigenetický stav histónov asociovaných s cccDNA pre aktívnu transkripciu (Tsukuda a Watashi 2020).

Vzhľadom na svoju ústrednú úlohu v životnom cykle HBV sa okrem ovplyvňovania epigenetickej transkripcie a stimulácie mnohých bunkových transdukčných dráh ukazuje zameranie na HBx ako životaschopná terapeutická stratégia (Hu et al. 2019b).

### **3.7.7 Zabalenie a syntéza vírusovej genómovej DNA**

Jedným z krokov v replikácii HBV je zabalenie pgRNA pomocou reverznej transkriptázy do spontánne sa tvoriacich nukleokapsidov, čo je proces, ktorý sa vyskytuje v cytoplazme (Alexopoulou et al. 2020). Replikácia vírusovej DNA sa začína zhromaždením homomultimérov vírusového jadrového proteínu (HBc) do replikačne kompetentnej, ale stále nezrelej vírusovej kapsidy v cytoplazme, ktorá je zostavená do jadrových častíc obsahujúcich pgRNA a vírusovú polymerázu (reverznú transkriptázu) ako špecifický komplex ribonukleoproteínov (Hu et al. 2019b, Alexopoulou et al. 2020).

HBV sa pri replikácii svojej genómovej DNA prostredníctvom medziproduktov RNA spolieha na proteín P, ktorý je tiež špecializovanou reverznou transkriptázou (RT). Proteín P sa totiž skladá zo štyroch domén: terminálny proteín, ktorý je kovalentne spojený s DNA primerom počas syntézy negatívneho reťazca DNA, priestorová doména (tzv. spacerová), ktorá je tolerantná k mutáciám, doména RT a doména ribonukleázy H (RNáza H) (Tong a Revill 2016, Megahed et al. 2020).

Selektívne zabalenie pgRNA, ale nie kratších transkriptov sa pripisuje sekundárnej štruktúre RNA ( $\epsilon$  signál) na jej 5' konci (Tong a Revill 2016). Zabalenie sa spúšťa naviazaním HBV

polymerázy na štruktúru  $\epsilon$ -kmeňovej slučky 5' terminálnej oblasti pgRNA v cytoplazme. Pretože pgRNA je terminálne nadbytočná, štruktúra kmeňovej slučky je tiež prítomná na 3' konci; polymeráza však tiež rozpoznáva štruktúru 5' čiapočky. Z toho dôvodu môže iba 5'  $\epsilon$ -kmeňová slučka slúžiť ako signál na zabalenie. Po naviazaní polymerázového proteínu sa zhromaždia jadrové proteíny na zostavenie kapsidy, pričom pgRNA a polymeráza sa zabalia (Hwang a Park 2018).

Zabalená pgRNA je templátom pre syntézu negatívnych reťazcov rcDNA reverznou transkripciou pomocou reverznej transkriptázy HBV polymerázy (Alexopoulou et al. 2020, Megahed et al. 2020, Hwang a Park 2018). Konkrétne, N-koncová doména HBV polymerázy má zvyšok tyrozínu (Y63), ktorý funguje ako proteínový primer na polymerizáciu DNA s negatívnym reťazcom (Nguyen et al. 2020, Hwang a Park 2018), resp. slúži ako akceptorové miesto pre prvý nukleotid DNA s negatívnym reťazcom (Tong a Revill 2016).

Po tomto kroku sa väčšina pgRNA templátu odbúrava doménou RNázy H HBV polymerázy (Alexopoulou et al. 2020, Hwang a Park 2018, Hu et al. 2019b), pričom zostane iba malý fragment RNA. Zvyšný RNA fragment sa použije ako primer pre syntézu pozitívneho reťazca DNA, čo vedie k syntéze rcDNA v nukleokapside (Hwang a Park 2018).

### **3.7.8 Zhromaždenie a uvoľnenie**

Novo zabalená rcDNA sa môže dopraviť späť do jadra (recyklácia), aby doplnila bunkovú populáciu cccDNA. V každom infikovanom hepatocyte sa totiž hromadí okolo tridsať molekúl cccDNA (Baudi et al. 2020, Hwang a Park 2018).

V druhom prípade sa môže dopraviť do ER na to, aby získala obal a mohla pokračovať vo vylučovaní infekčných viriónov, ktoré sa následne uvoľňujú z bunky za účelom infikovať ďalšie bunky (D'souza et al. 2020, Tsukuda a Watashi 2020, Nguyen et al. 2020). Nukleokapsid sa presúva do ER, kde sú povrchové proteíny (SHB, MHB a LHB) zabudované do membrány. Nukleokapsidy tak získavajú svoju vonkajšiu obálku obsahujúcu HBsAg a stávajú sa zrelými vírusovými časticami (Hwang a Park 2018, Nguyen et al. 2020, Tsai et al. 2018, Megahed et al. 2020). Obalený HBV (Daneho častica) sa uvoľňuje z bunky sekrečnými cestami a pučaním. Okrem toho sa z bunky vylučujú aj sférické a vláknité subvírusové častice, ktoré neobsahujú vírusový nukleokapsid a zahŕňajú len samotný vírusový obal (Hwang a Park 2018, Baudi et al. 2020), resp. HBsAg sa môže z buniek uvoľňovať aj vo forme prázdnych SVP (Tsai et al. 2018).

### 3.8 Vírus hepatitídy C

Objav HCV spôsobil revolúciu v hepatológii a stal sa nosnou témou v tomto odbore. Dôvodom bolo množstvo faktorov, ktoré sa uplatňujú v prenose, šírení infekcie, v patogenéze a prognóze HCV. Do roku 1989 sa toto ochorenie označovalo ako hepatitída non-A a non-B (Hůlek a Urbánek 2018). Posledné odhady Svetovej zdravotníckej organizácie naznačujú, že približne 71 miliónov jedincov na celom svete je infikovaných HCV, pričom, neexistuje žiadna vakcína, ktorá by tejto infekcii zabránila (Colpitts et al. 2020). HCV spôsobuje chronické aj akútne infekcie (Wahid 2020). V prípade akútnej formy je väčšina pacientov asymptomatických (Wahid 2020, Hůlek a Urbánek 2018, Palumbo 2011). To má za dôsledok, že pacienti sú často diagnostikovaní až v pokročilom štádiu ochorenia (Hůlek a Urbánek 2018). Akútna infekcia progreduje do chronickej hepatitídy C (CHC) v približne 50–84% prípadoch (Wahid 2020, Palumbo 2011). CHC je zodpovedná za približne 300 000 až 400 000 úmrtí ročne v dôsledku dekompenzácie cirhózy, konečného štádia ochorenia pečene a HCC (Wahid 2020, Palumbo 2011, Albecka et. al 2011, Spengler 2018). Tieto komplikácie spojené s CHC sa vyvinú u 15-30 % infikovaných (Wahid 2020), pričom riziko prechodu do chronicity je oveľa väčšie u starších jedincov ako u mladších, ktorí majú väčšiu šancu na spontánne odstránenie vírusu (Palumbo 2011).

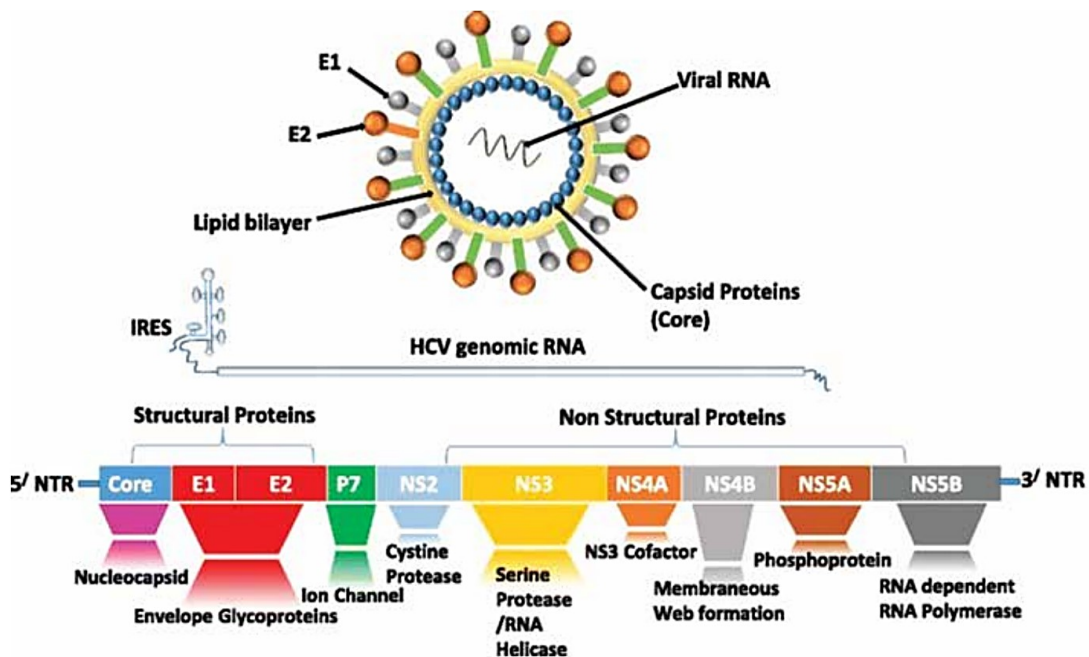
HCV je obalený, jednovláknový RNA vírus pozitívnej polarity, člen rodu Hepacivirus, zaradený do čeľade Flaviviridae (Grassi et al. 2016, Blight a Norgard 2006). Častice HCV majú priemer 50–80 nm (Popescu et al. 2014). Sú tvorené nukleokapsidom obklopeným lipidovou membránou odvodenou od hostiteľa (host-derived membrane) obsahujúcou HCV glykoproteíny E1 a E2 (Popescu et al. 2014, Dai et al. 2020, Colpitts et al. 2020), ktoré poháňajú vírusový vstup (Colpitts et al. 2020). Základný jadrový proteín sa spája s vírusovou RNA a vytvára nukleokapsid (Scheel a Rice 2013, Popescu et al. 2014, Colpitts et al. 2020). Asociácia vírusového jadrového proteínu, ktorý tvorí kapsidu s lipidovými kvapôčkami sa javí ako nevyhnutná podmienka pre počiatočné kroky montáže, ktoré úzko súvisia s replikáciou vírusového genómu (Suzuki 2017).

Bolo preukázané, že v krvi u chronicky infikovaných pacientov cirkulujú častice HCV vo formách spojených s lipoproteínmi (Spengler 2018, Bartosch et al. 2010, Gerresheim et al. 2019, Colpitts et al. 2020). Keďže pre zrelú časticu HCV je charakteristická jej silná asociácia s lipoproteínmi, tak sa z tohto dôvodu častice HCV označujú aj ako tzv. „lipo-viro častice“ (LVP) (Elgner et al. 2018, Popescu et al. 2014, Gerresheim et al. 2019, Colpitts et al. 2020). Charakterizácia častíc produkovaných bunkovou kultúrou naznačuje, že ich lipidové zloženie pripomína lipoproteíny s nízkou hustotou (LDL) a lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (VLDL), pričom cholesterylestery tvoria takmer polovicu celkových lipidov HCV (Dubuisson a Cosset 2014). Presná povaha interakcií medzi zložkami viriónu HCV a lipoproteínmi zostáva ale neurčená (Dubuisson a Cosset 2014).

### 3.8.1 Genóm HCV a jeho produkty

Genóm HCV je jednovláknová RNA s pozitívnou orientáciou t. j. po odpojení sa vírusová RNA môže priamo preložiť do cytoplazmy bunky (Gerresheim et al. 2019). Tento genóm pozostáva z 9,6 kilobázového ORF ohraničeného 5' a 3' neprekladanými oblasťami (UTR). Tieto UTR obsahujú vysoko štruktúrované prvky RNA, ktoré sú rozhodujúce pre transláciu genómu a replikáciu HCV RNA (Dubuisson a Cosset 2014, Gerresheim et al. 2019, Rybecká et al. 2019).

Interným ribozómovým vstupným miestom (IRES) sprostredkovaná translácia otvoreného čítacieho rámca ORF produkuje polyproteín, (Gerresheim et al. 2019, Rybecká et al. 2019) obsahujúci 3010 aminokyselín (Samreen et al. 2012, Hůlek a Urbánek 2018), ktorý sa spracováva hostiteľskými (bunkovými) a vírusovými proteázami na desať vírusových štruktúrnych a neštruktúrnych proteínov (Rybecká et al. 2019, Gerresheim et al. 2019, Spengler 2018).



Obr. 9 Štruktúra častice a genómu HCV (Prevzaté od: Rybecká et al. 2019)

Ide konkrétne o tri vírusové štruktúrne proteíny (E1, E2 a jadrový proteín) a sedem neštruktúrnych proteínov (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) (Bartosch et al. 2010, Burlone. et al. 2009, Scheel a Rice 2013). Vírusové štruktúrne proteíny tvoria HCV virióny (Kunden et al. 2020). Proteíny E1 a E2 tvoria charakteristické výrastky na povrchu viriónu HCV a majú za úlohu sprostredkovať väzbu na membránu bunky a splynutie vírusu s membránou v prvých fázach reprodukčného cyklu vírusu (Hůlek a Urbánek 2018).

Neštruktúrne NS3 až NS5B sprostredkujú replikáciu genómu (Bartosch et al. 2010). NS2 a p7 zohrávajú kľúčovú úlohu počas viriónovej zostavy, ktorá zahŕňa vzájomné interakcie proteínov a bielkovín, ako aj iných vírusových proteínov (Shaw et al. 2020). Sú teda potrebné

na zhromažďovanie vírusových častíc a uvoľňovanie infekčných viriónov, ale nie sú rozhodujúce pre replikáciu RNA (Kunden et al. 2020).

IRES, ktoré sa nachádza v 5' nekódujúcej oblasti (Niepmann et al. 2020, Samreen et al. 2012) hrá dôležitú úlohu pri väzbe eukaryotických ribozomálnych podjednotiek a začína zhromažďovanie translačne aktívneho komplexu 80S. Je známe, že táto sekvencia je konzervatívnejšia ako ktorákoľvek iná časť vírusového genómu. IRES sa považuje za ideálny cieľ pre anti-HCV sprostredkovanú liečbu RNAi, pričom niekoľko skupín experimentovalo s účinnou inhibíciou replikácie HCV navrhovaním siRNA smerom k tejto oblasti (viď kapitolu 4.3.4) (Samreen et al. 2012).

p7 je malý hydrofóbny vírusový proteín (Douam et al. 2016), ktorý je schopný oligomerizácie (tvorby hexamérov a/alebo heptamérov) v membránach na vytvorenie komplexu iónových kanálov s odlišnou, ale rovnako dôležitou úlohou počas sekrécie viriónu. Zahŕňa to zvýšenie pH sekrečnej vezikuly, ktoré je potrebné na ochranu acido-labilných intracelulárnych viriónov (Shaw et al. 2020).

Gén C patrí medzi geneticky najstabilnejšie oblasti štruktúrálnej časti genómu, aminoterminálna 5' časť genómu E2 (HVR1) je naopak najvariabilnejšia (Hůlek a Urbánek 2018).

V poslednej dobe sa zistilo, že dve izoformy jadrového proteínu známe aj ako „mini-jadro“ sa prekládajú z alternatívneho otvoreného čítacieho rámca na aminokyseliny 70 a 91, ktoré si zachovávajú C-koncovú časť zrelého nukleokapsidu p21, ale chýba im N-koniec. Funkcia týchto mini-jadrových proteínov musí byť ešte objasnená, avšak mutácie v aminokyselinových pozíciách 70 a 91 sú spojené so zvýšeným rizikom HCC, inzulínovou rezistenciou a zlyhaním liečby interferónom (D'souza et al. 2020).

### **3.8.2 Genetická variabilita vírusu**

Pre HCV je charakteristická extrémna genetická variabilita. Podľa úrovne genetickej zhody môžeme HCV kategorizovať do genotypov, subtypov a kvázidruhov (Hůlek a Urbánek 2018). HCV predstavuje veľmi heterogénnu skupinu vírusov, ktorá je rozdelená do siedmych alebo až ôsmich genotypov a viacerých podtypov, ktoré sa líšia vo viac ako 30% na úrovni nukleotidov (Lohmann 2019). Konkrétne, genotypy sa líšia vzájomne v 30-33 %, subtypy jedného genotypu sa líšia v 20-25 % a kvázi druhy jedného subtypu sa líšia v menej ako 10 % sekvenciách nukleotidov (Hůlek a Urbánek 2018).

Genetickú variabilitu vírusu, teda variabilitu jeho presnej nukleotidovej sekvencie jednotlivých genómov v rámci hostiteľa, predstavujú kvázidruhy. Táto genetická variabilita na úrovni kvázidruhov je podkladom pre vznik vírusových variant rezistentných na určité virostatikum. Všetky kvázidruhy si zachovávajú príslušnosť k jednému subtypu a jednému genómu HCV. Z hľadiska protivírusovej terapie je teda variabilita HCV veľmi dôležitá. Pri

priamo pôsobiacich antivirotikách (DAA) je voľba liečebnej kombinácie závislá od znalosti genotypu HCV (Hůlek a Urbánek 2018).

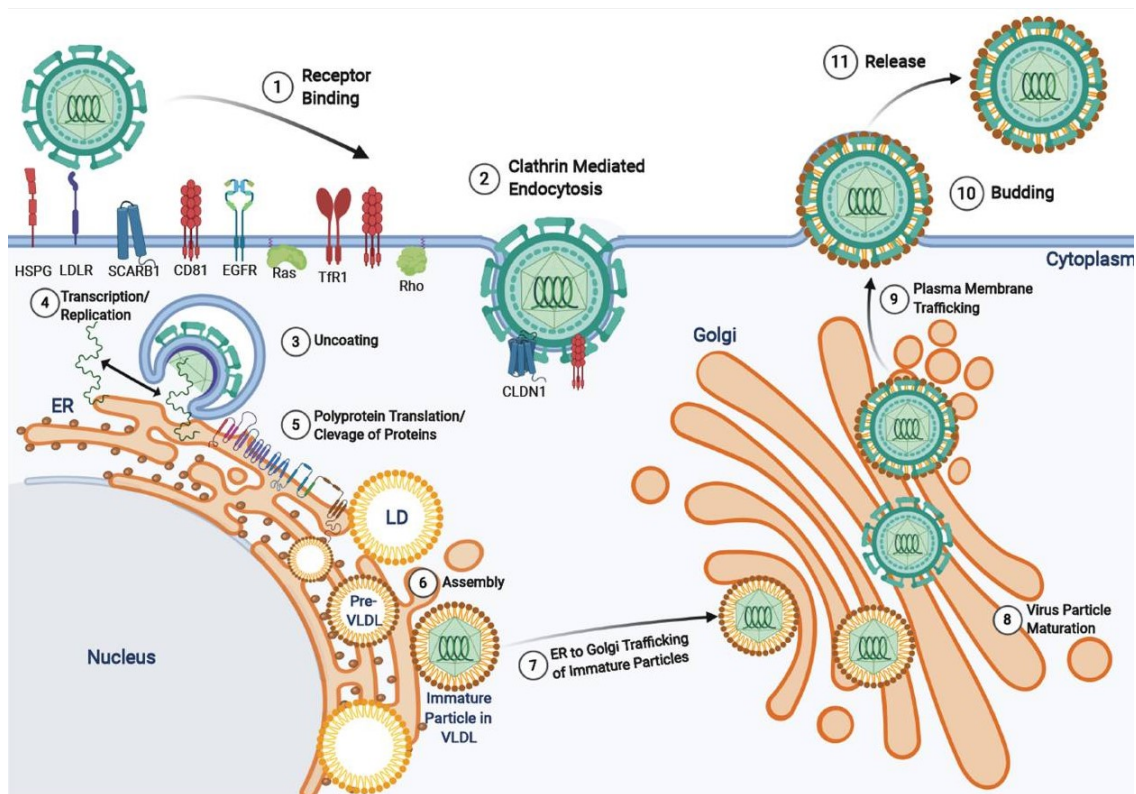
Vysoká genetická variabilita mala niekoľko priamych dôsledkov na objav a vývoj liekov. Je totiž veľmi náročné získať jednotlivé lieky pokrývajúce všetky genotypy s porovnateľnou účinnosťou a tiež modely bunkových kultúr, alebo bielkovinové modely potrebné na čo najbližšie pokrytie genetickej variability, aby sa získali široko pôsobiace lieky. Za ďalšie, jediný liek by s najväčšou pravdepodobnosťou nebol dostatočný na vyliečenie infekcií HCV, kvôli riziku selekcie mutácií poskytujúcich rezistenciu (Lohmann 2019). Vírusová heterogenita, ktorá je obzvlášť vysoká v obalových proteínoch navyše predstavuje hlavnú prekážku pre vývoj vakcíny a čiastočne vysvetľuje aj to, prečo ešte stále nie je k dispozícii (Lohmann 2019, Albecka et al. 2011).

### **3.8.3 Pripojenie HCV**

Samotný vstup HCV do buniek je komplexný viackrokový proces (Harris et al. 2008, Alberione et al. 2020, Rybecká et al. 2019), pričom je dôležité podotknúť, že HCV môže infikovať hepatocyty dvoma odlišnými cestami, a to vstupom vírusu bez buniek alebo prenosom z bunky na bunku (Colpitts et al. 2020).

Hlavným rezervoárom replikácie obaleného vírusu hepatitídy C s pozitívnou polaritou sú hepatocyty (Harris et al. 2008, Fénéant et al. 2015). Na zahájenie svojho životného cyklu sa vírus musí naviazať na hostiteľskú bunku a prekonať plazmatickú membránu, aby získal prístup k vnútornému obsahu bunky. Pripojenie je sprostredkované väzbou proteínu prítomného na povrchu viriónu, na molekulu na povrchu bunky, ktorá funguje ako vírusový receptor (Cocquerel et al. 2006). V Disseho priestore v pečňových sínusoidoch prichádzajú viriónové častice LVP do priameho kontaktu s bazolaterálnym povrchom hepatocytov (Dubuisson a Cosset 2014, Gerresheim et al. 2019, Fofana et al. 2014, Douam et al. 2015), čo im umožňuje interagovať s väzbovými faktormi pripojenia a receptormi na povrchu týchto buniek (Douam et al. 2015, Dubuisson a Cosset 2014, Gerresheim et al. 2019).

Na bazolaterálnom povrchu hepatocytov sa vírus najskôr viaže na niekoľko receptorov s nízkou afinitou, čo mu umožňuje koncentrovať sa na povrchu hostiteľskej bunky a následne dochádza k jeho interakcii s inými základnými vstupnými faktormi (Qian et al. 2016). HCV je schopný interagovať s niekoľkými vstupnými faktormi (Harris et al. 2008, Alberione et al. 2020, Rybecká et al. 2019, Grove a Marsh 2011). Herrscher et al. 2020 udávajú, že vírus hepatitídy C interaguje najmenej so 14 faktormi hostiteľskej bunky, aby sa zabezpečila účinná bunková infekcia.



Obr. 10 Životný cyklus HCV (Prevzaté od: D'souza et al. 2020)

### 3.8.3.1 Faktory pripojenia a vstupu vírusu

Interakcia HCV s hepatocytmi, ktorá vedie ku vstupu vírusu, závisí do značnej miery od interakcie hostiteľských lipoproteínových zložiek a vírusových obalových glykoproteínov s hostiteľskými faktormi exprimovanými na povrchu hepatocytov (Colpitts et al. 2020).

V posledných dvoch desaťročiach sa pomocou rôznych prístupov identifikovalo množstvo hostiteľských faktorov, podieľajúcich sa na procesoch vedúcich od pripojenia vírusu k hepatocytu, cez receptorom sprostredkovanú endocytózu až po endozomálnu fúziu. Klaster diferenciácie 81 (CD81), scavengerový receptor triedy B typu I (SR-BI), klaudín-1 (CLDN1) a okluzín (OCN) sú štyri hlavné hostiteľské faktory, sprostredkujúce vstup HCV. Expresia jedného alebo viacerých z týchto hostiteľských faktorov môže skutočne viesť k náchylnosti buniek na infekciu HCV. Okrem týchto štyroch základných vstupných faktorov zohrávajú úlohu aj ďalšie hostiteľské faktory pri pripájaní k HCV (pripájacie / väzobné faktory) a internalizácii / fúzii (kofaktory) (Colpitts et al. 2020).

Počiatkové pripojenie LVP na bazolaterálnu membránu hepatocytov pravdepodobne zahŕňa lipoproteínové zložky spojené s vírusom (najmä apoE) a glykoproteíny vírusového obalu, ktoré interagujú s HSPG (ide najmä o syndekan 1 a 4) a LDL receptorom (LDLR) na povrchu bunky (Colpitts et al. 2020, Qian et al. 2016). Po tomto pripojení vírus interaguje s koreceptormi SRBI, CD81, CLDN1 a OCLN (Dai et al. 2020, Douam et al. 2015). Na zaistenie permisivity pre vstup



HCV je totiž nevyhnutná koexpresia týchto štyroch proteínov (Grove a Marsh 2011). Je zaujímavé, že okrem svojej úlohy vo väzbe na vírusy sa ukázalo, že tieto hostiteľské faktory prispievajú aj k neskorším krokom životného cyklu vírusu po väzbe, ako sú kroky internalizácie alebo replikácie (Colpitts et al. 2020).

Okrem toho môže byť vstup HCV modulovaný receptorovými tyrozínkinázami (receptor epidermálneho rastového faktora-EGFR a efrínový receptor typu A2-EphA2), pravdepodobne mechanizmami, ktoré ovplyvňujú interakciu CD81 s CLDN1 (Grove a Marsh 2011, Scheel a Rice 2013). Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), absorpčný receptor cholesterolu, bol tiež identifikovaný ako vstupný faktor HCV, ktorý pravdepodobne prispieva ku vstupu HCV, prostredníctvom svojich rolí ako cholesterolový receptor (Colpitts et al. 2020). Scheel a Rice (2013) udávajú, že je dosť pravdepodobné, že cholesterol spojený s viriónom je zapojený v neskorom štádiu vstupu HCV pri fúzii, alebo pred ňou práve prostredníctvom interakcie s NPC1L1 (Scheel a Rice 2013). Navyše sa ukázalo, že tento bunkový NPC1L1 receptor ako vstupný faktor HCV je dobrým cieľom pre terapeutickú intervenciu. Špecificky je expresia NPC1L1 potrebná pre infekciu HCV, pretože tlmenie alebo blokovanie NPC1L1 sprostredkované protilátkami zhoršuje začatie infekcie HCV v HCVcc bunkovej kultúre (Samreen et al. 2012). Abl tyrozínkináza bola nedávno identifikovaná ako hostiteľský faktor pre vstup HCV, pôsobiaci počas endocytózy sprostredkovanej klatrínom (Colpitts et al. 2020). Podobne aj transferínový receptor 1 (TfR1) hrá úlohu pri absorpcii častíc HCV, aj keď mechanizmy a význam sú stále nedostatočne pochopené (Colpitts et al. 2020).

HCV sa spájajú s hostiteľskými lipoproteínmi, ktoré sa viažu na SR-B1 a/alebo na LDLR, pričom SR-B1 môže uľahčiť obojsmerný transport cholesterolu z lipoproteínov, čo zvyšuje možnosť, že lipoproteíny môžu lokálne modifikovať lipidové prostredie membrány hostiteľskej bunky (Grove a Marsh 2011). Asociácia CD81 s proteínom CLDN1 tesným spojením vedie k internalizácii HCV (Colpitts et al. 2020). CD81 a CLDN1 prirodzene tvoria komplex pod reguláciou EGFR a GTPázy H-Ras; HCV interaguje s komplexom CD81 / CLDN1, po ktorom nasledujú interakcie s OCLN, čo nakoniec vedie k jeho internalizácii prostredníctvom endocytózy sprostredkovanej klatrínom (Banse et al. 2018).

Nové in vitro systémy, ktoré napodobňujú polarizovanú povahu pečňových buniek pomáhajú skúmať migráciu komplexov HCV-receptor do tesných spojov, kde sa tieto vstupné faktory bežne nachádzajú. CLDN6 a CLDN9 môžu nahradiť CLDN1 pri vstupe do HCV, ale v pečeni sú exprimované iba v nízkych hladinách (Scheel a Rice 2013).

CLDN1 je členom rodiny integrálnych membránových proteínov, ktorý sa podieľa na tvorbe tesného spojenia (TJ). Štúdie ale nepreukázali priamu interakciu medzi HCV glykoproteínmi a CLDN1, čo môže odrážať požiadavku, aby vírus viazal svoje receptory v definovanej sekvencii

alebo nízku citlivosť súčasných bunkových metód (Harris et al. 2008). CLDN1 sa skladá zo štyroch transmembránových domén s dvoma extracelulárnymi slučkami (EL1 a EL2) (Colpitts et al. 2020). Štúdie mutagenézy a blokovania protilátok s označenými verziami CLDN1 naznačujú, že prvá extracelulárna slučka je nevyhnutná v neskorom štádiu procesu vstupu do HCV (Harris et al. 2008). Colpitts et al. (2020) taktiež tvrdia, že zvyšky v malom vysoko konzervovanom EL1 CLDN1 sú kľúčové pre vstup vírusu a genetické dôkazy naznačujú priamu interakciu medzi HCV E1 glykoproteínom a CLDN1. Ďalej tiež uvádzajú, že komplexy E1-E2 môžu interagovať s CLDN1 EL1, zatiaľ čo rozpustný E2 nie (Colpitts et al. 2020).

Presná úloha / úlohy, ktorú zohrávajú HCV receptory alebo koreceptory v procese vstupu vírusu je nejasná. CLDN sú kritickými zložkami TJ, ktoré regulujú paracelulárnu permeabilitu endotelových a epiteliálnych buniek a stanovujú bunkovú polaritu. CLDN polymerizácia je rozhodujúca pre ustanovenie membránových vlákien, ktoré tvoria TJ; avšak molekulárna štruktúra a organizácia TJ sú nejasné (Harris et al. 2008).

Pre vstup HCV je rozhodujúca navyše aj lokalizácia CLDN1 na povrchu bunky, aby sa uľahčil kontakt s CD81, pričom v procese vstupu do HCV je dôležitých niekoľko faktorov, ktoré ovplyvňujú lokalizáciu CLDN1. Lokalizácia CLDN1 na bunkovom povrchu (regulovaná vezikulárnymi transportnými proteínmi, ako je Sec24C) je spojená so zvýšeným vstupom HCV (Colpitts et al. 2020).

CLDN proteíny sa asociujú v plazmatickej membráne jednej bunky a medzi bunkami prostredníctvom interakcií medzi ich extracelulárnymi slučkami. CLDN1 sa detegoval aj v bazolaterálnej doméne hepatocytov. CLDN1 kolokalizovaný s CD81 v apikálnych a bazolaterálnych doménach a s SR-BI v bazolaterálnych miestach, podporuje model, kde sa receptorové komplexy exprimujú v mieste vstupu HCV do parenchýmu prostredníctvom sínusoidnej krvi (Harris et al. 2008).

Je zaujímavé, že iné kladiny sa javia ako schopné sprostredkovať vstup HCV spôsobom závislým od genotypu. CLDN6 a CLDN9 sú funkčné ako vstupné faktory HCV pre niektoré genotypy a CLDN12 sa nedávno podieľal taktiež na vstupe HCV (Colpitts et al. 2020).

Druhovú rozdiely v CD81 a OCLN napríklad obmedzujú tropizmus hostiteľa (Scheel a Rice 2013). CD81 je *in vivo* prítomný vo väčšine tkanív, SR-BI v steroidogénnej tkanive, makrofágoch a pečeni. CLDN1 je prítomný v mnohých tkanivách, ale vo vysokých hladinách je v pečeni. Pretože tieto molekuly nie sú jedinečne exprimované v pečeni, tak ich organizácia alebo stechiometria v hepatocytoch môžu vysvetľovať aktivitu vírusových receptorov. Je nutné poznamenať, že na to, aby sme pochopili ako tieto molekuly koordinujú vstup HCV je dôležité študovať ich asociáciu v primárnom pečenej tkanive a v modelových bunkách hepatómu,

v ktorých je možné modulovať expresiu a hodnotiť vplyv (účinky) na vstup vírusu (Harris et al. 2008).

CD81 sa podieľa na úžasnom množstve bunkových procesov, ako je adhézia, morfológia, aktivácia, proliferácia a diferenciácia imunitných buniek. Okrem toho sa CD81 podieľa aj na infekcii mnohými patogénmi, medzi ktorými je aj HCV, striktne závislý od CD81 na iniciáciu vstupu do svojich cieľových buniek. CD81 bol identifikovaný ako prvý a je najlepšie charakterizovaným vstupným faktorom pre HCV (Fénéant et al. 2014). CD81 je zložený z jednej veľkej extracelulárnej slučky, jednej malej extracelulárnej slučky, štyroch transmembránových domén, jednej intracelulárnej slučky a z dvoch intracelulárnych koncov. Veľká extracelulárna slučka interaguje s E2 glykoproteínom HCV. Regióny mimo veľkej extracelulárnej slučky majú rozhodujúcu úlohu v krokoch po väzbe a určujú citlivosť hepatocytov na HCV (Alberione et al. 2020).

Experimenty preukazujú, že expresia CD81 v CD81-negatívnej HepG2 pečenej bunkovej línii prepožičiava vírusovú infekčnosť a podporuje dôležitú úlohu CD81 v procese vstupu vírusu. CD81 pravdepodobne neposkytuje schopnosť vírusu sa viazať, ale pôsobí ako koreceptor počas procesu internalizácie (Harris et al. 2008, Fénéant et al. 2014).

Hoci sa vo veľkej miere preukázalo, že CD81 zohráva kľúčovú úlohu v procese vstupu HCV, preukázalo sa tiež, že tento tetraspanín sa pravdepodobne podieľa aj na replikácii HCV a imunitnej odpovedi na infekciu HCV (Fénéant et al. 2014). Z dôvodu, že CD81 môže zohrávať dôležitú úlohu aj pri HCV RNA replikácii, šírení a reakcii hostiteľa z neho robí potenciálny terapeutický cieľ. O tom svedčí aj použitie protilátok proti CD81 in vivo. Nakoľko je CD81 zapojený do veľkého počtu bunkových odpovedí, tak použitie takejto terapeuticko-vej stratégie u ľudí by mohlo viesť k vedľajším účinkom. Keďže sa CD81 spája s CLDN1 a tvorí komplexy nevyhnutné pre vstup vírusu, tak by bolo sľubnou terapeutickou stratégiou, vyvinúť nástroje, ktoré sa špecificky zameriavajú na tieto komplexy, alebo sa zameriavajú na molekuly zapojené do ich regulácie (Fénéant et al. 2014).

Navyše je zaujímavé, že HCV infikuje nie len hepatocyty, ale aj B bunky, T bunky a monocyty, prostredníctvom CD81 a niekoľkých receptorových kandidátov, čo naznačuje, že tieto typy buniek sú potenciálnymi cieľmi infekcie HCV. Replikácia vírusu hepatitídy C v mononukleárných bunkách periférnej krvi (najmä v B- bunkách), tak môže zhoršiť imunitné funkcie a vytvoriť pretrvávajúcu infekciu v organizme (Samreen et al. 2012). Tiež sa uvádza, že CD5 zohráva dôležitú úlohu pri vstupe HCV do ľudských T buniek. T-bunková citlivosť na HCV potrebuje CD5, teda glykoproteín špecifický pre lymfocyty. Inhibícia T-bunkového CD5 s protilátkami alebo tlmenie pomocou špecifickej siRNA znížila náchylnosť buniek na HCV, zatiaľ čo zvýšenie expresie CD5 mitogénovou stimuláciou malo opačný účinok (Samreen et al. 2012).

SR-BI, tiež nazývaný CLA-1 je členom skupiny scavengerových receptorov a je hlavným receptorom pre lipoproteíny s vysokou hustotou. Tento lipoproteínový receptor, sprostredkuje selektívne vychytávanie cholesterylesteru z lipoproteínov obsahujúcich apoA a najmä lipoproteínov s vysokou hustotou (HDL), prostredníctvom dvojkrokového mechanizmu. Tento mechanizmus zahŕňa väzbu lipoproteínov na jeho extracelulárnu doménu, po ktorej nasleduje absorpcia lipidov. SR-BI bol identifikovaný ako koreceptor pre vstup buniek HCV vo väzbových skúškach s rozpustnou formou glykoproteínu E2 (Bartosch et al. 2010, Harris et al. 2008).

Prenos lipidov SR-BI môže uľahčiť expozíciu väzbových miest na HCV E2, čo umožňuje prenos vírusovej častice na CD81, ktorá má kľúčovú úlohu v nasledujúcich vstupných krokoch. Samotná SR-BI má tiež úlohu v postväzbových vstupných krokoch. Ukázalo sa, že úroveň expresie SR-BI definujú mieru internalizácie vírusu, čo zároveň dokazuje kľúčovú úlohu SR-BI pri internalizácii HCV (Colpitts et al. 2020).

Bolo preukázané, že protilátky špecifické pre SR-BI inhibujú infekciu HCV a nadmerná tvorba SR-BI podporuje vírusovú infekciu. Pokusy overiť podstatnú úlohu SR-BI pri vstupe do HCV sa ukázali ako náročné. Všetky doteraz študované typy buniek exprimujú SR-BI a RNA interferencia má rôzne účinky na infekčnosť HCVpp (Harris et al. 2008).

OCLN je ďalší úzko spojovací proteín, ktorý uľahčuje príjem HCV v kroku po väzbe, hoci mechanizmy zostávajú nie úplne jasné. Rovnako ako CLDN1, tak aj OCLN má štyri transmembránové domény s dvoma veľkými extracelulárnymi slučkami (EL1 a EL2). Ukázalo sa, že OCLN EL2 je nevyhnutný pri sprostredkovaní vstupu HCV, prípadne prostredníctvom jeho interakcií s GTPázou dynamin II podporujúcim endocytózu. Zatiaľ sa nezdá, že by OCLN interagoval priamo s časticami HCV, avšak koná v podobnom kroku ako CLDN1, aby umožnil vstup HCV. Viaceré línie dôkazov naznačujú, že OCLN je rozhodujúci pre neskorý vstupný krok po väzbe (Colpitts et al. 2020).

Glykozaminoglykány (GAG) ako už bolo spomenuté, tak sú prítomné na povrchu buniek a javia sa ako počiatočné útočisko pre pripojenie HCV. Niekoľko autorov použilo rôzne modelové systémy ako sE2, HCVpp, HCVcc a vírusy izolované z plazmy, kde preukázali, že heparín a heparináza (enzým schopný degradovať heparínsulfáty na povrchu bunky) inhibujú pripojenie HCV k cieľovým bunkám. Iné GAG ale nevykazovali žiadnu inhibičnú aktivitu. Je známe, že intracelulárne formy sE2 majú silnú afinitu k heparínu a predpokladá sa, že HVR1 je nevyhnutnou oblasťou pre túto konkrétnu interakciu. GAG ale aj LDL receptor môžu uľahčiť počiatočné pripojenie k hostiteľskej bunke. Táto interakcia môže byť sprostredkovaná lipoproteínmi spojenými s HCV viriónmi. Nemožno však vylúčiť priamy kontakt medzi proteínmi obalu HCV a týmito bunkovými proteínmi (Samreen et al. 2012).

Navrhujú sa tiež alternatívne vstupné cesty. Napríklad sa uvádza, že receptor VLDL (VLDLR), ktorý sprostredkúva absorpciu lipoproteínov do hepatocytov, môže umožniť vstup HCV do hepatocytov *in vivo*, spôsobom nezávislým od CD81. Pretože bunkové línie hepatómu použité na štúdium vstupu HCV neexprimujú VLDLR za klasických kultivačných podmienok, tak úloha tohto hostiteľského faktora ešte nebola *in vitro* široko študovaná (Colpitts et al. 2020).

### 3.8.4 Endocytóza HCV

Interakcie so vstupnými faktormi podporujú internalizáciu HCV prostredníctvom klatrínom sprostredkovanej a na dynamické závislej endocytózy (Rybecká et al. 2019, Alberione et al. 2020, Colpitts et al. 2020). Úlohu však môžu zohrávať aj alternatívne endocytotické dráhy (Colpitts et al. 2020). Herrscher et al. (2020) udávajú, že klatrínom sprostredkovaná endocytóza závisí od veľkej skupiny bunkových proteínov, vrátane adaptorového proteínu AP-2, doplnkových proteínov ako je EPS15 a klatrínu. Podľa Dai et al. (2020) faktory ako EGFR, efrínový receptor A2 (EphA2), transferínový receptor 1 (TfR1) a transportér cholesterolu Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1), kolaboratívne dokončujú endocytózu. HCV vyžaduje pre produktívnu infekciu okrem endocytózy sprostredkovanej klatrínom aj nízke endozomálne pH (Grove a Marsh 2011). V poslednom kroku sa totiž proces fúzie spúšťa spôsobom nezávislým od receptora, ale závisí od pH a od lipidového zloženia membrány cieľovej bunky (Dai et al. 2020). Dodanie vírusu do skorých endozómov pozitívnych na Rab5, by mala toto kyslé prostredie potrebné na vyvolanie fúzie poskytnúť (Catanese a Dorner 2015).

Endocytotické vezikuly dozrievajú na kyslé endozómy, čo podporuje fúziu HCV s nízkym pH. Nízke endozomálne pH je rozhodujúce pre zabezpečenie konformačného preskupenia glykoproteínov a vystavenie fúzneho peptidu. Predpokladá sa však, že interakcie vírusových glykoproteínov s CD81 inštruujú vírusové častice na fúziu, indukovaním konformačných preusporiadaní v HCV E1 a E2 (Colpitts et al. 2020).

Glykoproteíny HCV E1 a E2 tvoria nekovalentný heterodimér, ktorý sprostredkúva fúziu. Boli identifikované tri oblasti na glykoproteínoch E1 a E2, ktoré hrajú úlohu v procese membránovej fúzie, ale mechanizmus fúzie HCV zostáva nejasný. Aj keď sa očakávalo, že HCV bude mať fúzny proteín triedy II ako iné Flaviviridae, tak sa fúzny aparát HCV nepodobá žiadnemu inému známemu fúznemu proteínu. To naznačuje, že fúzia HCV je jedinečný proces v porovnaní s inými fúznymi mechanizmami. Vzhľadom na rozdiely so známymi fúznymi proteínmi sa navrhuje, že hoci E2 môže sprostredkovať vstup HCV prostredníctvom interakcií s bunkovými faktormi, tak fúznym proteínom pre HCV je E1. E1 totiž vytvára triméry, čo je typická vlastnosť pre fúzne proteíny, avšak tvorba triméru E1 bola závislá od spoločnej expresie E2 (Colpitts et al. 2020).

### 3.8.5 Replikačný cyklus HCV

Replikačný cyklus vírusov s pozitívnym reťazcom RNA je výhradne cytoplazmatický a syntéza RNA zahŕňa replikačný medziprodukt negatívneho reťazca RNA. Chýba mu však akákoľvek stabilná forma DNA na rozdiel od retrovírusov (integrovaná provírusová DNA) alebo vírusu hepatitídy B (cccDNA), čo predstavuje hlavnú prekážku pri liečbe týchto patogénov. Pozitívne reťazové RNA vírusy zvyčajne spôsobujú skôr akútne ako perzistentné infekcie, pretože sa musia neustále replikovať, aby sa udržali v infikovanom hostiteľovi, pričom neustále vytvárajú antigény, čo je „ľahký“ cieľ adaptívnej imunity. HCV je ale výnimkou, nakoľko spôsobuje pretrvávajúce infekcie u 70% infikovaných osôb (Lohmann 2019).

Intracelulárna replikačná fáza životného cyklu HCV poskytla množstvo antivírusových cieľov, vrátane kľúčových vírusových enzýmov, potrebných na produkciu proteínov a amplifikáciu RNA. Genóm HCV je vysoko štruktúrovaný s esenciálnymi prvkami RNA v 5' a 3' UTR, ako aj v kódujúcej oblasti. Translácia spojená s endoplazmatickým retikulom je iniciovaná IRES umiestneným v HCV 5' UTR (Scheel a Rice 2013).

Po fúzii vírusového obalu s endozómom sa uvoľní vírusová kapsida do cytoplazmy, kde sa genóm vírusovej RNA na membránach endoplazmatického retikula okamžite translatuje za vzniku HCV polyproteínu (Catanese a Dorner 2015, Spengler 2018). Polyproteín je následne proteolyticky spracovaný na 10 vírusových štruktúrálnych a neštruktúrálnych proteínov (viď kapitolu 3.8.1), pričom vírusové neštruktúralne proteíny (NS3-NS5) sú potrebné na replikáciu vírusového genómu, generovaním medziproduktu záporného reťazca (Spengler 2018).

Pre vlastnú replikáciu vírusovej RNA je kľúčovým enzýmom produkt oblasti NS5B, ktorý má aktivitu RNA dependentnej RNA-polymerázy (RdRp). Vďaka svojej hlavnej úlohe v syntéze vírusovej RNA bola NS5B polymeráza hlavným cieľom pre antivírusovú terapiu (Scheel a Rice 2013, Lohmann 2019, Rybecká et al. 2019, Hůlek a Urbánek 2018).

Tu je dôležité vyzdvihnúť fakt, že práve identifikácia neštruktúrálnych proteínov (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A a NS5B), spolu s lepším porozumením ich úloh v životnom cykle vírusu bola kľúčovým prielomom pre vývoj DAA (viď kapitolu 4.4.1). Tieto znalosti umožnili nájsť látky, ktoré blokujú kritické kroky v replikačnom cykle HCV (Spengler 2018).

K replikácii HCV RNA dochádza v membránach ER (ako už bolo spomenuté vyššie), konkrétne v „membránovej sieti“ (MW) (Catanese a Dorner 2015, Gerresheim et al. 2019, Douam et al. 2016, Niepmann et al. 2020). MW je komplexná sieť zmenených membránových štruktúr odvodených od endoplazmatického retikula (ER), pričom je známe, že takéto štruktúry sú dôležité pre replikáciu RNA. Niekoľko dôkazov naznačuje, že dvojité membránové vezikuly (DMV), ktoré predstavujú hlavné zložky MW, môžu predstavovať miesta replikácie vírusovej RNA v infikovaných bunkách (Douam et al. 2016). Gerresheim et al. (2019) uvádzajú, že práve v MW sa vytvárajú nové vírusové častice v úzkom spojení s metabolizmom lipidových kvapiek (LD)

a VLDL. Po zhromaždení viriónov sú nové virióny zabudované do lipidov hostiteľa, transportované do bunkovej membrány a uvoľnené do krvi (Spengler 2018).

### miR-122

Obalený vírus HCV sa replikuje primárne, ak nie výlučne v hepatocytoch, pričom sa zistilo, že jeho replikácia závisí od pečeno špecifickej mikroRNA-122 (miR-122) (Bukh 2016). HCV infikuje primárne hepatocyty, nie len v dôsledku exprese základných vstupných receptorov, ale aj vďaka pečeno špecifickým bunkovým hostiteľským faktorom, potrebných na vírusovú replikáciu, ako je práve miRNA-122 (Fénéant et al. 2015, D'souza et al. 2020). miR-122, ktorá je exprimovaná takmer výlučne v pečeni, predstavuje asi 70% všetkých miRNA v hepatocytoch, zatiaľ čo v iných tkanivách nie je takmer vôbec exprimovaný (Gerresheim et al. 2019, Niepmann et al. 2020). D'souza et al. (2020) ale uviedli, že boli pozorované aj extrahepatálne prejavy. Napríklad v mononukleárných bunkách periférnej krvi, epiteliálnych bunkách, obličkách a v periférnom nervovom systéme.

V genóme HCV (v závislosti od genotypu) existuje päť alebo šesť väzbových miest pre miR-122. Dve lokality sa nachádzajú na samom konci v 5' UTR, jedna v 3' UTR a dve až tri v kódujúcej oblasti NS5B (Niepmann et al. 2020, Gerresheim et al. 2019).

Vo všeobecnosti miRNA negatívne regulujú preklad cieľovej mRNA prostredníctvom interakcie s 3' UTR sekvenciou špecifickým spôsobom. Týmto spôsobom miR-122 reguluje expresiu génov zapojených do udržiavania homeostázy pečene, vrátane metabolizmu lipidov, metabolizmu železa a karcinogenézy (Ono et al. 2020). Na rozdiel od negatívneho vplyvu mikroRNA na bunkové mRNA, HCV využíva miR-122 na podporu vlastnej replikácie (Niepmann et al. 2020, Ono et al. 2020), čím sa pečeno špecifický miR-122 stáva ďalším determinantom pečeno tropizmu HCV (Niepmann et al. 2020, Ono et al. 2020, Douam et al. 2016). Dve väzbové miesta (miesta I a II) v HCV 5'UTR sú vysoko zachované medzi genotypmi HCV na ktoré sa môžu viazať sekvencie miR-122 (Ono et al. 2020). Väzba miR-122 na miesta v 5' UTR sa vyskytuje kooperatívne a preukázalo sa, že sa podieľa na troch rôznych efektorových funkciách, a to na celkovej replikácii genómu, translačnej stimulácii, ako aj na stabilizácii genómu RNA proti nukleázám (Gerresheim et al. 2019, Niepmann et al. 2020).

Toto vo svojom článku potvrdzujú aj Gerresheim et al. (2019), ktorí píšú, že stabilita genómu HCV RNA, jeho translácia a replikácia sú pozitívne regulované touto miR-122 špecifickou pre pečeň (Gerresheim et al. 2019).

Bolo preukázané, že interakcia miR-122 s 5' UTR HCV prispieva k zloženiu funkčnej štruktúry IRES, ktorá je potrebná na účinnú transláciu a replikáciu vírusovej RNA (Ono et al. 2020). Niepmann et al. (2020) vo svojom článku píše, že miR-122 stimuluje transláciu závislú

od HCV IRES, najpravdepodobnejšie stabilizáciou určitej štruktúry IRES, ktorá je nevyhnutná na iniciáciu (Niepmann et al. 2020).

Dôležité teda je, že aktivácia prekladu cez IRES je podporená komplexom tlmenia (miRISC) obsahujúcim miRNA. Komplex miR-122-miRISC zabraňuje degradácii HCV- RNA bunkovými 5' - 3' exonukleázami Xrn1 a Xrn2 a stabilizuje interakciu HCV- RNA. Pri infekcii HCV má interakcia medzi miR-122-miRISC a HCV-RNA ďalšie dôsledky v sekvastrácii miR-122 z hostiteľských cieľov mRNA, čo je jav známy ako "hubovitý účinok", ktorý môže byť zodpovedný za dlhodobý onkogénny potenciál infekcie HCV. Nedávno bolo uvedené, že miR-122 má funkciu, ktorá vyvoláva skladanie HCV IRES tak, že v ňom sa môže ľahko spojiť s ribozómom 80S pre efektívny preklad (Ono et al. 2020). Okrem toho boli hlásené previsnuté regióny v miR-122, ktoré interagujú s HCV- RNA a sú dôležité pre hojnosť HCV-RNA (Ono et al. 2020). Skutočné funkcie týchto zachovaných väzbových miest miR-122 v replikačnom cykle HCV sú stále do značnej miery neznáme (Gerresheim et al. 2019, Niepmann et al. 2020).

#### *Peroxidácia lipidov ako represor replikácie vírusu hepatitídy C*

Na rozdiel od iných vírusov je HCV citlivý na oxidačné poškodenie membrány, ktoré sa zvyčajne vyskytuje v stresových tkanivách. Peroxidácia lipidov ovplyvňuje konformáciu proteázy NS3-4A a NS5B, obmedzuje replikáciu HCV v bunkovej kultúre a tým uľahčuje dlhodobú perzistenciu vírusu v infikovaných tkanivách (Douam et al. 2016).

### **3.8.7 Zabalenie a vylúčenie**

Zostavenie častíc HCV je zložitý molekulárny proces, zahŕňajúci získavanie štrukturálnych proteínov a vírusovej RNA v mieste zhromažďovania, tvorbu nukleokapsidu, obalenie a dozrievanie vírusovej častice. Pretože tento proces zahŕňa značné množstvo vírusových faktorov, hostiteľských proteínov a lipidových zložiek, tak molekulárne mechanizmy a faktory regulujúce tento proces stále nie sú úplne charakterizované, čo obmedzuje koncepciu DAA zameraných na neskoré kroky životného cyklu HCV (Douam et al. 2016).

Výsledné potomstvo HCV RNA je zabalené do vírusových kapsidov, následne vírusovými glykoproteínmi a vylučované z buniek sekrečnou cestou. Aj keď presný mechanizmus tvorby LVP nie je úplne objasnený tak, v určitom okamihu v procese dozrievania získavajú virióny HCV endogénne lipidy a silnú vrstvu apolipoproteínov pochádzajúcich od hostiteľa, ktoré pokrývajú vírusový obal a ktoré pravdepodobne napomáhajú uvoľňovaniu aj vstupu vírusu (Catanese a Dorner 2015).

### **3.8.8 Prenos z bunky na bunku**

Okrem prenosu cirkulujúcimi časticami, ktorý sa označuje ako bezbunková infekcia (cell-free infection), sa môžu častice HCV prenášať priamo do susedných buniek prostredníctvom takzvaného prenosu z bunky na bunku (cell-to-cell transmission) (Fénéant et al. 2015). Inými



slovami, okrem infikovania hepatocytov z krvného obehu, teda vstupnej cesty ktorá sa nazýva „bezbunková“, sa môžu častice HCV prenášať priamo medzi susednými bunkami, tzv. šírenie „z bunky do bunky“. Bočný pohyb HCV bez difúzie cez extracelulárne prostredie by mohol uľahčiť vírusovú disemináciu najmä preto, že dva z jeho koreceptorov, CLDN1 a OCLN, sú dodávané do medzibunkového rozhrania (Catanese a Dorner 2015).

Rozsah v akom bezbunkový prenos a prenos z bunky na bunku prispieva k perzistencii HCV zatiaľ známy nie je, avšak cesta prenosu z bunky na bunku poskytuje potenciálne výhody, pokiaľ ide o účinnosť infekcie a vyhýbanie sa imunitnému systému. Navyše môže byť pre udržanie infekcie v priebehu rokov dôležitejšia (Catanese a Dorner 2015). To, že prenos buniek z infikovaného hepatocytu na priľahlé hepatocyty je rozhodujúci pre pretrvávanie vírusu v pečeni tvrdí aj Colpitts et al. (2020).

Táto cesta prenosu bola prvýkrát navrhnutá, keď boli infikované bunkové ložiská pozorované v infikovaných ľudských pečeniach pomocou zobrazovacej analýzy RNA a nedávno bola potvrdená pomocou podobného prístupu (Fénéant et al. 2015). Napriek početným podobnostiam medzi vstupom bez buniek a prenosom HCV z bunky na bunku, boli hlásené rozdiely v molekulárnych mechanizmoch, ktoré sú základom týchto odlišných ciest vstupu vírusu. Hoci vírusové a hostiteľské faktory zapojené do oboch vstupných ciest HCV sú celkovo rovnaké, tak medzi oboma vstupnými cestami môžu existovať jemné rozdiely v interakciách medzi vírusom a hostiteľom. To, či tieto pozorovania in vitro majú dôsledky na šírenie HCV in vivo, ale ešte známe nie je (Colpitts et al. 2020).

Niekoľko štúdií využívajúcich rôzne prístupy preukázalo, že CD81, SR-BI, CLDN1, OCLN, EGFR, EphA2, NPC1L1 a LDLR pravdepodobne prispievajú k prenosu HCV medzi bunkami. Čo sa týka vstupu bez buniek, tak bol hlásený prenos HCV z bunky na bunku nezávislý na SR-BI. Štúdie využívajúce darcovské bunky so zdeaktivovaným apoE preukázali, že v tomto procese hrá dôležitú úlohu aj apoE, zatiaľ čo sa zdá, že apoE exprimovaný prijímajúcimi bunkami nie je relevantný pre prenos HCV z bunky na bunku. Z dôvodu, že je apoE nevyhnutný pre neskorý krok morfogénzy vírusových častíc a ich infekčnosti, naznačuje, že sa zrelé obalené vírusové častice prenášajú medzi susednými hepatocytmi. Je to v súlade s údajmi z nedávnej štúdie vizualizácie živých buniek pomocou mutantných vírusov, ktorá ukazuje, že štrukturálne gény HCV a gén p7 sú nevyhnutné pre funkčný prenos HCV z bunky na bunku (Colpitts et al. 2020).

## 4. TERAPIA

Vo všeobecnosti možno lieky na terapiu hepatitídy B a C klasifikovať na antivirotiká zamerané na hostiteľa (HTA), alebo na priamo pôsobiace antivirotiká (DAA). HTA sa zameriavajú na produkty hostiteľských génov, zatiaľ čo DAA sa zameriavajú na produkty vírusových génov (Block et al. 2015). Liečba HBV donedávna zahŕňala imunomodulačné látky, ako je štandardný interferón alfa, pegylovaný interferón alfa alebo liečbu nukleozidovými / nukleotidovými analógmi s priamymi antivírusovými účinkami (Lin a Kao 2013). Liečba HCV bola založená na kombinácii pegylovaného interferónu a ribavirínu (González-Grande et al. 2016).

### 4.1 Interferóny

Interferóny sú prirodzené bunkové proteíny, ktoré môžu mať u ľudí rôzne účinky ako napríklad priamy antivírusový účinok, inhibíciu bunkového rastu, kontrolu apoptózy a tiež podporu imunitných reakcií (Rong a Perelson 2010). Táto široká skupina cytokínov vyvolaných výzvou na obranu hostiteľa je nevyhnutná pre mobilizáciu imunitných odpovedí na patogény. Sú rozdelené do troch tried, typ I až III, pričom všetky IFN majú spoločnú schopnosť, a to vyvolať antivírusové aktivity iniciované interakciou s ich príbuznými receptormi (Negishi et al. 2018).

IFN typu I sú v zásade exprimované vrodennými imunitnými bunkami. IFN typu II je predstavovaný produktom jediného génu, **IFN- $\gamma$** , bol rozpoznávaný pre svoju antivírusovú aktivitu indukovanú aktivovanými imunitnými bunkami, typicky NK a T bunkami. IFN typu III (tiež nazývané **IFN- $\lambda$** ) sú obmedzené v tkanivovej distribúcii (nie sú vysoko exprimované v krvotvorných bunkách) a pôsobia prevažne na povrchoch epitelu (Negishi et al. 2018).

Ak sa **IFN- $\alpha$**  podáva subkutánne, tak sa špecificky viaže na vysokoafinitné receptory prítomné na väčšine bunkových povrchoch, vrátane povrchov hepatocytov, čo má dva samostatné, ale komplementárne účinky:

1. Vytvára nešpecifický antivírusový stav v infikovaných bunkách, ktorý inhibuje vírusovú replikáciu. Môže sa to vyskytnúť aj v neinfikovaných bunkách, čím sa znižuje pravdepodobnosť infekcie. IFN- $\alpha$  tiež zvyšuje antivírusové imunitné reakcie hostiteľa, čo môže urýchliť smrť buniek už infikovaných vírusom.
2. Keď sa viaže na receptory imunitných buniek, vyvoláva množstvo ďalších účinkov: aktivuje efektorové bunky, ako sú makrofágy, NK bunky a cytotoxické T lymfocyty, indukuje expresiu antigénu hlavného histokompatibilného komplexu triedy I a interaguje zložito s cytokínovou kaskádou (Palumbo 2011).

IFN- $\alpha$  je produkovaný plazmacytoidnými dendritickými bunkami a jeho použitie na liečbu hepatitídy B sa datuje do roku 1976. IFN- $\alpha$  inhibuje replikáciu HBV znížením transkripcie RNA, ku ktorej dochádza z cccDNA (Woo et al. 2017).

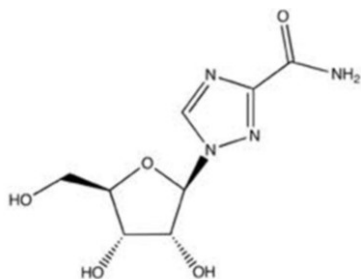
V súčasnosti sa IFN- $\alpha$  zriedka používa pri liečbe HCV bez toho, aby sa najskôr pegyloval. Pegyláciou sa zlepšila účinnosť liečiva, zvýšením jeho systémovej retencie a možným zvýšením jeho väzobnej afinity k bunkovým receptorom, čo môže urýchliť absorpciu a zmeniť vzorce distribúcie (Palumbo 2011).

### Pegylovaný inteferón $\alpha$

Vznik pegylovaného interferónu- $\alpha$  (**PEG-IFN- $\alpha$** ) v roku 2005 mal za následok nahradenie štandardného interferónu (Woo at al. 2017). Významným pokrokom v liečbe IFN bolo práve zavedenie pegylovaných IFN, ktoré spomaľujú elimináciu liečiva, čo umožňuje udržiavať stabilnú sérovú koncentráciu pri podávaní raz týždenne (Rong a Perelson 2010). Prostredníctvom pegylácie IFN, teda pridaním polyetylénglykolu (PEG), sa predĺžil biologický polčas. Komerčne sú dostupné dva PEG-IFN: **PEG-IFN- $\alpha$ 2a** a **PEG-IFN- $\alpha$ 2b**, pričom majú odlišné farmakokinetické vlastnosti. PEG-IFN-  $\alpha$ 2a má polčas rozpadu asi 77 hodín a PEG-IFN-  $\alpha$ 2b 40 hodín (Rong a Perelson 2010, Buskirk 2013). Práve vďaka pegylácii IFN došlo v liečbe hepatitídy C k veľkému pokroku (Buskirk 2013). PEG-IFN- $\alpha$  je zároveň prvou voľbou pri liečbe chronickej hepatitídy B. Imunitná odpoveď z CD8 T buniek a NK buniek pri hepatitíde B je nefunkčná. Uvádza sa, že PEG-IFN- $\alpha$  kumulatívne riadi proliferáciu, aktiváciu a antivírusový potenciál NK buniek. Obnova reakcií NK buniek je spojená s väčším poklesom HBsAg, keď sa pacientom podáva PEG-IFN- $\alpha$  (Woo at al. 2017). U pacientov s vírusovou hepatítidou C poskytla liečba PEG-IFN lepšiu mieru SVR v porovnaní so štandardnými IFN (Rong a Perelson 2010).

## 4.2 Ribavirín

Ribavirín (RBV) sa skúma už viac ako 20 rokov ako potenciálna liečba mnohých vírusov (Buskirk 2013). Zistilo sa totiž, že RBV má širokospektrálnu antivírusovú aktivitu proti DNA aj RNA vírusom v modeloch in vitro a in vivo (Koh a Liang 2014, Buskirk 2013). Práve kvôli tejto širokej antivírusovej aktivite začali vedci už niekedy okolo roku 1992 testovať RBV na liečbu HCV (Buskirk 2013).



Obr. 11 Štruktúra ribavirínu (Prevzaté od: Buskirk 2013)

RBV (1-beta-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazol-3-karboxamid), pôvodne syntetizovaný v roku 1972 je perorálny syntetický guanozín-nukleozidový analóg (t.j. purínový nukleozidový analóg so štruktúrou podobnou guanozínu) (Buskirk 2013, Ahmed et al. 2020, Koh a Liang 2014).

Počiatkové pozorovanie viedlo k pilotným štúdiám anti-HCV, hodnotiacim monoterapiu RBV na začiatku 90. rokov, ktoré preukázali malý antivírusový účinok, ale zlepšenie markerov poškodenia pečene (Koh a Liang 2014). Buskirk (2013) uvádza, že ak sa RBV používa ako monoterapia, tak vedie buď k prechodnému počiatkovému poklesu, prípadne k žiadnemu zníženiu hladiny HCV RNA. Wang et al. (2015) uvádzajú, že RBV je vo forme monoterapie pre chronickú infekciu HCV neúčinný.

Pridanie RBV k IFN- $\alpha$  však dramaticky zlepšilo dlhodobý výsledok liečby (Buskirk 2013). RBV sa totiž následne testoval v kombinácii s IFN- $\alpha$ , čo viedlo k podstatnému zlepšeniu miery SVR (zo 6–16% na 34–42% pri 6 alebo 12 mesiacoch liečby). Toto významné zlepšenie v miere SVR bolo primárne spôsobené skutočnosťou, že RBV dokázal zabrániť virologickému relapsu po ukončení liečby u mnohých pacientov. Tento režim bol klinicky účinnejší ako ktorýkoľvek z liekov samotných a stal sa tak štandardom liečby chronickej infekcie HCV na viac ako 10 rokov (Koh a Liang 2014, Ahmed et al. 2020, Buskirk 2013). RBV bol schválený v roku 1998 v kombinácii s IFN v dávke založenej na 1000 - 1200 mg / deň v dvoch rozdelených dávkach na liečbu HCV gt1 po dobu 48 týždňov a vo fixnej dávke 800 mg / deň v dvoch dávkach pre gt 2 / 3 počas 24 týždňov (Buskirk 2013).

RBV môže zvýšiť mieru trvalej virologickej odpovede (SVR) aj keď sa používa v kombinácii s DAA. Navyše, účinnejšie kombinované terapie DAA môžu znížiť potrebu RBV, a tak vylúčiť niektoré nežiaduce vedľajšie účinky RBV ako je anémia (Wang et al. 2015, Ahmed et al. 2020). Dôležitý je tým pádom hlavne fakt, že RBV je naďalej nevyhnutnou súčasťou liečby (Buskirk 2013).

Navyše je zaujímavé, že riziko vzniku HCC z hepatitídy C je po vírusovej eliminácii liečbou RBV s IFN znížené. Niekoľko klinických štúdií naďalej používa túto schému ako štandardné opatrenie na prevenciu vývoja HCC z chronickej hepatitídy C. Nedávna klinická štúdia fázy I / II preukázala porovnateľné účinky medzi PEG-IFN a RBV a priamou antivírusovou terapiou na vývoj HCC po eradikácii HCV (Casaos et al. 2019).

Napriek úspechu RBV v liečbe HCV, nie je ešte úplne možné objasniť špecifický mechanizmus (mechanizmy) proti HCV. Tento nedostatok znalostí sťažil ďalšie zlepšovanie činnosti RBV. Boli navrhnuté rôzne mechanizmy, vrátane: 1. RNA vírusovej mutagenézy zavedením RBV trifosfátu do vírusového genómu HCV, ktorý môže spôsobiť nukleotidové prechody; 2. priama inhibícia proti HCV RNA závislým RNA polymerázam, ktorá vedie k inhibícii replikácie genómu; 3. inhibícia hostiteľskej inozínmonofosfátdehydrogenázy vedúca k zníženej syntéze a nižším hladinám GTP s výsledným znížením vírusovej replikácie; 4. zmena adaptívnej imunitnej odpovede hostiteľa prostredníctvom potlačenia odpovede Th2 a indukcie odpovede Th1 vedúca k zvýšenému klírensu infikovaných buniek (Koh a Liang 2014).

Ak sa na to pozrieme bližšie, tak, keďže je RBV nukleozidový analóg, tak jeho začlenenie do vírusového genómu môže viesť k letálnym mutáciám. Pri reakcii s HCV-RNA závislou RNA polymerázou (NS5B) môže RBV pôsobiť ako „napodobenina“ replikácie vírusu blokujúcej guanín a adenín prostredníctvom mechanizmu známeho ako „katastrofa chyby“. Priamy mechanizmus spočíva v kompetitívnej inhibícii inozínmonofosfátdehydrogenázy (IMPDH) monofosfátom RBV, ktorý reguluje hladinu bunkového guanozín trifosfátu (GTP). Inhibícia IMPDH, ktorá je kľúčovým krokom v de novo syntéze guanínu je požiadavka vírusovej replikácie (Gish 2006). Biosyntetický enzým IMPDH je zapojený do premeny inozínmonofosfátu (IMP) na xantosínmonofosfát (XMP), čo je krok obmedzujúci rýchlosť v de novo syntéze guanínových nukleotidov. Je to kľúčový determinant bunkových hladín guanínu a je následne rozhodujúci pre syntézu DNA a RNA, intracelulárnu signalizáciu závislú od G-proteínu a transport proteínov. Možno teda uviesť, že RBV je kompetitívnym inhibítorom IMPDH, ktorý sa viaže priamo na IMPDH (Casaos et al. 2019).

Buskirk (2013) navyše udáva, že RBV môže tiež fungovať ako selektívny agonista receptora TLR-7, ktorý indukuje endogénny interferón. Nakoniec je potrebné poznamenať, že rozdiel v reakcii pacienta na RBV možno čiastočne pripísať existencii rôznych izoform ENT1 v hepatocytoch a ich rôznymi schopnosťami prenášať RBV cez plazmatickú membránu.

Faktom je, že RBV nie je metabolizovaný enzýmami CYP450, a preto neindukuje pečňové enzýmy ani neinhubuje enzýmy CYP450. RBV je široko distribuovaný vo všetkých tkanivách a dĺžka času, počas ktorého je liečivo zachytené, sa veľmi líši od tkaniva k tkanivu (Buskirk 2013).

V praxi je RBV lacný a dobre tolerovaný (Hézode a Bronowicki 2016). Avšak hlavným dôvodom zníženia dávky alebo až prípadného prerušenia liečby je hemolytická anémia. Hemolytická anémia vyvolaná RBV je výsledkom kaskády udalostí, kedy po vstupe do obehu je významná časť RBV aktívne transportovaná do RBC a metabolizovaná na rôzne fosforylované deriváty. Fosforylované metabolity RBV sú zachytené intracelulárne a hromadia sa v priebehu času. To vedie k vyčerpaniu intracelulárneho ATP, zhoršeniu oxidačného dýchania závislého od ATP, zvýšenému oxidačnému stresu a oslabeniu integrity membrány. Zrelé červené krvinky sa degradujú a nastáva ich hemolýza (Buskirk 2013).

Medzi ďalšie nežiadúce účinky okrem už spomenutej hemolytickej anémie patrí aj únava, svrbenie, vyrážka, sinusitída a dna. Úmrtia na ribavirín boli tiež výsledkom infarktu myokardu u osôb s ochorením srdca (Koh a Liang 2014).

### 4.3 Liečba vírusovej hepatitídy B

Zatiaľ čo akútna forma hepatitídy B si ako benígne ochorenie nevyžaduje antivírusovú terapiu, (nakoľko do pol roka od vzniku ochorenia u imunokompetentných dospelých pacientov HbsAg vymizne a virostatiká sa podávajú iba v protrahovanom, alebo pri fulminantnom priebehu ochorenia) (Hůlek a Urbánek 2018), tak liečba chronickej hepatitídy B (CHB) síce umožňuje kontrolu nad infekciou, ale eradikácia vírusu je zriedkavá. Väčšina pacientov si pri súčasných liečebných režimoch vyžaduje aj tak už celoživotnú liečbu (König et al. 2019, Do a Reau 2020, Eller et al. 2018, Block et al. 2015). Liečba CHB má v prvom rade za cieľ predĺžiť a zlepšiť kvalitu života, zabrániť progresii do cirhózy pečene, dekompenzácii cirhózy a rozvoja HCC, čím je teda možné aj predísť nutnosti transplantácie pečene (Nicolini et al. 2019, Hůlek a Urbánek 2018). Nech sa už pristupuje k akejkoľvek liečbe, tak je vždy nutné vziať do úvahy vek pacienta, výskyt cirhózy pečene, alebo prítomnosť HCC v rodinnej anamnéze (Hůlek a Urbánek 2018).

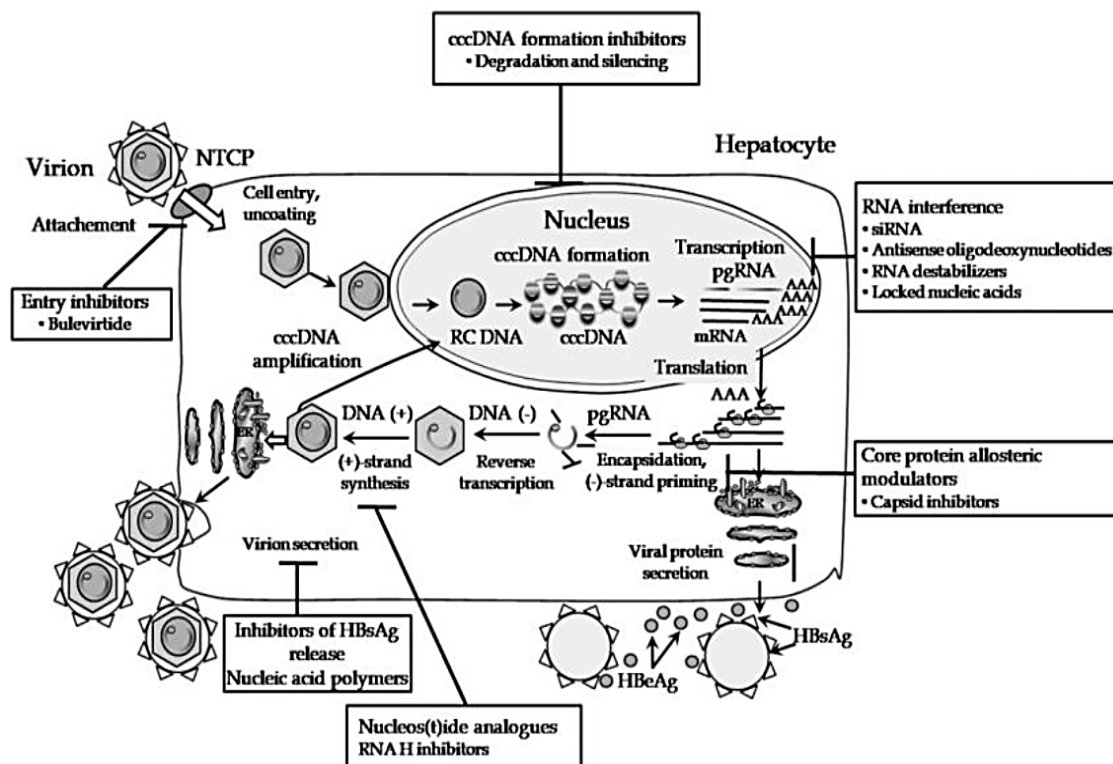
Na meranie účinnosti liečby HBV sa v súčasnosti používa potlačenie HBV DNA (tj. virologickej odpovede) a HBeAg alebo HBsAg sérokonverzia pri HBeAg pozitívnej a HBeAg negatívnej chronickej hepatitíde (Nicolini et al. 2019). Úplné funkčné vyliečenie (konečný terapeutický bod) je definované ako kombinácia trvalej straty HBsAg, eliminácie cccDNA, spolu s nedetekovateľnou sérovou HBV DNA a obnovenie imunitnej funkcie s cieľom dosiahnuť kontrolu nad vírusom (Alexopoulou et al. 2020, Lee et al. 2020). Takéto funkčné vyliečenie, so stratou HBsAg, alebo sérokonverziou na základe testov so spodnou hranicou detekcie HBsAg 0,05 IU / ml je spojené so zníženým rizikom HCC. Avšak v histórii CHB je to veľmi zriedkavou udalosťou (Lee et al. 2020). V súčasnosti odporúčaná liečba infekcie CHB totiž dosahuje počas liečby iba vírusovú supresiu a zriedka dochádza k úbytku povrchového antigénu hepatitídy B (HBsAg) (Alexopoulou et al. 2020). Tento fakt udávajú vo svojom článku aj Do a Reau (2020), ktorí uviedli, že aj napriek tomu, že pri súčasných terapiách je čiastočné funkčné vyliečenie možné a relatívne aj ľahko dosiahnuteľné, tak úplné funkčné vyliečenie je dosiahnuté len u menšiny pacientov a virologické vyliečenie je pravdepodobné ešte u menšieho počtu pacientov.

Terapeutickými cieľmi súčasnej antivírusovej liečby sú okrem virologickej odpovede aj biochemické, súvisiace so zlepšením klinických výsledkov. Biochemická odpoveď je definovaná ako normalizácia alanínaminotransferázy v sére. Dôležitým cieľom, ktorý sa má dosiahnuť je normalizácia alanínaminotransferázy so znížením vírusovej záťaže HBV. Tieto liečby však všeobecne nesľubujú funkčné vyliečenie CHB, čo je ideálny cieľ antivírusovej liečby (Lee et al. 2020).

Súčasná schválená liečba chronickej HBV na potlačenie vírusovej replikácie spadá do dvoch tried: nukleozidové / nukleotidové analógy (NA) (viď kapitolu 4.3.1) a (pegylovaný) interferón alfa (Alexopoulou et al. 2020, Eller et al. 2018). Pri liečbe založenej na IFN je virologická

odpoveď definovaná ako hladina HBV DNA v sére nižšia ako 2 000 IU / ml, ktorá sa hodnotí 6 mesiacov po začatí liečby a na konci liečby (Lee et al. 2020).

Súčasnú existujúcu antivírusovú liečbu nemôžu HBV z tela úplne vykoreniť, pričom hlavný dôvod v súvislosti s molekulárnym mechanizmom replikácie HBV je nejasný (Ji et al. 2020). Block et al. (2015), Hůlek a Urbánek (2018), Nicolini et al. (2019) ale aj ďalší uviedli, že je to spôsobené najmä prítomnosťou cccDNA HBV (viď kapitolu 3.7.5), prítomnej v jadre infikovaných hepatocytov, ktorá je vysoko stabilná štruktúra a pôsobí ako minichromozóm pre všetky prepisy HBV. Navyše sa zdá, že HBV tiež menej reaguje na interferóny ako HCV. Je nutné vyzdvihnúť fakt, že aj napriek súčasným pokrokom je stále potrebný vývoj nových spôsobov liečby chronickej HBV, súčasne s lepším porozumením životného cyklu replikácie HBV (Do a Reau 2020), resp. pochopením molekulárneho mechanizmu, ktorý určuje replikáciu a patogenézu HBV (He et al. 2016).



Obr. 12 Kroky životného cyklu HBV a cieľové miesta skúmaných antivírusových látok (Prevzaté od: Alexopoulou et al. 2020)

V liečbe CHB sa za posledné dve desaťročia dosiahol značný pokrok. V súčasnosti existuje deväť schválených liekov na liečbu CHB, vrátane dvoch formulácií IFN - konvenčných a pegylovaných (PEG-IFN) a siedmich NA: lamivudín, telbivudín, adefovir, entekavir (ETV), tenofovir-dizoproxilfumarát (TDF), tenofovir-alafenamidfumarát (TAF) a besifovir-dipivoxil (iba v Kórei) (Lee et al. 2020). ETV, TDF a TAF sa stali jedinou perorálnou liečbou odporúčanou AASLD a Európskou asociáciou pre štúdium pečene (EASL) (Do a Reau 2020).

### **4.3.1 Nukleozidové / nukleotidové analógy**

Terapie pomocou nukleozidových / nukleotidových analógov (NA) sa zameriavajú na vírusovú polymerázu a inhibujú reverznú transkripciu. Blokujú syntézu vírusovej genómovej rcDNA, aby zabránili tvorbe zrelej kapsidy a uvoľneniu infekčného potomstva, čím znižujú doplnenie cccDNA (Hu et al. 2019b). NA znižujú progresiu k cirhóze, zlyhaniu pečene a HCC (Cornberg et al. 2019). Avšak, aj keď účinne potláčajú vírusovú replikáciu, tak nevedú k virologickému vyliečeniu (König et al. 2019, Do a Reau 2020). Virologická odpoveď v prípade liečby NA je definovaná ako nedetekovateľná HBV DNA na základe testov so spodnou hranicou detekcie 10–20 IU / ml v krvi (Lee et al. 2020).

#### **Lamivudín**

Lamivudín, liečivo na báze pyrimidínového nukleozidu bolo prvým NA schváleným na liečbu chronickej infekcie HBV. Lamivudín je inhibítor reverznej transkriptázy (RT) a inhibuje replikáciu HBV inhibíciou aktivity RT za účelom zníženia hladiny HBV DNA. Liečivo sa podáva perorálne s rýchlou absorpciou a vysokou biologickou dostupnosťou. Môže účinne znižovať hladinu HBV DNA v sére u liečených pacientov. Po vysadení lamivudínu sa replikácia HBV rýchlo vracia späť. Ďalším problémom pri podávaní lamivudínu je vysoká frekvencia mutácií, vedúcich k rezistencii aj po krátkej liečbe. Medzi bežné mutácie rezistencie na lieky patria mutácie tyrozín-metionín-aspartát-aspartát (známe ako YMDD mutant) (Kang et al. 2015).

#### **Telbivudín**

Telbivudín je špecifické, selektívne a perorálne liečivo používané na liečbu chronickej hepatitídy B. Vykazuje jedinečné výhody v inhibícii syntézy obidvoch vlákien HBV DNA. V klinickej praxi je telbivudín jediným liekom, ktorý je možné bezpečne použiť na liečbu tehotných pacientiek. Antivírusová účinnosť telbivudínu je silnejšia ako antivirotická účinnosť lamivudínu. Počet pacientov s nedetekovateľnou HBV DNA po liečbe telbivudínom je významne vyšší ako po liečbe lamivudínom (Kang et al. 2015).

#### **Entekavir**

Entekavir je liečivo s guanínovým nukleozidom, ktoré ponúka silnú selektívnu inhibíciu HBV polymerázy. Po fosforylácii v bunkách sa stáva aktívnou trifosfátovou formou. ETV inhibuje všetky tri funkcie vírusovej polymerázy: (1) iniciáciu HBV polymerázy; (2) syntézu DNA s negatívnym reťazcom z templátu pgRNA; a (3) syntézu reťazca HBV DNA. Inhibičná účinnosť ETV je 300-krát vyššia ako u iných NA, ako je lamivudín alebo adefovir, a frekvencia mutácií rezistencie je veľmi nízka. Zdieľa určitú krížovú toleranciu s lamivudínom. Režim ETV by mal byť splnený pred ukončením; inak môže dôjsť k rýchlemu zhoršeniu stavu (Kang et al. 2015).



## **Adefovir**

Adefovir je purínové nukleozidové proliečivo. Fosforylácia adefoviru je nevyhnutná na inhibíciu a dochádza ku tvorbe aktívneho metabolitu adefovir-difosfátu, akonáhle vstúpi do bunky. Adefovir-difosfát môže nahradiť normálne substráty dATP (adenozín). Po začlenení do reťazca vírusovej DNA zastaví predĺženie syntézy vírusovej DNA. Navrhuje sa, že adefovir môže tiež indukovať produkciu IFN- $\alpha$ , zvyšovať aktivitu NK buniek a stimulovať imunitnú odpoveď hostiteľa. Keď sa používa adefovir, tak je potrebné dôkladné sledovanie funkcie obličiek (Kang et al. 2015).

## **Tenofovir**

Tenofovir je acyklický adenínový nukleotidový analóg, ktorý inhibuje replikáciu HBV (aj HIV) v kroku RT. Proliečivo tenofoviru sa konvertuje na tenofovir-difosfát pomocou katalýzy bunkovou kinázou. Tenofovir sa odporúča z dôvodu jeho silnej inhibície, vysokej bariéry rezistencie na lieky a celkovej rovnováhy medzi prínosmi a rizikami (Kang et al. 2015).

Okrem v súčasnosti schválených IFN a NA existuje možnosť vývoja nových látok na inhibíciu replikácie vírusu s mechanizmami účinku, ktoré ešte neboli preskúmané. Kroky používajú hostiteľské cesty/ proteíny a proteíny špecifické pre HBV, takže by sa mohli vyvinúť nové HTA a DAA (Block et al. 2015).

### **4.3.2 Inhibítory pripojenia / vstupu HBV**

Znalosti o tom, ako HBV vstupuje do hepatocytov, viedli k vývoju inhibítorov vstupu. Tieto inhibítory je možné klasifikovať podľa spôsobu ich pôsobenia na: (1) Neutralizujúce protilátky zameriavajúce sa na antigénnu slučku S-domény alebo N-konce epitopov HBV v doméne preS1; (2) Inhibítory pripojenia, ktoré sa viažu na vírus (napr. **heparín**) alebo bunkové heparansulfátové proteoglykány (napr. **polylyzín**); (3) Substráty NTCP, vrátane konjugovaných žľových solí alebo iných malých molekúl; (4) Inhibítory NTCP, ako je myristylovaný peptid pre-S1 **myreludex-B**, **cyklosporín A** a jeho deriváty. Posledné uvedené látky blokujú funkciu receptora v nesaturujúcich koncentráciách s dlhým polčasom rozpadu na receptore a môžu tiež blokovať transport žľových solí a iných NTCP substrátov vo vyšších koncentráciách (Cornberg et al. 2019).

Substráty NTCP vrátane taurocholátu a jeho derivátov sa testovali ihneď po objavení NTCP. Vysoké koncentrácie konjugovaných žľových solí účinne inhibujú infekcie HBV (HDV). Koncentrácie potrebné na inhibíciu infekcie sú však vysoko nad normálnym fyziologickým rozsahom koncentrácií žľových solí v ľudskom tele a dlhodobá liečba by mohla viesť k nepriaznivým účinkom. Okrem endogénnych substrátov sa navyše preukázalo, že pomocou NTCP sú transportované aj xenobiotiká (Herrscher et al. 2020).

Je zaujímavé, že aminokyselinové motívy NTCP, kritické pre vstup HBV sa prekrývajú s motívmi pre príjem žlčových solí NTCP, pričom v bunkových kultúrach sa pozorovala inhibícia vstupu HBV prírodnými ligandmi NTCP. Ďalej sa ukázalo, že tricyklický polyketid, **vanitaracín A**, inhibuje vstup HBV a HDV priamou interakciou s NTCP a inhibíciou jeho transportnej aktivity. Napriek tomu stojí za zmienku, že určité analógy CsA, ktoré rušia imunosupresívnu aktivitu, majú silnejšiu anti-HBV aktivitu bez narušenia funkcie transportéra NTCP, pravdepodobne prostredníctvom alosterického mechanizmu. V každom prípade, objasnenie štruktúry komplexu preS1-NTCP pomôže vysvetliť presný spôsob účinku identifikovaných inhibítorov vstupu HBV (Mitra et al. 2018).

Inhibíciu vstupu HBV možno dosiahnuť aj znížením úrovne expresie NTCP. Receptor kyseliny retinovej (RAR) bol navrhnutý na reguláciu promótorovej aktivity ľudského génu NTCP (hNTCP), pričom RAR-selektívny antagonista **R041–5253** znižuje bunkovú náchylnosť na infekciu HBV inhibíciou aktivity hNTCP promótoru. Zistilo sa tiež, že interleukínový cytokín IL-6, reguluje expresiu NTCP. Predbežné ošetrovanie buniek HepaRG IL-6 viedlo k 98% zníženiu expresie NTCP mRNA spolu s 80% znížením absorpcie taurocholátu sprostredkovaného NTCP a 90% inhibíciou vstupu HBV. Avšak IL-6 je prozápalový cytokín a jeho nadmerné použitie môže viesť k rozvoju autoimunitných chorôb. Je teda potrebné určiť správne dávkovanie alebo hladinu endogénnej indukcie, ktoré by minimalizovali vedľajšie účinky pri ďalšom vývoji (Mitra et al. 2018).

#### *HBV neutralizujúce protilátky*

Inhibícia vstupu môže interferovať s HBV počas akútnej aj perzistujúcej fázy infekcie. V akútnej fáze, krátko po nástupe infekcie, keď imunitný systém kontroluje patogén iba čiastočne, môžu inhibítory vstupu chrániť naivné hepatocyty pred absorpciou, replikáciou, a šírením vírusu. Dlhodobá liečba počas pretrvávajúcich infekcií môže viesť k vírusovému klírensu v dôsledku prirodzeného alebo imunitne sprostredkovaného obratu infikovaných hepatocytov v pečeni. Interferencia s vírusovým vstupom sa v súčasnosti klinicky využíva na prevenciu nových infekcií (Lempp a Urban 2014).

Prvým a v súčasnosti jediným klinicky schváleným inhibítorom vstupu HBV je **imunoglobulín hepatitídy B** tzv. **HBIG**. Ide o zmes protilátok namierených proti S proteínom purifikovaných z plazmy očkovaných osôb alebo od pacientov, ktorí infekciu predtým prekonali. HBIG boli prvýkrát použité v roku 1993 na liečbu HBV pozitívnych pacientov po transplantácii pečene. Podávanie dlhšiu dobu po transplantácii znížilo rýchlosť reinfekcie štetu zo 75 na 35% a významne zlepšilo prežívanie pacientov. Aktuálnym klinickým štandardom je použitie HBIG v kombinácii s NA, čo ďalej znižuje reinfekciu štetu na menej ako 5%. HBIG majú tiež klinický prínos v prevencii vertikálneho prenosu z matky na dieťa, keď sú novorodenci liečení

kombináciou HBIG a HBV vakcíny a matky, ktoré boli pred pôrodom liečené NA. Liečba HBIG zahŕňa riziko selekcie vírusových variantov s mutáciami v miestach viažucich protilátky, ktoré unikajú neutralizácii a po vertikálnom prenose vytvárajú infekciu v pečenevom štepe alebo u novorodencov. Okrem HBIG bolo vyvinutých niekoľko monoklonálnych protilátok (mAb) zameraných na S alebo preS, ale žiadna z nich doteraz nedosiahla schválenie pre terapeutické použitie (Lempp a Urban 2014).

### Inhibítory pripojenia

#### **Heparín a suramín**

Heparín a suramín sa viažu na povrchové proteíny HBV, čím chránia virión pred interakciami s HSPG (Lempp a Urban 2014). Heparín je rozpustný vysoko sulfatovaný glykosaminoglykán, inhibujúci infekciu HBV in vitro. Heparín sa klinicky používa ako antikoagulant, ktorý sa viaže na antitrombín III a následne inhibuje kaskádu zrážania krvi. Predpokladá sa, že heparín sa viaže na povrchové proteíny HBV, čím chráni vírus pred interakciou s bunkovými HSPG. Rovnaký mechanizmus účinku sa navrhuje aj pre suramín, vysoko sulfatovaný naftylamínový derivát močoviny o ktorom sa predtým preukázalo, že interferuje s prvými krokmi infekcie kačacieho HBV in vitro a in vivo. Inhibícia vstupu HBV bola overená s použitím systému HepaRG. Suramín má terapeutickú aktivitu proti rôznym cieľom. Používa sa na profylaktické liečenie ľudskej trypanosomiázy a od 80. rokov sa používal a stále používa v štúdiách s rôznymi indikáciami rakoviny. V roku 1987 bola z dôvodu toxicity a neúčinnosti liečby prerušená klinická štúdia zahŕňajúca 3 pacientov infikovaných HBV liečených suramínom (Lempp a Urban 2014).

#### **Polylyzín**

HSPG sú hostiteľské faktory, ktoré rôzne vírusy používajú na primárne pripojenie a v niektorých prípadoch aj na vstup. Predstavujú preto ideálny cieľ pre špecifickú antivírusovú terapiu zameranú na inhibíciu viacerých vírusových infekcií. Okrem rozpustných faktorov, ktoré sa viažu na HSPG, ako je poly-L-lyzín, boli ako väzobní partneri pre HSPG opísané syntetické antilipopolsacharidové peptidy. Prítomnosť syntetických antilipopolsacharidových peptidov počas in vitro infekcie inhibovala vstup rôznych obalených vírusov vrátane vírusu herpes simplex, vírusu ľudskej imunitnej nedostatočnosti (HIV), HCV a HBV (Lempp a Urban 2014).

### Inhibítory NTCP

#### **Bulevirtid (Myrcludex B)**

Ide o syntetický N-acetylovaný lipopeptid, ktorý obsahuje doménu pre-S1 viažucu NTCP veľkého obalového proteínu HBsAg. Je zásadný teda pre interakciu medzi membránou vírusu a bunkou, pričom sa ukázalo, že predbežné ošetrenie týmto peptidom bráni vstupu a šíreniu

vírusovej infekcie. Myrcludex B účinne inhibuje vstup HBV do hepatocytov, prostredníctvom blokovania jeho väzby na NTCP receptor (Watashi et al. 2014, Alexopoulou et al. 2020, Mitra et al. 2018, Lee et al. 2020). Kompetitívne sa viaže na NTCP vďaka nanomolárnemu rozsahu afinity na NTCP a blokuje de novo HBV infekciu kompetíciou s vírusovým pre-S1 o väzbu s NTCP (Lee et al. 2020) a tým zabraňuje šíreniu intrahepatálneho vírusu in vitro aj in vivo (Mitra et al. 2018).

Myrcludex B je vysoko selektívny pri zacielení na hepatocyty. Ako je vidieť vo farmakokinetických štúdiách, peptid sa rýchlo hromadí v pečeni dokonca aj u zvierat, ktoré nie sú citlivé na HBV. Väzba myrcludexu B na NTCP nielenže inhibuje infekciu HBV už pri nízkych koncentráciách, ale tiež blokuje absorpciu žlčových solí, čo je fyziologická funkcia NTCP, ak sa podáva v saturujúcich (nasýtených) koncentráciách. Možné klinické dôsledky takejto inhibície počas liečby Myrcludexom B zatiaľ jasné nie sú. Zvýšené hladiny žlčových solí v sére však môžu byť kompenzované indukovanou expresiou ďalších transportérov žlčových solí špecifických pre pečeň, ako sú členovia rodiny OATP (Lempp a Urban 2014).

Chimérické uPA-SCID myši boli pred infekciou HBV liečené rôznymi spôsobmi podávania myrcludexu B a príbuznými lipopeptidmi. Už veľmi nízke subkutánne dávky (0,2 mg / kg) peptidu úplne zrušili vznik infekcie HBV (Lempp a Urban 2014).

Myrcludex B bol nedávno schválený v Európskej únii na liečbu vírusu chronickej hepatitídy D u pacientov pozitívnych na HDV RNA. V štúdií fázy IIa bolo randomizovaných 40 pacientov s negatívnym HBeAg, ktorí dostávali myrcludex B v jednej z piatich dávok (0,5, 1, 2 alebo 5 mg počas 12 týždňov a 10 mg raz denne počas 24 týždňov). Myrcludex B sa podával subkutánnou injekciou. Pokles HBV viac ako o 1 log bol pozorovaný u šiestich z ôsmich pacientov v skupine s dávkou 10 mg a u siedmich z dvadsaťjeden pacientov v skupinách s nižšími dávkami. Žiadny z pacientov však nedosiahol stratu HBsAg (Lee et al. 2020).

Myrcludex B je v súčasnosti jediným inhibítorom vstupu v klinickej štúdií fázy III. Ukázalo sa, že inhibuje vstup HBV / HDV v koncentrácii nižšej ako je koncentrácia potrebná na inhibíciu absorpcie žlčových kyselín. Myrcludex B sa tak môže použiť na inaktiváciu funkcie receptora NTCP v dávkach, ktoré významne neovplyvňujú jeho prirodzenú funkciu transportéra žlčových solí, čo je zrejmé z porovnania s Cyklosporínom A (Herrscher et al. 2020).

### **Cyklosporín A**

Cyklosporín A (CsA), liek schválený na použitie pri imunosupresii, má antivírusovú aktivitu proti HBV (Herrscher et al. 2020). Toto imunosupresívum sa môže priamo viazať na NTCP a prerušiť interakciu medzi NTCP a oblasťou preS1 (Mitra et al. 2018). CsA sa primárne zameriava na bunkové peptidyl prolyl cis / trans-izomerázové (PPIázy) cyklofilíny (CyPs). Výsledný komplex CsA / CyP sa následne viaže a inhibuje kalcineurín (CN), fosfatázu, ktorá defosforyluje

nukleárny faktor aktivovaných T buniek (NF - AT), aby umožnil nukleárnu translokáciu a transaktiváciu génov. Táto inhibícia CN prispieva k potlačeniu imunitných reakcií. Okrem toho je známe, že CsA inhibuje receptor MDR1 (P-glykoproteín) a niekoľko transportérov MRP (Watashi et al. 2014).

Inhibítory tohto druhu však interferujú s absorpciou žlčových kyselín, čo môže viesť k nepriaznivým účinkom. Bola skúmaná schopnosť derivátov CsA inhibovať vstup HBV bez ovplyvnenia transportu žlčových kyselín na to, aby sa tento problém obišiel. Ukázalo sa, že dva deriváty CsA, **SCY450** a **SCY995** vyvolávajú silnú inhibíciu HBV bez interferencie s absorpciou žlčových kyselín. Predtým, ako môžu byť tieto deriváty CsA vyhodnotené ako vstupné inhibítory liečby u ľudí, sú potrebné podrobné štúdie účinnosti a bezpečnosti na zvieracích modeloch (Herrscher et al. 2020).

### **Ezetimib**

Ďalším liečivom, ktoré inhibuje absorpciu žlčových solí NTCP je ezetimib, ktorý sa klinicky používa na liečbu hypercholesterolémie a o ktorom sa nedávno zistilo, že inhibuje infekciu HCV interakciou s hosťiteľským faktorom NPC1L1. Uvádza sa tiež, že ezetimib je schopný blokovat' infekciu HBV počas raného štádia životného cyklu. Táto inhibícia bola nezávislá od NPC1L1, pretože jej eliminácia nezrušila antivírusový účinok, čo naznačuje, že priama interakcia medzi ezetimibom a NTCP môže byť príčinou inhibície infekcie (Lemp a Urban 2014).

### **4.3.3 Zacielenie na cccDNA a jej transkripčnú aktivitu**

CccDNA je šablónou pre všetky HBV mRNA, pričom niekoľko kópií cccDNA úplne postačí na (opätovné) spustenie infekcie HBV (Nicolini et al. 2019). Na dosiahnutie úspešnej terapie chronickej hepatitídy B je potrebná trvalá supresia vírusovej replikácie a redukcia histologickej aktivity. Nakoľko v dôsledku perzistencie cccDNA vírusu v jadrách infikovaných hepatocytov, nemôže byť infekcia HBV trvalo eradikovaná (Hůlek a Urbánek 2018), tak sa umlčanie alebo vyčerpanie zásoby cccDNA v infikovaných hepatocytoch stalo novým cieľom v liečbe (Alexopoulou et al. 2020, Lee et al. 2020).

Cielená mutagenéza vyvolala v posledných rokoch značný záujem. Na experimentálnych modeloch sa skúmajú enzýmy štiepiace DNA, ktoré sa špecificky zameriavajú na cccDNA. Bolo vyvinutých mnoho malých molekúl ako sekvenčne špecifické RNA riadené nukleázy (RGN) a proteíny, ktoré môžu potenciálne blokovat' tvorbu, zvyšovat' deštrukciu a stíšiť transkripciu cccDNA pri stimulácii bunkového delenia (Lee et al. 2020, Alexopoulou et al. 2020, Cornberg et al. 2019). Rodina RGN zahŕňa nukleázy so zinkovým prstom (ZFN), transkripčné aktivátorové efektorové nukleázy (TALENs) a pravidelne rozmiestnené krátke palindromické opakovania (CRISPR) so systémami spojenými s CRISPR (Cas), pričom všetky vykazujú antivírusovú

účinnosť (Alexopoulou et al. 2020, Cornberg et al. 2019, Lee et al. 2020). Avšak predtým, ako budú môcť byť skúmané v pokusoch na ľuďoch, bude potrebné vyriešiť problémy s distribúciou a vyhnúti sa nechceným mimotelovým účinkom, vrátane chromozomálnej rekombinácie, týchto techník úpravy génov (Cornberg et al. 2019).

Okrem deštrukcie a poškodenia cccDNA je tiež možné blokovať jej transkripčnú aktivitu a zastaviť expresiu vírusových proteínov (Cornberg et al. 2019). Epigenetická modifikácia histónovou modifikáciou a metyláciou cccDNA môže modifikovať aktívne transkribovanú DNA do transkripčne neaktívneho stavu bez zmeny nukleotidovej sekvencie (teda bez zmeny samotnej DNA) (Alexopoulou et al. 2020, Lee et al. 2020). Konkrétnejšie, domény viažuce DNA vedú epigenetické efektory k preddefinovaným sekvenciám cccDNA, aby došlo k týmto cieleným modifikáciám. Modifikácia histónu a metylácia cccDNA môžu vyvolať epigenetické zmeny priamym ovplyvnením cccDNA, alebo zodpovedajúcich histónových proteínov. Acetylácia alebo deacetylácia histónov, metylácia alebo demetylácia histónov, metylácia cccDNA a acetylácia minichromozómov cccDNA predstavujú potenciálne epigenetické modifikácie. Medzi potenciálne modifikátory HBV DNA patria histón acetyltransferázy / deacetylázy (HAT / HDAC), lyzín metyltransferázy, proteín arginín metyltransferázy a DNA metyltransferázy (DNMT), ktoré pôsobia v spolupráci s vírusovými faktormi, ako sú HBx a HBcAg (Alexopoulou et al. 2020).

V kultivovaných hepatocytoch sa preukázalo, že niektoré cytokíny (IFN- $\alpha$ , agonisti receptora lymfotóxiínu- $\beta$ , IFN- $\gamma$  a tumor nekrotizujúci faktor- $\alpha$ ) modulujú cesty vedúce k zvýšenej regulácii APOBEC3A / B deamináz, ktoré zase indukujú necytolytickú, čiastočnú degradáciu cccDNA. V súčasnosti sa skúma objav malých molekúl, ktoré sú schopné inhibovať tvorbu cccDNA alebo destabilizovať už zavedenú cccDNA. Nedávno sa uviedlo, že zlúčenina znižuje množstvo cccDNA v kultúre hepatocytov a predklinických myších modeloch (Cornberg et al. 2019). V predklinických modeloch sa preukázalo, že IFN- $\alpha$  znižuje transkripciu cccDNA prostredníctvom epigenetických modifikácií (Cornberg et al. 2019).

Naviac je dlho známe, že HBx je nevyhnutný pre transkripciu cccDNA (Cornberg et al. 2019, Alexopoulou et al. 2020) a replikáciu vírusu, degradáciou Smc5 / 6, ktorá pôsobí ako reštrikčný faktor. V tomto ohľade predstavuje HBx dostatočne primeraný cieľ, ktorého interferencia môže zabrániť ďalším interakciám medzi HBx a bunkovými interakciami súvisiacimi s vírusom (Alexopoulou et al. 2020). Nedávno sa tiež ukázalo, že **pevonedistat**, inhibitor enzýmu aktivujúci NEDD8, obnovil hladiny proteínu Smc5 / 6 a potlačil vírusovú transkripciu a produkciu proteínov v kultivovaných hepatocytoch. Navyše, tiazolidové antiinfekčné činidlo **nitazoxanid**, ktoré bolo schválené FDA pre protozoálnu enteritídu, účinne inhibuje interakciu proteínu HBx - DDB1,

obnovuje hladiny proteínu Smc5 a potláča transkripciu a produkciu vírusových proteínov v rovnakých modeloch bunkových kultúr (Cornberg et al. 2019).

Čo sa týka nových, prvých destabilizátorov molekuly cccDNA v triede **ccc\_R08**, zameraných na už existujúce zásobníky vírusového genómu, tak táto malá molekula preukázala silnú a trvalú supresiu hladín HBsAg, HBeAg, HBV DNA a HBV RNA v sére. Navyše preukázala aj zníženie hladín cccDNA v pečeni experimentálneho transdukovaného myšacieho modelu cirkulárnou DNA schopnou replikovať HBV pomocou cccDNA podobným mechanizmom, aký sa pozoruje u ľudí (Alexopoulou et al. 2020). Potenciálne inhibítory cccDNA, ako sú napríklad priame editory génov, epigenetické modifikátory a destabilizátory DNA sú síce vo vývoji, ale musia sa ešte vyhodnotiť v klinických štúdiách (Lee et al. 2020).

#### 4.3.4 Inhibícia génovej expresie

Inhibítory génovej expresie na báze oligonukleotidov sú buď jednovláknové molekuly podobné DNA, alebo dvojvláknové malé interferujúce RNA (siRNA). Jednovláknové oligonukleotidy pracujúce prostredníctvom degradácie mRNA sprostredkovanvej RNázou-H, môžu blokovať expresiu vírusových proteínov a inhibovať vírusovú replikáciu. Dodanie sa môže dosiahnuť napríklad konjugáciou jednovláknových oligonukleotidov na skupiny N-acetyl galaktozamínu (GalNAc). Rôzne jednovláknové oligonukleotidy sú ale vo vývoji. Môže byť tiež navrhnutá malá interferujúca RNA (siRNA), ktorá zameriava akýkoľvek vírusový transkript a indukuje jeho degradáciu komplexom RISC / Ago2 (argonaute 2), čo vedie k umlčaniu génov (Cornberg et al. 2019). RNA interferencia (RNAi) môže priamo zacieliť transkripty HBV a indukovať ich degradáciu. RNAi je vysoko špecifická a efektívna metóda post-transkripčného tlmenia génov. Syntetická malá interferujúca RNA (siRNA) interferuje s expresiou špecifického cieľového génu, degradáciou mRNA. Na rozdiel od terapie NA, siRNA vypína produkciu HBsAg a môže viesť k obnoveniu imunitnej odpovede prostredníctvom rýchleho zníženia HBsAg a porušenia imunitnej tolerancie (Lee et al. 2020). SiRNA boli navrhnuté tak, aby cielili na 3' spoločné konce všetkých prepisov z cccDNA. Rôzne zlúčeniny siRNA sú ale v predklinickom a klinickom vývoji. Nedávno sa ukázalo, že malé molekuly patriace do série dihydrochinolizinónov indukujú degradáciu HBs mRNA zameraním na post-transkripčný regulačný prvok, čo vedie k redukcii vírusových antigénov aj vírusovej DNA in vitro a v predklinickom myšom modeli (Cornberg et al. 2019).

**ARC-520** preukázateľne znížila hladiny HbsAg u pacientov predtým liečených NA. Modifikovaná RNAi, **JNJ-3989** (predtým **ARO-HBV**), obsahuje dve RNAi, ktoré sú obidve konjugované s N-acetyl galaktozamínom na uľahčenie absorpcie pečeňou. ARO-HBV indukoval rýchly pokles HBV DNA a HBsAg u pacientov s CHB. Medzi ďalšie patria **IONIS-HBVRx** a **IONIS-HBVLRx**, ktoré umožňujú dodávanie antisense molekúl do pečene prostredníctvom

asialoglykoproteínu exprimovaného hepatocytmi. Tento prístup môže znížiť necielenú toxicitu spojenú s antisense oligonukleotidmi (Lee et al. 2020).

#### 4.3.5 Zacielenie na RNázu H

PgRNA, ktorá je zabalená v jadrových časticiach je templátom pre syntézu záporného reťazca DNA reverznou transkripciou. V tomto procese sa pgRNA templát odbúrava doménou RNázy H polymerázy. Inhibítory aktivity RNázy tomu zabráni a navyše zabráni následnej syntéze pozitívneho reťazca DNA (Alexopoulou et al. 2020). Nedávno bolo identifikovaných množstvo chemických tried potenciálnych inhibítorov RNázy H vrátane  **$\alpha$ -hydroxytropolónov**, **N-hydroxyizochinolíndiónov** a **N-hydroxylpyridíndiónov**. To otvára možnosť ich použitia, buď samostatne, alebo pravdepodobnejšie v kombinácii s inými existujúcimi DAA alebo novými, ktoré sa môžu vyvinúť (Alexopoulou et al. 2020).

#### 4.3.6 Inhibítory zostavy nukleokapsidu a základné inhibítory

Jadrový proteín HBV je nevyhnutný na balenie HBV pgRNA a reverznú transkripciu. Niekoľko zlúčenín označovaných ako alosterické modulátory jadrového proteínu CpAMs (v literatúre tiež známe ako modulátory zostavenia nukleokapsidov) sú predmetom skúmania.

V závislosti na chemickej štruktúre CpAM môžu vznikať nestabilné aberantné kapsidy alebo prázdne kapsidy. Na základe mechanizmu účinku boli identifikované dve triedy CpAM. CpAM triedy I, heteroaryldihydropyrimidíny (HAP) a CpAM triedy II, ktoré sú typické pre fenypropenamidy (PPA). CpAM triedy I urýchľujú tvorbu zostavenia kapsidov a vedú k tvorbe nesprávne zostavených kapsidov (Lee et al. 2020). CpAM typu II urýchľujú tvorbu zostavenia kapsidy, pravdepodobne v nevhodnom čase a mieste, čím zabraňujú zabaleniu pgRNA a namiesto toho indukujú zhromažďovanie prázdnych kapsidov, ktoré neobsahujú vírusovú pgRNA ani HBV polymerázu (Alexopoulou et al. 2020, Lee et al. 2020).

HAP deriváty, nesprávne smerujú diméry jadrového proteínu na zostavenie aberantných nekapsidových polymérov, čo vedie k degradácii jadrového proteínu. **GLS4** je reprezentatívna zlúčenina z rodiny HAP. In vitro GLS4 inhiboval akumuláciu vírusu v supernatante pečenej bunkových línií. Toto sa testovalo aj in vivo na myšiach inokulovaných bunkami HepAD38, ktoré potom vyrastali ako nádory, čo viedlo k virémii. Liečba myši GLS4 a **BAY 41-4109** spôsobila silný a trvalý pokles HBV DNA v približne rovnakom rozsahu počas liečby aj po liečbe.

Perorálna molekula jadrového inhibítora typu I, **RO7049389**, indukuje tvorbu abnormálnych agregátov jadrového proteínu HBV, ktoré sú potom vyčerpané, čo vedie k narušeniu zhromažďovania vírusov a k silnej inhibícii replikácie HBV. In vivo indukoval silný pokles HBV DNA okolo 3,0 log 10 kópií / ml počas 56 dní podávania. Prebiehajúca štúdia fázy 1 skúma bezpečnosť, znášateľnosť, farmakokinetiku a anti-HBV aktivitu tejto zlúčeniny.



Je zaujímavé, že štúdie na viacerých experimentálnych modeloch in vitro a in vivo HBV zistili, že jadrový inhibítor typu I **HAP\_R01** znížil hladiny HBV DNA a HBeAg tým, že spôsobil nesprávnu montáž jeho 22 kDa prejadrového proteínového prekursora. Zdá sa, že HAP\_R01, rovnako ako ďalšie podobné CpAM, majú potenciál dosiahnuť vyššie hodnoty anti-HBe sérokonverzie ako v súčasnosti schválené terapie pre pacientov s CHB (Alexopoulou et al. 2020).

#### 4.3.7 Inhibítory uvoľňovania HBsAg

Najhojnejším vírusovým antigénom v krvi je HBsAg, ktorý zohráva dôležitú úlohu pri prevencii imunitnej kontroly HBV (Lee et al. 2020). Už dávnejšie sa zistilo, že veľké množstvo vírusových proteínov, najmä HBsAg, sa vylučuje z hepatocytov, ktoré nie sú spojené s viriónmi (Arends et al. 2017). Cirkulujúci HBsAg sa takmer stále nachádza vo forme neinfekčných SVP. Pretože sa tieto častice tvoria nezávisle od vírusovej replikácie, vírusový antigén je ťažké zacieliť pomocou súčasných schválených terapií (Lee et al. 2020). Avšak, zlúčeniny, ktoré pôsobia na HBsAg, sú obzvlášť zaujímavé, pretože majú tiež potenciál pre priamu aktivitu proti vírusu (Block et al. 2015).

Polyméry nukleovej kyseliny (NAP) používajú fosforotioované oligonukleotidy na zameranie apolipoproteínových interakcií podieľajúcich sa na zhromažďovaní a uvoľňovaní HBV subvírusových častíc (SVP), ktoré sú tvorené HBsAg. Pracujú nezávisle na sekvencii a blokujú tvorbu SVP vo vnútri infikovaných hepatocytov a ich následnú sekréciu. Pretože SVP tvoria viac ako 99,99% HBsAg v krvi, NAP predstavujú účinný prostriedok na vylučovanie HBsAg zo séra pacientov s CHB (Alexopoulou et al. 2020). Boli vyvinuté inhibítory uvoľňovania HBsAg napr. **REP 2139** a **REP 2165**, ktoré sa javia ako účinné pri prevencii uvoľňovania HBsAg u ľudí, a tým znižujú hladiny HBsAg v sére a tiež potenciálne podporujú sérokonverziu povrchových protilátok (Arends et al. 2017).

REP 2139, blokuje uvoľňovanie HBsAg z infekčných hepatocytov selektívnym zameraním sa na montáž a/alebo sekréciu SVP. REP 2139 prirodzene vstupuje do pečefných buniek (hepatocytov), kde zabraňuje zhromaždeniu SVP v ktoromkoľvek hepatocyte produkujúcom tieto častice. Tento mechanizmus účinne bráni dopĺňaniu HBsAg v krvi a znižuje hladiny HBsAg v hepatocytoch. Celkový antivírusový účinok REP 2139 umožňuje telu vyčistiť HBsAg a tým znížiť alebo odstrániť inhibíciu imunitnej kontroly spôsobenej týmto vírusovým antigénom.

Súčasná formulácia REP 2139 (**REP 2139- Mg**) indukuje mierne až žiadne vedľajšie účinky a zvyčajne sa podáva raz týždenne počas 48 týždňov intravenóznou infúziou v kombinácii s inými antivírusovými látkami. Okrem toho sa očakáva, že REP 2139-Mg bude rovnako účinný pri podávaní jedenkrát týždenne subkutánnou injekciou, čo je režim, ktorý sa bude používať v budúcich štúdiách (Lee et al. 2020).

HBsAg má dôležité imunopresívne účinky na infekciu HBV o ktorých sa preukázalo, že blokujú adaptívne aj vrodené imunitné mechanizmy. Eliminácia HBsAg zo séra pacientov

odstraňuje tento imunosupresívny účinok, čím prekonáva vyčerpanie T-buniek. Ďalším dôležitým účinkom odstránenia HBsAg zo séra je teda zosilnenie účinku PEG-IFN- $\alpha$  (Alexopoulou et al. 2020). Nedávno sa bezpečnosť a účinnosť pridania REP 2139 Mg alebo REP 2165 Mg do TDF a PEG-IFN skúmala v otvorenej, randomizovanej štúdii fázy II u HBeAg negatívnych pacientov s CHB. Po 48-týždňovej liečbe boli hladiny HBsAg  $\leq 0,05$  IU/ml u 60% (24/40) pacientov. Počas ďalších 48 týždňov následného vyšetrenia bez liečby pretrvávala virologická kontrola u 32,5% (13/40) pacientov. U pacientov s pretrvávajúcou sérokonverziou HBsAg sa funkčná liečba udržala u 35% (14/40). Podávanie inhibítorov uvoľňovania HBsAg spolu s imunitnými modulátormi tak môže byť účinným kombinovaným režimom (Lee et al. 2020).

To, či tieto zlúčeniny môžu spôsobiť škodlivú intrahepatocytovú akumuláciu HBsAg je ešte potrebné určiť (Arends et al. 2017). Aj keď sa preukázalo, že napr. **REP 2139-Ca** je pre ľudí bezpečný, hromadí sa v pečeni pri opakovanom podávaní. REP 2165 je verzia REP 2139, ktorá je navrhnutá tak, aby mala nižšiu akumuláciu v pečeni pri zachovaní neporušenej antivírusovej aktivity. Ukázalo sa, že antivírusová účinnosť REP 2165 je v predklinickom modeli infekcie HBV porovnateľná s REP 2139 s významne menšou akumuláciou v pečeni. Očakáva sa, že REP 2165 bude mať porovnateľnú antivírusovú účinnosť u ľudí so zníženou akumuláciou v pečeni počas liečby (Alexopoulou et al. 2020).

### **4.3.8 Imunoterapia**

#### **4.3.8.1 Agonisti TLR**

Toll-like receptor (TLR) -7 je „receptor rozpoznávajúci patogény“ exprimovaný väčšinou v lyzozomálnych / endozomálnych kompartmentoch plazmacytoidných dendritických buniek a B-lymfocytoch, ktorý rozpoznáva vzory vo vírusovej jednovláknovej RNA. Existuje čoraz viac dôkazov, že aktivácia receptora na rozpoznávanie vzorov môže priamo potlačiť HBV v infikovaných bunkách (Block et al. 2015). Lee et al. (2020) uviedli, že TLR sú počiatočnými senzormi vírusovej infekcie a iniciujú intracelulárne cesty, ktoré indukujú produkciu antivírusových mediátorov. Aktivácia dráh sprostredkovaných TLR vedie k potlačeniu replikácie HBV a obnoveniu adaptívnej imunity špecifickej pre HBV.

Block et al. (2015) uviedli, že malá molekula **GS-9620 (vesatolimod)** je agonista TLR-7 v klinickom vývoji. Boli hlásené štúdie bezpečnosti fázy 1b, ktoré preukázali, že liek je bezpečný a dosiahol očakávanú indukciu génov stimulovanú interferónom v periférnych krvných bunkách. GS-9620 mal významnú aktivitu vo svišťoch a šimpanzoch a mohol by byť "prvý v triede", ktorý by ukázal, že farmakologická aktivácia receptora na rozpoznávanie vzorov môže mať klinický prínos pri riadení chronickej infekcie HBV. V jednej dvojito zaslepenej randomizovanej placebom kontrolovanej štúdii fázy II dostávali pacienti perorálny vesatolimod raz týždenne alebo placebo. Vesatolimod indukoval HBV špecifickú imunitnú odpoveď, ale bez významného poklesu HBsAg.

Agonista TLR-8 **GS-9688 (selgantolimod)** je teraz v štúdií fázy II. Selgantolimod (1,5 mg alebo 3 mg jedenkrát denne) sa podával s liečbou NA počas 24 týždňov, po ktorých nasledovala samotná liečba NA počas 24 týždňov. Strata HBsAg sa dosiahla u 5% (2/39) pacientov a u 16% (3/19) pacientov, ktorí boli HBeAg pozitívni. Ďalšia štúdia, ktorá testovala selgantolimod plus TAF oproti placebo plus TAF u viremických pacientov s CHB, ukázala, že selgantolimod je bezpečný a dobre tolerovaný, s poklesom hladín HBsAg na  $\geq 0,3 \log_{10}$  IU / ml v skupine so selgantolimodom plus TAF (Lee et al. 2020).

#### **4.3.8.2 Agonisti RIG-I**

Replikácia HBV je potlačená aktiváciou indukovateľného génu I kyseliny retinovej (RIG-I), ktorý je stimulovaný dvojvláknovou RNA a doménou oligomerizácie viazanou nukleotidom obsahujúcou proteín 2 (NOD- 2) (Block et al. 2015).

RIG-I predstavuje intracytoplazmatický receptor PAMP interagujúci s vírusovou dvojvláknovou RNA pochádzajúcou z RNA vírusov. Po aktivácii vedie k signálnej transdukcii cez komplexy proteínkinázy a aktivácii transkripčných faktorov NF $\kappa$ B a IRF3, ktoré následne migrujú do jadra, kde aktivujú ISG, čo vedie k produkcii IFN- $\alpha$  a ďalších cytokínov, ktoré iniciujú antivírusovú imunitu. Nedávno sa zistilo, že  $\epsilon$  signál na zabalenie prítomný v pgRNA bol rozpoznávaný RIG-I, čo viedlo skôr k produkcii IFN typu III ako k typu I. Okrem toho sa zistilo, že RIG-I pôsobil proti interakcii epsilon s HBV polymerázou spôsobujúcou potlačenie replikácie HBV. **Inarigivir (SB 9200)**, agonista RIG-I / NOD-2, bol skúmaný v štúdií hodnotiacej bezpečnosť, farmakokinetiku a antivírusovú účinnosť u jedincov infikovaných chronickou HBV, do ktorej bolo zaradených 80 predtým neliečených pacientov bez cirhózy s CHB. Pacienti boli randomizovaní tak, aby dostávali stúpajúce dávky liečiva od 25 do 200 mg alebo placebo po dobu 12 týždňov po ktorých nasledoval prechod na TDF na ďalších 12 týždňov. Redukcie HBV DNA a RNA sa dosiahli u HBeAg pozitívnych aj negatívnych pacientov spôsobom závislým od dávky, čo bolo väčšie u pacientov s HBeAg. Zníženie HBsAg o  $> 0,5 \log_{10}$  po 12 alebo 24 týždňoch sa pozorovalo u 22% pacientov. V súčasnosti prebiehajú ďalšie štúdie inarigiviru v dávke 400 mg s TDF (Alexopoulou et al. 2020). Látky, ktoré môžu aktivovať RIG-I, by mohli poskytnúť nový prístup (Block et al. 2015).

#### **4.3.8.3 Agonisti STING**

Stimulátor interferónových génov (STING) je hlavná molekula zapojená do signálnej transdukcii po rozpoznaní DNA intracelulárneho patogénu, ako je cyklická GMP-AMP syntáza (cGAS, cyclic guanosine monophosphate–adenosine monophosphate synthase). Použitím syntetických agonistov na aktiváciu dráhy cGAS-STING sa ukázalo, že produkcia IFN bola indukovaná na myšom modeli trvalo infikovanom HBV, čo viedlo k inhibícii replikácie HBV. Títo agonisti môžu ponúknuť ďalšiu cestu k pokroku pri vrodenej imunoterapii (Alexopoulou et

al. 2020). STING je adaptorový polypeptid pre niekoľko cytoplazmatických receptorov na snímanie DNA, ako aj bakteriálny cyklický di-nukleotid, druhý posol a intracelulárny regulátor vrodenej imunitnej odpovedi. Stimulácia STING flavonoidmi s malou molekulou účinne potlačila replikáciu HBV v hepatocytoch myši. Preukázalo sa, že stimulácia STING indukovala hlavne odpoveď IFN typu 1, na rozdiel od agonistu TLR, ktorý indukoval zápalovú cytokínovú odpoveď. Dôležité je, že po menej ako 24 h infekcie znížili agonisti STING množstvo HBV DNA v krvi infikovaných myši (model hydrodynamickej injekcie do chvostovej žily) (Block et al. 2015).

#### **4.3.8.4 Inhibítory kontrolných bodov PD1**

Nedávny pokrok v pochopení imunitného vyčerpania vytvára novú nádej pre imunologické alebo hostiteľské terapeutické stratégie. Dnes sú už lepšie pochopené mechanizmy, ktorými sa niektoré vírusové antigény pri chronickej infekcii prezentujú imunitnému systému, čo môže viesť k zlyhaniu imunitného systému na odstránenie vírusu. V súčasnosti existuje niekoľko známych ciest, ktoré vedú k vyčerpaniu T-buniek. Tieto cesty by mohli byť zablokované, aby sa reakcie T-buniek zlepšili (Block et al. 2015).

Účinnosť zamerania sa na inhibítory kontrolných bodov, ako je programovaný proteín bunkovej smrti 1 (PD-1) a programovaný ligand smrti 1 (PD-L1) sa preukázala obnovením silných imunitných reakcií u pacientov s malignitami. Existujú však obavy z indukcie autoimunity alebo vzplanutia hepatitídy, prostredníctvom nešpecifickej aktivácie imunitného systému. Anti-PD-L1 môže byť terapeutickým kandidátom u pacientov s CHB, pretože sa predpokladá obnovenie funkcií antivírusových T-buniek. Ukázalo sa, že blokáda dráhy PD-1 / PD-L1 v T-bunkách CD8 v kombinácii s liečením **entekavirom** a DNA vakcináciou zvyšuje funkciu T-buniek špecifických pre vírus. Pilotná štúdia fázy I hodnotila liečbu anti-PD-1 (**nivolumab**) s alebo bez **GS-4774** (terapeutická vakcína) u HBeAg-negatívnych pacientov s CHB. V 24. týždni malo 14% (3/22) pacientov zníženie hladín HBsAg o  $> 0,5 \log_{10}$  (Lee et al. 2020).

Okrem iného je tiež zaujímavé, že Flap endonukleáza 1 (FEN1) môže opraviť HBV rcDNA na HBV cccDNA, ktorá podporuje replikáciu HBV DNA, zatiaľ čo jej špecifické regulačné podrobnosti zostávajú nejasné (Ji et al. 2020). Okrem toho miR-146a úzko súvisí s reguláciou v replikácii HBV (Ji et al. 2020). Nedávno sa zistilo, že expresia miR-146a pozitívne koreluje s úrovňami replikácie HBV. Regulačný vzťah medzi miR-146a a replikáciou HBV je však stále nejasný. Nadmerná expresia miR-146a alebo odbúranie ZEB2 však podporili replikáciu a expresiu HBV, zatiaľ čo zníženie regulácie miR-146a alebo nadmerná expresia ZEB2 potlačila replikáciu a expresiu HBV. Okrem toho sa preukázalo, že miR-146a priamo cieľi na ZEB2 (Wang a Li 2018). ZEB2 je proteín, ktorý funguje ako transkripčný faktor alebo represor pre niekoľko signálnych dráh. ZEB2 sa môže viazať na jadrový promótor HBV a inhibovať jeho promótorovú

aktivitu, čo vedie k inhibícii replikujúcich medziproduktov HBV DNA, 3,5 kb mRNA, hladín základného proteínu a sekrécii HBsAg a HBeAg (He et al. 2016). Tieto najnovšie údaje tak môžu napomôcť k vývoju nových antivírusových stratégií (He et al. 2016).

#### 4.4 Liečba hepatitídy C

Schopnosť účinne liečiť infekciu HCV bola veľkým úspechom, nakoľko sa udáva, že ide o infekciu takmer úplne liečiteľnú, kedy dochádza k úplnej eliminácii vírusu z organizmu. Problémom je ale fakt, že stále pribúdajú dôkazy o tom, že HCV môže zanechať trvalé následky na hostiteľovi po infikovaní, kedy aj pri odstránení etiologického agens dochádza k významnej regresii fibrózy a cirhózy pečene (Duncan et al. 2020, Hůlek a Urbánek 2018). Existujú štúdie kde bol hlásený pretrvávajúci hyperfunkčný fenotyp CD8 + T buniek po úspešnej liečbe DAA, čo naznačuje pokračujúce imunologické poškodenie a tiež správy o riziku hepatocelulárneho karcinómu po klírense vírusu (Duncan et al. 2020).

Pri liečbe akútnej vírusovej hepatitídy C, vzhľadom na riziko vzniku chronického ochorenia a mieru odpovede na liečbu po zistení choroby je veľmi dôležité zvážiť včasnú liečbu tejto infekcie skôr, ako prejde do chronického štádia (Palumbo 2011). V prípade ak k takémuto chronickému štádiu dôjde, tak rozhodnutie o liečbe pacientov s CHC infekciou závisí od viacerých parametrov (Palumbo 2011). U každého jedného pacienta je potrebné vziať do úvahy výsledky virologického vyšetrenia, kde sa kvalitatívne pomocou PCR zisťuje HCV RNA (Glasa et al. 2004). Pred liečbou by sa mal systematicky určovať genotyp HCV (1 – 6), nakoľko voľba konkrétneho liečebného režimu a dĺžka podávania sa riadi predovšetkým genotypom a niekedy aj subtypom vírusu (Palumbo 2011, Hůlek a Urbánek 2018, Glasa et al. 2004). Ďalej je to určenie miery replikácie vírusu resp. „nálož vírusu“ – kvantitatívne metódou PCR (Glasa et al. 2004). Dôležité je taktiež určiť štádium postihnutia či už ide o cirhózu alebo fibrózu pečene (Hůlek a Urbánek 2018, Palumbo 2011). Aktivita chronickej hepatitídy C, teda miera nekroinflamačného procesu v pečeni je odhadovaná z biochemických výsledkov pečenej testov (napr. miera sérovej alaninaminotransferázy ale aj iné), prípadne sa zisťuje pomocou histomorfologického vyšetrenia z punkčátu pečene (Glasa et al. 2004). Určenie bodu vývoja pečenej cirhózy je veľmi dôležité, nakoľko pri prekročení určitého vývojového bodu cirhózy pečene už nedochádza k zlepšeniu a pri určitých hodnotách sa už najskôr pristupuje k transplantácii pečene a až potom k následnej protivírusovej liečbe (Hůlek a Urbánek 2018).

Okrem tohto všetkého sa musí zvážiť aj celkový zdravotný stav pacienta, napríklad to či netrpí prípadne aj inými ochoreniami a podobne. Do úvahy sa tiež berie efektívnosť prípadnej, predtým absolvovanej liečby a prítomné kontraindikácie. Po celom takomto procese sa pristupuje k výberu vhodného, pre pacienta bezpečného liečebného postupu, nastaví sa dávkovanie a odhadne sa približná dĺžka liečby. Pacient je počas liečby naďalej monitorovaný kvôli efektívnosti liečby a prípadným možným vznikom komplikácií (Glasa et al. 2004).

Cieľovým ukazovateľom účinnosti liečby hepatitídou C je „trvalá virologická odpoveď“ (SVR), definovaná absenciou detekovateľného množstva HCV RNA v sére hodnotená pomocou testu HCV RNA (Palumbo 2011). Eliminovanie HCV je teda charakteristické vymiznutím alebo znížením HCV RNA a taktiež aj normalizáciou hodnôt pečeňových testov, ako dôkaz zníženej aktivity chronickej hepatitídy C. Toto všetko má hlavne za cieľ spomaliť rozvoj ochorenia tak, aby nedošlo k prípadnej fibróze, cirhóze pečene či HCC. Ideálne by mala liečba zlepšiť symptómy ochorenia a zabrániť prípadným komplikáciám spojených s chronickou hepatitídou C (Glasa et al. 2004).

Až donedávna bola štandardná liečba založená na kombinácii PEG-IFN- $\alpha$  a RBV (Fénéant et al. 2014, Wahid 2020, Do a Reau 2020). Prvá správa o interferónovej liečbe desiatich pacientov s hepatitídou nonA-, non-B bola publikovaná už v roku 1986. Terapia bola schválená v roku 1990, avšak ukázalo sa, že monoterapia IFN nebola veľmi efektívna. Terapia na báze IFN sa zlepšila pridaním RBV v roku 1998 a následne použitím PEG-IFN v roku 2002. Tieto optimalizované terapeutické režimy boli schopné vyliečiť približne 50% pacientov infikovaných gt 1, 4, 5, 6 a 90% pacientov s gt 2, 3. Avšak pacienti sa stretli s vážnymi vedľajšími účinkami, vrátane príznakov podobných chrípke, depresii a anémii, ktoré v mnohých prípadoch vyústili až do nutnosti prerušenia liečby (Lohmann 2019). CHC sa dlho vnímala ako chronická infekcia len s miernou mierou vyliečenia (SVR do 63%) s terapiami na báze IFN (Do a Reau 2020). Takáto v minulosti používaná liečba IFN, bola spojená nie len so zlou účinnosťou u veľkej časti populácie infikovanej HCV, obmedzenou rezistenciou voči liekom, toxicitou a vysokými nákladmi, ale navyše nebola účinná pre všetky genotypy HCV (Fénéant et al. 2014, Wahid 2020, Do a Reau 2020). Z týchto dôvodov iniciovali výskumníci a farmaceutický priemysel intenzívne úsilie o vývoj účinnejších a selektívnejších liečiv s menšími vedľajšími účinkami (Lohmann 2019). Z vírusových hepatitíd nikto nevidel toľko transformácií dostupných možností farmakologickej liečby ako v prípade chronickej HCV (Do a Reau 2020).

Vývoj dvoch odlišných skupín antivírusových látok proti hepatitíde C, DAA a HTA, zreteľne ovplyvnil možnosti liečby HCV, generovaním vyšších mier trvalej virologickej odpovede (SVR) v rámci infikovaných pacientov, znížením nežiaducich vedľajších účinkov a trvania liečby v porovnaní so starým štandardom starostlivosti (Baugh et al. 2013).

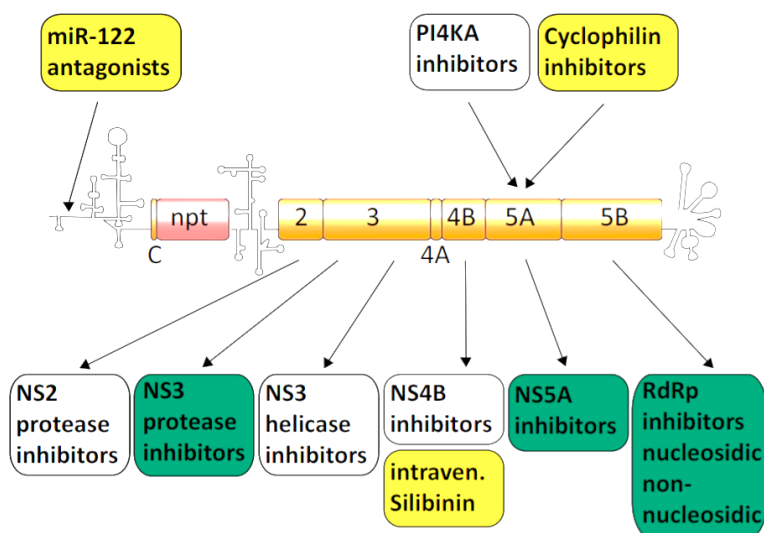
V poslednom desaťročí nastalo množstvo zmien v schopnosti identifikovať, diagnostikovať a zvládať chronickú infekciu HCV a komplikácie s ňou spojené, najmä rozvojom DAA (Do a Reau 2020, Fénéant et al. 2014). Nedávny vývoj liečby DAA bez IFN (tzv. interferon-free therapy) je schopný dosiahnuť SVR u približne 95% pacientov (Wahid 2020, Do a Reau 2020).

V porovnaní s touto triedou zlúčenín, boli vtedajšie HTA o niečo menej účinné, vďaka skutočnosti, že primárne liečebné režimy pre HCV sa začali použitím HTA - IFN- $\alpha$ . Zlúčenina bola výhodná v tom, že poskytovala rozsiahlu antivírusovú reakciu, avšak škodlivé vedľajšie účinky na pacientov a odolnosť vírusov odvtedy spôsobili, že zlúčenina bola zastaraná. Výskum

HTA sa ale odvtedy posunul ďalej a zameril sa na množstvo bunkových hostiteľských faktorov, ktoré sú potrebné pre vstup a replikáciu vírusu HCV (Baugh et al. 2013).

#### 4.4.1 Priamo pôsobiace antivirotiká

V roku 2011 boli vyvinuté nové lieky s názvom priamo pôsobiace antivirotiká (DAA), ktoré predstavovali významný pokrok v liečbe HCV v zmysle miery trvalej virologickej odpovede (SVR), dosahujúcou hodnoty vyše 90 % pri väčšine genotypov a obmedzením nepriaznivých účinkov (Geddawy et al. 2017). K vynájdeniu týchto DAA napomohli zlepšené poznatky o replikačnom cykle HCV, najmä o úlohe neštruktúrálnych proteínov (NS) HCV (viď kapitolu 3.8.1). Konkrétne ide o proteíny (NS3 / 4A, NS5A a NS5B), ktoré sú nevyhnutné pri replikácii vírusu (Geddawy et al. 2017, Spengler 2018).



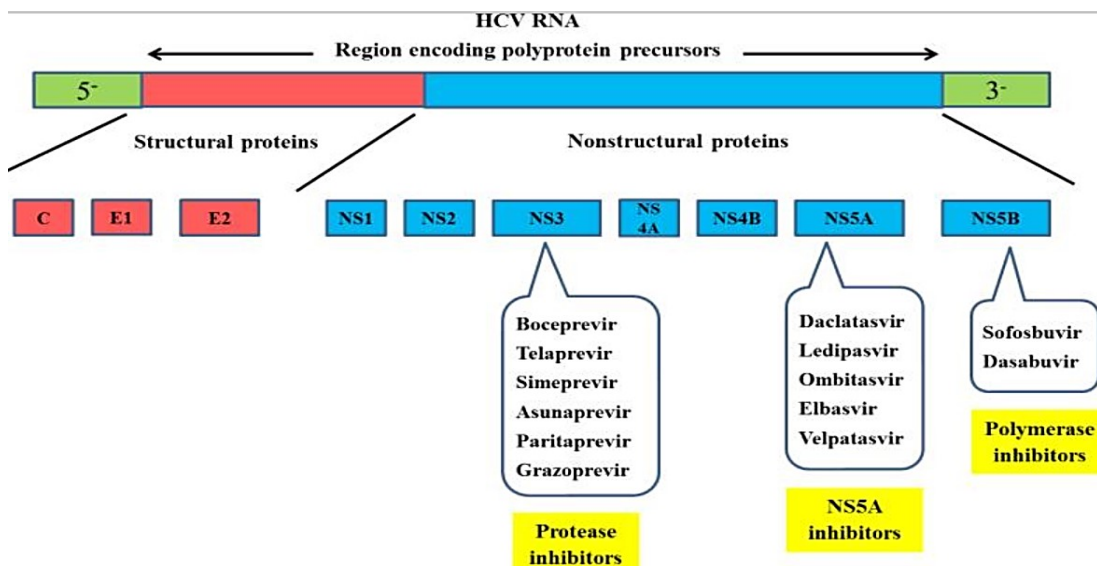
*Obr. 13 Schematické znázornenie subgenomického selektívneho replikónu a cieľov pre antivírusovú terapiu. Triedy liekov schválených na liečbu sú uvedené v zelených rámečkoch, triedy liekov s klinickým dôkazom koncepcie sú v žltých rámečkoch a triedy zlúčenín iba s predklinickými kandidátmi v bielych rámečkoch. Nad replikónom sú antivirotiká zamerané na hostiteľa, pod replikónom priamo pôsobiace antivirotiká. (Prevzaté od: Lohmann 2019).*

Mechanizmus ich účinku spočíva v inhibícii týchto neštruktúrálnych proteínov (NS) (Geddawy et al. 2017, Spengler 2018). Podľa cieľových miest pôsobenia existujú 3 hlavné triedy DAA proti HCV: inhibítory proteázy NS3 / NS4A, inhibítory komplexu NS5A a inhibítory polymerázy NS5B, ktoré sa ďalej delia na nukleozidové / nukleotidové (NI) a nenukleozidové / nenukleotidové (NNI) inhibítory (Spengler 2018, Geddawy et al. 2017). Menej pozornosti sa venovalo bunkovým proteínom podieľajúcim sa na IRES sprostredkovanej translácii a NS2-NS3 proteáze. Pre NS2-NS3 bolo náročné vyvinúť biochemické testy a kryštalická štruktúra pre formu po štiepení bola vyriešená až v roku 2006. Nakoľko štiepenie NS2-NS3 je nevyhnutné na tvorbu replikázy HCV RNA, pričom zrelý NS2 je tiež potrebný na produkciu infekčného vírusu, tak by

mohol NS2 prinajmenšom v tejto koncepcii vytvoriť atraktívny antivírusový cieľ (Scheel a Rice 2013).

Všetky súčasné terapie sú založené na rôznych kombináciách týchto troch tried inhibítorov, a to kvôli obrovskej účinnosti týchto režimov. Toto bolo zrejmé už v roku 2014, keď klinické štúdie fázy 2 a 3 preukázali mieru vyliečenia vyššiu ako 90% po 12 týždňoch liečby gt 1 (Lohmann 2019). Navyše kombinácia DAA s PEG-IFN a RBV, zlepšila mieru trvalej virologickej odpovede v porovnaní so štandardnou liečbou. Avšak aj pri liečbe DAA v kombinácii s PEG-IFN a RBV je stále ťažké liečiť pacientov so slabou odpoveďou na IFN (tj. s nulovou odpoveďou). Okrem toho ako už bolo spomenuté, tak majú terapie založené na IFN radu závažných nepriaznivých účinkov (Liu et al. 2016b).

Terapia DAA bez IFN spôsobila revolúciu v antivírusovej liečbe pri hepatitíde C, nakoľko poskytuje vynikajúce šance na trvalú elimináciu HCV, a tak môže zabrániť progresii ochorenia pečene. Takéto terapie DAA bez IFN sú zvyčajne sprevádzané aj menším počtom nežiaducich účinkov a majú kratšiu dobu liečby ako terapie na báze IFN (Liu et al. 2016b, (Spengler 2018). Používanie IFN na liečbu HCV sa v podstate prestalo používať vo všetkých krajinách kde sú k dispozícii liečebné režimy DAA (Spengler 2018). Kombinovaná liečba DAA má síce potenciál na získanie globálnej kontroly nad hepatitídou C, avšak ľahký prístup k DAA, dostupnosť spoľahlivej diagnostiky HCV a dostupné náklady zostávajú stále dôležitými cieľmi, ktoré je potrebné dosiahnuť na globálnu elimináciu hepatitídy C (Spengler 2018). Tieto terapie totiž zostávajú stále pre väčšinu pacientov s HCV neprístupné (Eller et al. 2018).



Obr. 14 Proteíny kódované genómom vírusu hepatitídy C ako ciele pre priamo pôsobiace antivírusové látky (Prevzaté od: Geddawy et al. 2017)

V roku 2011 FDA schválila ako prvé DAA inhibítory vírusovej proteázy NS3/4A (-previr), **boceprevir a telaprevir**, ako doplnok k terapiám založeným na IFN v kombinácii s RBV, resp. vo forme „trojitej terapie“ u pacientov s chronickou infekciou HCV gt 1 (Geddawy et al. 2017, Lohmann 2019, Koh a Liang 2014). Neskôr v roku 2013 nasledovali inhibítory vírusovej



polymerázy (-buvir). Prvé inhibítory NS5A (-asvir) boli schválené v roku 2015 (Lohmann 2019). V januári 2016 FDA schválila kombináciu **elbasviru** a **grazopreviru** s alebo bez RBV pre liečbu pacientov s genotypom 4. Následne v júli 2016 bola schválená kombinácia **sofosbuviru** a **velparasviru** s alebo bez RBV na liečbu dospelých pacientov pri všetkých genotypoch (Geddawy et al. 2017).

Genotypy s najvyššou mierou odpovede na terapie založené na interferónoch, najmä gt 3, predstavovali najväčšiu výzvu v ére DAA, hlavne kvôli oneskorenej dostupnosti modelov bunkovej kultúry pre gt 3. Preto boli inhibítory prvej línie optimalizované hlavne smerom k dostupným modelom gt 1. Prvé pangentypové režimy s porovnateľnou účinnosťou boli napriek tomu k dispozícii až v roku 2016 (Lohmann 2019).

#### **4.4.1.1 Inhibítory proteázy NS3 / NS4**

Proteíny HCV NS3 a NS4 pôsobia spoločne ako serínové proteázy a štiepia HCV polyproteín na 4 miestach (Spengler 2018). Skupina inhibítorov NS3/4A zahŕňa napr. **boceprevir**, **telaprevir**, **simeprevir**, **asunaprevir**, **grazoprevir** a **paritaprevir** - posilnené ritonavírom. **Ritonavir** je inhibítor HIV proteázy a nemá priamu aktivitu proti HCV, ale pôsobí ako inhibítor CYP3A. Pridanie ritonaviru k režimu v nízkej dávke ako prostriedku na zlepšenie farmakokinetiky predlžuje polčas paritapreviru a umožňuje dávkovanie jedenkrát denne (Geddawy et al. 2017).

Táto prvá vlna proteázových inhibítorov mala kedysi nízku bariéru rezistencie a úzke genotypové spektrum, pokrývajúce hlavne gt 1. Kvôli vtedajšiemu nedostatku ďalších DAA sa totiž mohli používať iba v kombinácii s PEG-IFN a RBV (Lohmann 2019). Napriek tomu, použitie inhibítora proteázy vo forme tzv. „trojitej terapie“ výrazne zlepšilo mieru vyliečenia, najmä u pacientov s HCV gt 1 (ktorí sú najviac rezistentní na štandardnú liečbu) (Lohmann 2019, Fénéant et al. 2014) na približne 70% (Lohmann 2019, Koh a Liang 2014).

V súčasnosti sú **paritaprevir** a **grazoprevir** zahrnuté v kombinovaných terapiách založených na DAA pre pacientov s gt 1,4 a **voxilaprevir** a **glekaprevir** v režimoch pangentypovej liečby, ktoré poskytujú oveľa širšie pokrytie genotypov a vysoké bariéry rezistencie (Lohmann 2019).

#### **Simeprevir (SIM)**

Účinnosť simepreviru (SIM) bola hlásená proti HCV genotypom 1a a 1b. SIM preukázal vyššiu genetickú bariéru rezistencie v porovnaní so staršími generáciami proteázových inhibítorov, telapreviru a bocepreviru a taktiež preukázal svoju účinnosť u pacientov, ktorí neodpovedali na liečbu IFN-RBV. Po perorálnom podaní SIM dosiahne C<sub>max</sub> po 4-6 hodinách. SIM sa odporúča užívať s jedlom, pretože to môže zvýšiť jeho AUC o 60-70%. Je primárne metabolizovaný oxidačným metabolizmom prostredníctvom rodiny CYP3A. Z dôvodu intestinálnej inhibície CYP3A4 a P-glykoproteínu je nutné starostlivé sledovanie liekových interakcií. Klinicky významné liekové interakcie sú s antikonvulzívami, statínmi, makrolidovými antibiotikami, triazolovými antimykotikami, digoxínom, antiarytmikami ale aj ďalšími. 91%

liečiva sa nachádza vo výkaloch, zatiaľ čo menej ako 1% pôvodného liečiva sa nachádza v moči. (Geddawy et al. 2017).

#### **4.4.1.2 Inhibítory komplexu NS5A**

Replikácia HCV, ako aj translácia a spracovanie vírusových proteínov je hostená v špecifickej subcelulárnej štruktúre cytoplazmy nazývanej „membránová pavučina / sieť“, ktorá je vyvolaná infekciou HCV. NS5A proteín nemá enzymatickú aktivitu, ale je nevyhnutný pre tvorbu tejto membránovej siete, replikáciu HCV RNA a na montáž intaktných viriónov (Spengler 2018). Inhibítory NS5A, zahŕňajú **daklatasvir, ledipasvir, ombitasvir, elbasvir, velpatasvir** (Geddawy et al. 2017).

#### **Ledipasvir (LDV)**

LDV je inhibítor NS5A a v súčasnosti je dostupný ako kombinovaná tableta s fixnou dávkou ledipasvir / sofosbuvir pre hepatitídu C typu 1a, 1b. LDV preukázal účinnosť pri liečbe pacientov s HCV bez PEG-IFN alebo RBV. LDV prepadá neznámym mechanizmom oxidačného metabolizmu a vylučuje sa hlavne žľčovými cestami (86%), zatiaľ čo menej ako 1% močom. LDV preukázal vysokú účinnosť v kombinácii so SOF s RBV alebo bez neho pri liečbe pacientov s HCV gt 1. Súčasné odporúčanie pre použitie LDV naznačuje, že nie je potrebné kombinovať LDV / SOF s RBV alebo predlžovať dobu liečby na viac ako 12 týždňov. Novšia štúdia navyše odporúča, aby pacientom s hladinou HCV RNA <6 miliónov IU / ml postačil LDV / SOF iba na 8-týždňový liečebný režim (Geddawy et al. 2017).

#### **Daklatasvir (DCV)**

DCV inhibuje replikáciu vírusovej RNA a tiež aj zhromažďovanie viriónov väzbou na N-koniec NS5A a spôsobuje štrukturálne skreslenia, ktoré interferujú s funkciami NS5A. Po perorálnom podaní sa dobre vstrebáva, pričom strava s vysokým obsahom tukov znižuje biologickú dostupnosť DCV v porovnaní s podmienkami nalačno. DCV sa viaže na plazmatické bielkoviny asi z 99% a metabolizuje v pečeni, pričom CYP3A4 je primárna izoforma CYP zodpovedná za metabolizmus. Väčšina liečiva sa vylučuje stolicou (53% dávky v nezmenenej forme a asi 7% dávky sa vylúčilo močom primárne ako nezmenený daklatasvir). Všeobecne je dobre tolerovaný a najčastejšími hlásenými nežiadúcimi reakciami bola bolesť hlavy, únava, nauzea a hnačka. DCV je kontraindikovaný so silnými induktormi CYP3A, ako sú fenytoín, karbamazepín a rifampicín. Toxicita pre plod sa pozorovala u potkanov a králikov, preto je potrebné zvážiť prínosy a riziká pri predpisovaní DCV tehotným ženám (Geddawy et al. 2017).

#### **4.4.1.3 Inhibítory NS5B (RNA-dependentnej RNA polymerázy)**

Amplifikácia genómu HCV RNA-závislou RNA polymerázou NS5B je kľúčovým krokom v životnom cykle HCV (Spengler 2018). Oproti inhibítorm proteázy, vývoj inhibítorov NS5B závisel viac od dostupnosti modelu bunkovej kultúry. V zásade existujú dve triedy inhibítorov

polymerázy: nenukleozidové inhibítory (NNI) viažuce sa mimo aktívne centrum, alostericky blokujúce enzým, a nukleozidové / nukleotidové inhibítory (NI), ktoré sú začlenené do rodiacej sa RNA (Lohmann 2019).

NI inhibujú NS5B polymerázu napodobňovaním polymerázového substrátu, čo vedie k nesprávnemu ukončeniu novo syntetizovaného reťazca HCV RNA (Spengler 2018). NI sú v zásade výhodnejšie, pretože pôsobia na jednu z najkonzervovanejších štruktúr vírusu (enzymatické jadro polymerázy) (Lohmann 2019), pričom vykazujú vysokú antivírusovú účinnosť, pangenotypovú aktivitu a majú vysokú bariéru proti substitúciám vírusovej rezistencie (RAS) (Spengler 2018).

NNI na druhej strane pôsobia ako alosterické inhibítory RNA-dependentnej RNA polymerázy väzbou na štyri možné miesta. Väzba blokuje funkciu polymerázy prostredníctvom konformačnej zmeny NS5B. NNI odvodené z rôznych heterogénnych chemických štruktúr môžu vykazovať menšiu antivírusovú aktivitu s obmedzenejším spektrom genotypov ako NI a majú iba nízku bariéru proti antivírusovej rezistencii (Spengler 2018). Zástupcom NI je napr. sofosbuvir a pri NNI je to napr. dasabuvir (Geddawy et al. 2017).

#### **Sofosbuvir (SOF)**

Priamo pôsobiaca antivírusová látka SOF bola vyvinutá na perorálnu liečbu infekcie hepatitídy C (Ahmed et al. 2020). Sofosbuvir je pyrimidínový nukleotidový analógový inhibítor NS5B, indikovaný pri liečbe HCV genotypov 1a, 1b, 2, 3 a 4 ako zložka kombinovaného antivírusového liečebného režimu (Geddawy et al. 2017). SOF inhibuje enzým polymerázy, ktorý zohráva kľúčovú úlohu pri replikácii RNA a kvôli svojej štruktúrálnej podobnosti s nukleotidom tak konkuruje charakteristickým nukleotidom a následným blokovaním cieľového miesta nakoniec ukončí vírusovú replikáciu v hostiteľskej bunke (Ahmed et al. 2020). SOF poskytuje vynikajúcu genetickú bariéru rezistencie. Z niekoľkých klinických štúdií bola rezistencia hlásená iba u jedného pacienta, keď bol použitý vo forme monoterapie. Sofosbuvir sa aktivuje v pečeni fosforyláciou na jeho trifosfátový nukleozidový analóg, ktorý sa potom defosforyluje na neaktívny. 80% liečiva sa vylučuje močom (iba 3,5% ako pôvodný liek a 78% ako neaktívna forma), zatiaľ čo 12% sa vylúčilo stolicou. Sofosbuvir preukázal účinnosť u pacientov s genotypmi 1–6 ako súčasť režimu vrátane PEG-IFN a RBV. Ukázalo sa, že SOF je vynikajúcou alternatívou u pacientov, ktorí sú kontraindikovaní na liečbu IFN alebo prestali užívať IFN kvôli nepriaznivým účinkom. (Geddawy et al. 2017).

Je dôležité podotknúť, že počas liečby HCV pomocou DAA je nielen dôležité sledovať interakciu medzi liekmi, ale aj vyhodnotiť interakčný potenciál ešte pred začiatkom liečebného cyklu, aby sa obmedzili liekové interakcie. Toto je skutočne komplexný problém vzhľadom na veľký počet tried liekov, ktoré môžu byť predpísané alebo nepredpísané, a kombinované režimy DAA, najmä tie, ktoré zahŕňajú inhibítory proteázy. Okrem toho tu zohráva dôležitú úlohu

aj štádium ochorenia pečene, ktoré je samo osebe cieľom liečby DAA, a je častým miestom interakcií medzi liekmi (Geddawy et al. 2017).

Väčšina DAA má vysokú mieru väzby na plazmatické bielkoviny v priemere 99%. Miera väzby telapreviru a bocepreviru na plazmatické bielkoviny je okolo 75%. Približne 61% až 65% sofosbuviru sa viaže na plazmatické bielkoviny, ale väzba jeho aktívneho metabolitu na plazmatické bielkoviny je zanedbateľná. K významným liekovým interakciám v dôsledku vytiesnenia z väzby na proteíny dôjde skôr, keď sa súbežne podávajú lieky vykazujúce veľmi vysokú mieru väzby na proteíny; to zase zvyšuje frakciu voľného liečiva. Zvýšená koncentrácia voľného liečiva by mohla potenciálne spôsobiť zvýšené terapeutické a / alebo toxické účinky liečiva a odporúča sa upraviť dávkovací režim (Geddawy et al. 2017).

Väčšina DAA sa metabolizuje hlavne prostredníctvom enzýmového systému CYP450, najmä izozýmu CYP3A4. **Boceprevir** sa metabolizuje hlavne enzýmami aldo-keto reductázy a CYP3A, zatiaľ čo ombitasvir sa metabolizuje amidovou hydrolýzou a následne oxidačným metabolizmom. **Ledipasvir** je minimálne metabolizovaný a vylučovaný ako pôvodné liečivo, zatiaľ čo sofosbuvir je proliečivo aktivované fosforylačnými enzýmami v hostiteľskej bunke. Pretože väčšina inhibítorov proteázy prvej generácie pre látky DAA sa metabolizuje prostredníctvom systému CYP3A, tak majú početné liekové interakcie (Geddawy et al. 2017).

Jedlo zohráva taktiež dôležitú úlohu pri liečbe DAA. Potrava zvyšuje absorpciu perorálneho **paritapreviru / ritonaviru / ombitasviru plus dasabuviru, bocepreviru a simepreviru**, a preto sa odporúča užívať tieto lieky s jedlom. Mastné jedlá zvyšujú absorpciu **telapreviru a asunapreviru**. **Sofosbuvir** a **daklatasvir** sa užívajú s jedlom alebo bez ohľadu na jedlo. Rozpustnosť **ledipasviru** sa môže znížiť pri vyššom žalúdočnom pH, takže súčasné podávanie liekov, ako sú blokátory histamínových H<sub>2</sub> receptorov, alebo inhibítory protónovej pumpy, môže znížiť jeho koncentráciu. Podobne sa neodporúča súbežné podávanie **velpatasviru / sofosbuviru** s inhibítorom protónovej pumpy **omeprazolom**, alebo sa užíva 4 hodiny predtým, ako je to potrebné, pretože koncentrácia a aktivita velpatasviru klesá so zvyšovaním hodnoty pH v žalúdku (Geddawy et al. 2017).

Od schválenia **telapreviru a bocepreviru** v roku 2011 s mierami SVR od 65% do 75% sa možnosti antivírusovej liečby chronickej HCV rozšírili s vývojom dobre tolerovaných, pangentotypických orálnych DAA terapií dostupných pre rôzne osobitné populácie. Nedávne aktualizácie odporúčaní AASLD navyše vyvinuli zjednodušený prístup k liečbe chronickej HCV, ktorý odporúča **glekaprevir / pibrentasvir** po dobu 8 týždňov alebo **sofosbuvir / velpatasvir** po dobu 12 týždňov u všetkých pacientov s HCV, ktorí sú doteraz neliečení, necirhotickí, s normálnou funkciou obličiek a bez komorbidných infekcií (Do a Reau 2020).

Napriek predchádzajúcim údajom o heterogénnej bezpečnosti a účinnosti v rôznych liečebných skupinách sú súčasné liečby chronickej infekcie HCV bezpečné a účinné u rôznych

pacientov s vysokou mierou SVR. Populácie liečiteľné DAA sa rozšírili o populácie s konečným štádiom ochorenia obličiek, koinfekciou HBV alebo vírusom HIV a pediatrické populácie. Niektoré populácie však stále potrebujú ďalší výskum. Napríklad terapia DAA u tehotných žien sa v súčasnosti stále neodporúča a je potrebných viac údajov o bezpečnosti a účinnosti na zabránenie vertikálnemu prenosu (Do a Reau 2020).

Účinnosť liečby je pomerne vysoká, konkrétne u pacientov s dekompenzovanou cirhózou (> 85%), v konečnom štádiu ochorenia obličiek (> 95%), pri koinfekcii HIV (> 95%), predchádzajúcom zlyhaní DAA (> 90%), stave po transplantácii pečene (> 95%) a u všetkých genotypov HCV (> 95%). Vysoká SVR napriek mnohým komorbiditám pacientov zameraným na všetky vírusové genotypy teda vyvoláva otázku, či je definícia liečebných podskupín stále relevantnou potrebou. Rozvoj stratégií na detekciu a zohľadnenie vírusovej rezistencie na DAA bude ale stále nevyhnutný, pretože pri pokračujúcej liečbe sa populácia chronicky infikovaných pacientov posúva smerom k pacientom, ktorí už boli liečení DAA (Do a Reau 2020).

#### 4.4.2 Antivirotiká zamerané na hostiteľa

Každý krok životného cyklu HCV závisí od faktorov hostiteľskej bunky, čo ponúka množstvo cieľov pre antivirotiká zamerané na hostiteľa (HTA) (Zeisel et al. 2013). Na boj proti HCV bolo vyvinutých a testovaných množstvo HTA. Aj keď je ich príliš veľa na to, aby boli podrobne opísané, bolo pomocou RNAi-skríningu a hmotnostných spektrometrických interaktívnych prístupov identifikovaných množstvo hostiteľských faktorov ovplyvňujúcich transláciu, replikáciu, zostavenie a uvoľnenie (Scheel a Rice 2013).

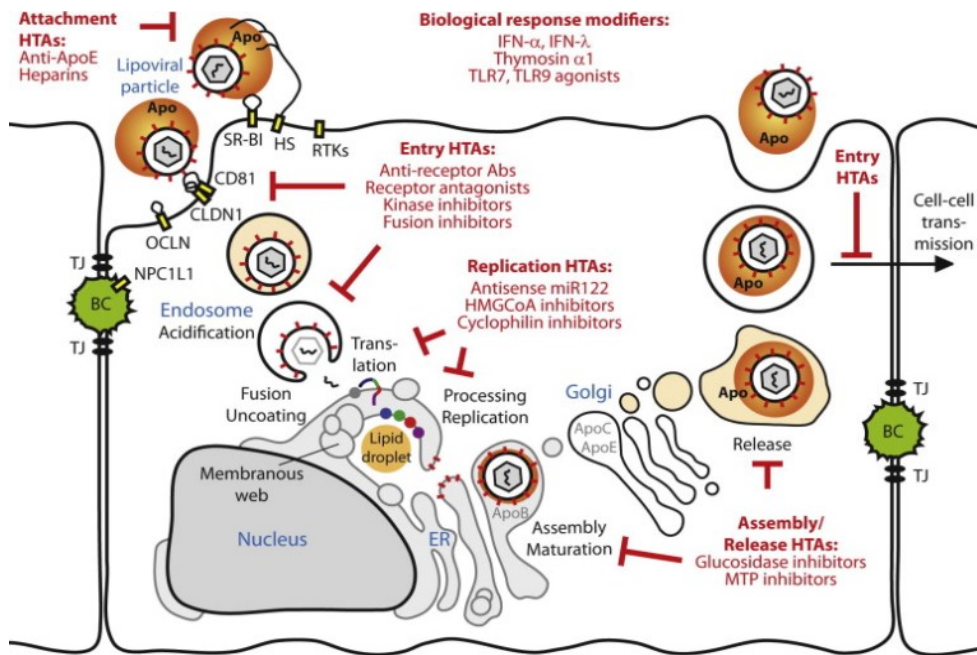
Mnohé HTA sú so širokým zameraním a fungujú tak, že vytvárajú aktivovaný antivírusový stav v hostiteľovi, spúšťaním vrodenej imunitnej odpovede. Vo všeobecnosti medzi ne patria IFN- $\alpha$ , IFN- $\lambda$  alebo agonisti Toll Like Receptorov (TLR) (Chatterji et al. 2014).

Cieľová skupina HTA je presnejšia v tom, že pôsobí na kľúčové hostiteľské enzýmy (proteíny) alebo bunkové faktory, ktoré sú potrebné pre životný cyklus HCV. Ide napríklad o inhibítora cyklofilínu A (CypA) - **alisorivir**, antagonistov mikroRNA 122 (miRNA-122) - **miravirsen** a ďalšie (Baugh et al. 2013, Chatterji et al. 2014, Baugh et al. 2013).

Tab.1 Prehľad činidiel zameraných na hostiteľa proti infekcii vírusom hepatitídy C

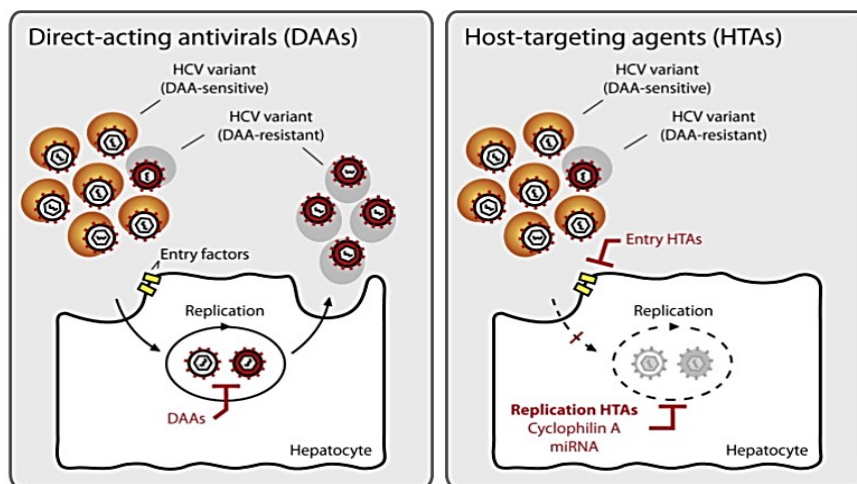
Step	Target	Compound with <i>in vivo</i> proof of concept or in clinical development	Stage of development
<b>Entry</b>	CD81	Anti-CD81 mAbs	Mouse model
	SR-BI	Anti-SR-BI mAbs	Mouse model
		ITX 5061	Phase 1b
	EGFR	Erlotinib	Mouse model
	NPC1L1	Ezetimibe	Mouse model
<b>Replication</b>	miR122	Miravirsen/SPC3649	Phase 2a
	HMGCoA reductase	Statins	Phase 2
	Cyclophilin A	SCY-635	Phase 1
		Alisorivir/Debio 025	Phase 3
<b>Assembly</b>	Glucosidase	MX-3253	Phase 2

(Prevzaté od: Zeisel et al. 2013)



Obr. 15 Hostiteľské faktory požadované pre životný cyklus vírusu hepatitídy C ako antivírusové ciele (Prevzaté od: Zeisel et al. 2013)

Liu et al. (2016b) vo svojom článku uvádzajú, že DAA môžu účinne potlačiť replikáciu HCV a majú nízku bariéru proti vzniku vírusov rezistentných na DAA. Naproti tomu má terapia HTA miernu antivírusovú aktivitu s vysokou bariérou rezistencie na lieky.



Obr. 16 Činidlá zamerané na hostiteľa vykazujú vysokú genetickú bariéru rezistencie. LVP HCV cirkulujú ako kvázidruhy vírusových variantov, ktoré infikujú hepatocyty a replikujú sa v nich. Mechanizmus úniku vírusu pred liekovou terapiou sa medzi DAA a HTA líši. DAA účinne inhibujú replikáciu variantov HCV citlivých na DAA. Variant HCV, ktorý je rezistentný na liečbu DAA sa stáva prevládajúcim variantom HCV unikajúcim z antivírusovej liečby. Zacielenie na hostiteľské faktory potrebné pre vstup a infekciu HCV inhibuje širšie spektrum variantov a genotypov, pretože použitie hostiteľského faktora je zvyčajne vysoko konzervatívne pre všetky vírusové varianty. V dôsledku toho môže byť genetická bariéra vírusovej rezistencie na HTA vyššia v porovnaní s mnohými DAA (Prevzaté od: Zeisel et al. 2013).

Inak povedané, hlavnou výhodou zamerania sa na hostiteľské faktory je extrémne nízka miera mutácií v hostiteľovi, čím vytvára vyššiu bariéru rezistencie na liečivo a súčasne obmedzuje potenciál vírusového prieniku. Pretože každý HTA pôsobí na jedinečný krok životného cyklu vírusu, tak sa vedci domnievajú, že tieto zlúčeniny by mali pôsobiť navzájom synergicky, alebo dokonca so schválenými DAA, čo ďalej rozširuje možnosti anti-HCV na riešenie najťažšie liečiteľných prípadov. Keďže množstvo vírusov používa podobné prístupy, tak sa považuje za celkom rozumné vyvinúť také HTA, ktoré by sa potenciálne mohli použiť na boj proti novo objavujúcim sa infekčným chorobám (Baugh et al. 2013).

#### **4.4.2.1 Inhibítory cyklofilínu**

Inhibítory cyklofilínu, ktoré neutralizujú izomerázovú aktivitu cyklofilínu A preukázali veľkú účinnosť pri liečbe HCV (Chatterji et al. 2014). Cyklofilíny sú dôležitými hostiteľskými faktormi pre replikáciu HCV. Je zaujímavé, že boli identifikované ako hostiteľské ciele antivírusovej liečby už pred viac ako 20 rokmi (Zeisel et al. 2013), pretože sa preukázalo, že **cyklosporín**, široko používaný imunosupresívny liek, inhibuje vírus hepatitídy non-A non-B. V poslednej dobe boli vyvinuté analógy cyklosporínu bez imunosupresívnej aktivity a vykazujúce vyššiu in vitro antivírusovú aktivitu, napr. **Alisporivir / Debio 025**, **NIM811** a **SCY-635**. Tieto zlúčeniny narušili interakciu CypA-NS5A (Scheel a Rice 2013, Zeisel et al. 2013).

**Cyklofilín A (CypA)**, peptidyl-prolyl cis-trans izomeráza je potrebná na replikáciu HCV. Toto bolo objavené v rámci bunkového skríningu testujúceho schválené zlúčeniny na anti-HCV aktivitu (Scheel a Rice 2013). Preukázalo sa, že CypA interaguje s HCV NS5A (Zeisel et al. 2013). CypA sa pravdepodobne viaže na NS5A a katalyzuje konformačné zmeny potrebné na replikáciu HCV RNA. Rezistencia na inhibítory CypA sa mapuje na NS5A v oblasti s prekrývajúcimi sa väzbovými miestami pre CypA a NS5B. Nedávna štúdia naznačuje, že inhibítory CypA môžu tiež zvyšovať vrodenu antivírusovú imunitu indukovaním IFN a ISG typu I a III (Scheel a Rice 2013).

**Alisporivir (ALV)**, syntetický inhibítor cyklofilínu, odvodený od cyklosporínu je najpokročilejším inhibítorom cyklofilínu, ktorý je v súčasnosti v klinickom vývoji pri liečbe chronickej hepatitídy C (Chatterji et al. 2014). U pacientov ALV zvyšuje účinnosť režimov založených na IFN a vykazuje primerané medzigenotypové pokrytie s vysokou bariérou rezistencie. Avšak z dôvodu niekoľkých prípadov akútnej pankreatitídy medzi účastníkmi štúdie je tento inhibítor v súčasnosti klinicky pozastavený. Aj keď je to prekážka pre tento prvotriedny HTA, inhibítory CypA sa môžu znovu objaviť v kontexte režimov bez IFN (Scheel a Rice 2013). Chatterji et al. (2014) vo svojom článku uviedli, že posledné pokroky podporili koncepciu režimov bez IFN na liečbu chronickej hepatitídy C. Ako najpokročilejšia perorálna HTA predstavuje ALV s DAA atraktívnu kombináciu liekov pre terapiu bez IFN.

#### **4.4.2.2 Antagonisti miR-122**

Ďalším zaujímavým aspektom biológie HCV je závislosť od pečenevo špecifickej hostiteľskej mikroRNA miR-122 (viď kapitolu 3.8.5). Štúdie na šimpanzoch poskytli dôkaz o koncepcii na zameranie miR-122 sekvestráciou miRNA pomocou antagonistu miR-122 uzamknutej nukleovej kyseliny - **miravirsenu (SPC3649)**. Takáto stratégia je účinná proti všetkým genotypom HCV (Scheel a Rice 2013). Zeisel et al. (2013) uviedli, že týždenné intravenózne podávanie miR-122 antisense uzamknutej nukleovej kyseliny miravirsenu / SPC3649 (5 mg / kg) po dobu 12 týždňov chronicky infikovaným šimpanzom s gt 1 viedlo k trvalej supresii HCV virémie bez známk vírusovej rezistencie.

Potenciálne nevýhody spočívajú v tom, že miravirsenu sa podáva injekčne a miR-122 reguluje stovky pečenevých mRNA, čo môže spôsobiť nežiaduce vedľajšie účinky. Liečba miravirsenu viedla k prechodnému zníženiu sérového cholesterolu a u myší s vylučovaním miR-122 sa vyvinula hepatitída a HCC, ktoré zaujímavo pripomínali ochorenie spojené s HCV u ľudí. Napriek potenciálnym nevýhodám, krátkodobá štúdia fázy 2 zameraná na miravirsenu naznačila tolerovateľný bezpečnostný profil, významnú antivírusovú aktivitu a vysokú bariéru rezistencie (Scheel a Rice 2013).

#### **4.4.2.3 Statíny zamerané na HMG-CoA reduktázu**

Štúdium asociácie HCV s hepatocytmi, membránami a metabolizmom lipidov odhalilo ďalšie terapeutické uhly zamerané na hostiteľa. Cholesterol a biosyntéza mastných kyselín, ako aj geranylgeranylácia sú dôležité pri replikácii HCV, pravdepodobne pre tvorbu replikačných komplexov RNA spojených s membránou. Statíny zamerané na HMG-CoA reduktázu inhibujú replikáciu HCV v bunkovej kultúre, aj keď v dávkach prekračujúcich tie, ktoré sa používajú na klinické účely na reguláciu sérového cholesterolu. Ako sa dá od toho očakávať, monoterapia statínmi signifikantne neznižuje hladiny HCV RNA, ale ukazuje mierne zvýšenie miery odpovede na liečbu založenú na IFN. Neočakávaným hitom z niekoľkých skríningov siRNA je požiadavka na fosfatidylinozitol-4 kinázu III- $\alpha$  (PI4KIII $\alpha$ ) v replikácii HCV. Tento enzým je unesený HCV NS5A, ktorý stimuluje produkciu fosfatidylinozitol-4-fosfátu. Ako presne sa to vyžaduje pre replikáciu HCV RNA je stále predmetom skúmania. Je zaujímavé, že **4-anilínchinazolíny** o ktorých sa pôvodne myslelo, že sú zamerané na NS5A na základe mapovania mutácií rezistencie sa ukazujú ako inhibítory PI4KIII $\alpha$ . Či je PI4KIII $\alpha$  životaschopným cieľom alebo nie, je stále predmetom diskusie. U myší je tento enzým nevyhnutný a dokonca aj podmienená ablácia PI4KIII $\alpha$  vedie k závažnej patológii. Avšak čiastočná inhibícia PI4KIII $\alpha$ , zameranie na pečeň alebo krátke trvanie liečby môže stále poskytovať terapeutické okno užitočné pri liečbe HCV. (Scheel a Rice 2013).



Identifikované hostiteľské molekuly, ktoré sú dôležité pre vstup do buniek sa stali tiež zaujímavým cieľom. Lieky inhibujúce vstup HCV do buniek sa zameriavajú na receptory a enzýmy, ktoré pomáhajú pri vstupe vírusu. Tieto vstupné inhibítory majú profylaktické vlastnosti a vykazujú synergický účinok v kombinácii s inými látkami. **Lektín cyanovirin-N** zhoršuje vírusovú väzbu svojou interakciou s proteínmi HCV E1/E2 a tým kontroluje vstup. Podobne **L-fikolínové proteíny** môžu neutralizovať častice HCV ich väzbou na proteíny E1/E2. **Epigalokatechín galát** je prírodná polyfenolová zlúčenina, bohatá v extrakte zo zeleného čaju. Udáva sa, že reguluje metabolizmus lipidov, zhoršuje väzbu HCV na hostiteľskú bunku tým, že zasahuje do funkcie HCV E1/E2 a tiež blokuje prenos z bunky na bunky in vitro. **Laktoferín**, prítomný v mlieku, taktiež blokuje uchytenie HCV (Irshad et al. 2018). **Monoklonálne protilátky** môžu inhibovať vstup vírusu, blokovaním extracelulárnych domén bunkových receptorov. Monoklonálne protilátky proti vstupu HCV zabraňovali infekcii HCV na zvieracích modeloch. Myši s humanizovanou pečeňou, ktorým boli podávané protilátky proti klaudínu, boli vyliečené z chronickej infekcie HCV (Baumert et al. 2019). Špecifické monoklonálne protilátky ako **JS-81** alebo **KO4** pôsobia proti interakciám HCV E2-CD81 a interferujú so vstupom HCV počas kroku po väzbe. Sérový **amyloid A**, proteín akútnej fázy, ktorý je produkovaný v pečeni, inhibuje vstup HCV. Podobne aj malá molekula **ITX-5061**, blokuje vychytávanie HCV a funguje synergicky s DAA, čo môže byť sľubnou možnosťou pre budúce použitie (Irshad et al. 2018). Baumert et al. (2019) uviedli, že ITX- 5061 interferuje s väzbou HCV na SRBI a bola prvým inhibítorom vstupu HCV skúmaným v klinických štúdiách. Hoci ITX-5061 mala obmedzenú účinnosť u pacientov s CHC, tak významne obmedzila rozvoj vírusu a oneskorenú infekciu u pacientov podstupujúcich transplantáciu pečene. CLDNs a OCLNs tvoria komplex s CD81 a prispievajú k efektívnym internalizáciám HCV. Keďže CLDN1 je vysoko vyjadrený v hepatocytoch, môže byť potenciálnym cieľom antivírusových látok (Irshad et al. 2018). Vstupné inhibítory sa teda môžu taktiež použiť na liečbu pacientov s chronickou infekciou HCV (Baumert et al. 2019). **Erlotinib** je inhibítor tyrozínkinázy a blokuje vstup HCV inhibíciou aktivity receptora epidermálneho rastového faktora, ktorý je potrebný na tvorbu asociácie koreceptorov CD81-klaudín-1. **Ezetimib** je schválený liek na zníženie hladiny cholesterolu. Imunodeficientné myši s repopulovanými ľudskými hepatocytmi boli liečené pomocou orálnej sondy ezetimibom. Preukázalo sa, že liečba ezetimibom u myší oddialila vznik infekcie HCV a potvrdila tak schopnosť tohto liečiva inhibovať infekciu HCV in vivo. Koncentrácia ezetimibu však bola v týchto experimentoch vysoká (30  $\mu\text{mol} / \text{l}$ ). To znamená, že dospelá osoba s hmotnosťou 70 kg by musela užiť 84 tabliet 10 mg ezetimibu denne (obvyklé dávky pre ezetimib sú jedna 10 mg tableta denne). Terapia HCV na základe ezetimibu sa zatiaľ nejaví ako vhodná, nakoľko potrebné dávky by nebolo možné preniesť do klinickej praxe. Liečba ezetimibom na zvieracom modeli však zdôraznila význam interakcie medzi metabolizmom lipidov hostiteľa a vznikom pretrvávajúcej infekcie (Del Campo et al. 2012).

## 5. POUŽÍVANÉ MODELOVÉ SYSTÉMY

Skúmanie interakcií medzi vírusom a hostiteľom sa opiera o vhodné systémy bunkovej kultúry in vitro, ktoré účinne podporujú vírusovú infekciu. Takéto systémy by mali v ideálnom prípade poskytovať podmienky, ktoré sa podobajú podmienkam prirodzených hostiteľských buniek (Ni a Urban 2017). Vírusová infekcia a rozmnožovanie si vyžaduje špecifické faktory hostiteľa, ktoré sú exprimované hlavne vo vysoko diferencovaných bunkách. Pre napodobnenie hostiteľských faktorov v systéme in vitro je nevyhnutný vývoj modelu založeného na bunkách. Bolo založených niekoľko modelov na báze buniek, avšak väčšina z nich priniesla len obmedzený úspech. Išlo najmä o zľú reprodukovateľnosť a nízke úrovne replikácie (HCV) (Carcamo a Nguyen 2012).

Celkovo bolo náročné vyvinúť modely na štúdium vírusovej hepatitídy. Pokrok sa dosiahol generovaním komplexných biologických systémov. Prvé pokusy o kultiváciu HBV a HCV v bunkových líniiach sa spoliehali na použitie séra infikovaných pacientov na zavedenie vírusu do modelu in vitro. Aj keď bolo možné v týchto modeloch detegovať vírusovú replikáciu, tak výsledná infekcia bola na veľmi nízkej úrovni a bolo ju náročné zistiť pomocou štandardných metód vrátane western blottu, imunofluorescencie či PCR (Thomas a Liang 2016).

Bunkové línie pochádzajúce z nádoru boli užitočné na lepšie pochopenie vírusovej hepatitídy. Všeobecné metódy molekulárnej biológie sa použili na nadmernú expresiu vírusových proteínov a na generovanie bunkových línii, ktoré kontinuálne exprimujú vírusové genómy hepatitídy. Konkrétne sa genómy a plazmidy kódujúce vírusové proteíny HBV DNA a HCV RNA dodali intracelulárne rôznymi transfekčnými technikami a systémami vírusovej transdukcie. Okrem toho bunkové línie, ktoré exprimujú vírusové genómy malých molekulových sít boli použité na identifikáciu látok, ktoré by mohli potlačiť replikáciu vírusu. Celkovo sa použitie transformovaných bunkových línii spoliehalo na skutočnosť, že niektoré z nich majú defekty vnútornej vrodenej imunitnej antivírusovej dráhy v bunkách, ktoré by normálne obmedzovali expresiu vírusových genómov a proteínov. Tieto bunkové línie, aj keď sú abnormálne, umožnili štúdium týchto vírusov bez väčšej interferencie obranných signálnych dráh hostiteľa (Thomas a Liang 2016).

Ľudské pečňové bunkové línie generované z nádorového tkaniva alebo genetickým inžinierstvom primárnych ľudských pečňových buniek sú vďaka svojej dobrej dostupnosti v kultúrach in vitro široko používané. Vysoká proliferačná kapacita a stabilný metabolizmus buniek z nich robí atraktívny nástroj pre in vitro štúdie za štandardizovaných a reprodukovateľných podmienok. Vysoký proliferačný potenciál transformovaných bunkových línii je však všeobecne spojený so stratou diferencovaných funkcií, čo vedie k niektorým nedostatkom vo funkčnej výkonnosti. Aplikácie bunkových línii pečene vo výskume in vitro

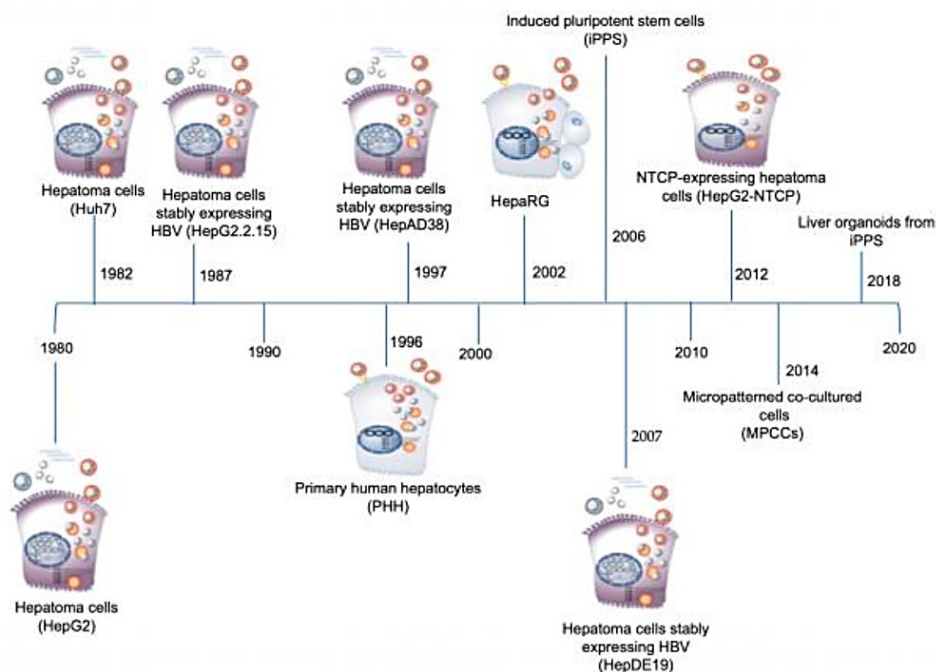
musia preto brať do úvahy špecifické funkčné vlastnosti použitej bunkovej línie (Zeilinger et al. 2016).

In vitro modely kultivácie pečeňových buniek získavajú čoraz väčší význam vo farmakologických a toxikologických výskumoch. Zdroj použitých buniek je rozhodujúci pre relevantnosť a prediktívnu hodnotu takýchto modelov (Zeilinger et al. 2016).

### Modely pre HBV

Pre pochopenie životného cyklu HBV a na vývoj účinných liekov proti HBV je nevyhnutný užitočný systém bunkových kultúr in vitro, ktorý umožňuje infekciu HBV a rekapituluje interakcie vírus – hositeľ. Existujúce modely infekcie HBV in vitro sú však často problematické (Sakurai et al. 2017, Ni a Urban 2017).

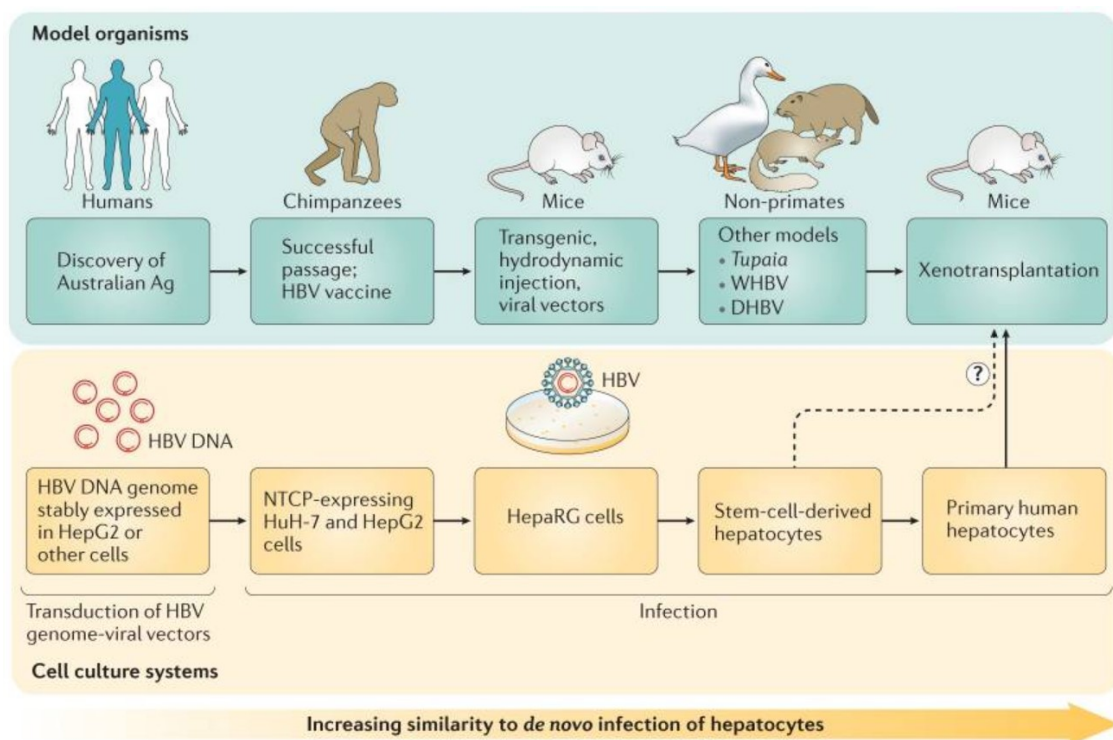
HBV má obmedzený rozsah hositeľov a úzky tropizmus tkanív (König et al. 2019, Sakurai et al. 2017, Sai et al. 2016), čo sťažuje štúdium životného cyklu HBV a objavovanie nových terapeutických prístupov (König et al. 2019). Spoľahlivý a citlivý model bunkovej infekcie in vitro preto stále chýba (Sai et al. 2016).



Obr. 17 Časová os objavu systémov HBV in vitro (Prevzaté od: Wose Kinge et al. 2020)

V súčasnosti sa na štúdium HBV in vitro používajú dva hlavné bunkové modely, a to primárne ľudské hepatocyty (PHH) a bunky pochádzajúce z hepatómu. Aj keď sú PHH citlivé na HBV, obmedzené zdroje a technické ťažkosti spojené s kultiváciou in vitro, obmedzujú ich použitie ako modelu pre HBV infekciu (Sai et al. 2016). Podobne je to aj v bunkách HepaRG, kde bolo taktiež zistených niekoľko nevýhod (Sakurai et al. 2017). Bolo potvrdené, že bunky derivované

z hepatómu, ako sú napríklad bunky HepG2, Huh-6 a Huh-7, podporujú transkripciu a replikáciu HBV. Avšak v týchto procesoch infekcie funguje integrovaný a transfekovaný genóm HBV ako templát, alebo sa bunky pridávajú do chemických reagensí na to, aby sa zlepšila ich citlivosť. Toto spracovanie ničí celý životný cyklus HBV, a tak nie sú náchylné na infekciu HBV (Sai et al. 2016, König et al. 2019). Môžu sa však stať náchylnými na nadmernú expresiu NTCP. Účinná infekcia týchto, ale aj ďalších buniek si vyžaduje ošetrovanie polyetylén glykolom (PEG) počas pripojenia a/alebo vstupu HBV, aby sa zvýšila väzba závislá od glykozaminoglykánu. Dimetylsulfoxid (DMSO) sa používa na spomalenie bunkovej proliferácie, predĺženie životnosti, zvýšenie stavu diferenciácie a zvýšenie citlivosti a replikácie HBV. Avšak po infekcii HBV a tvorbe epizomálnej cccDNA tieto bunky nedokážu amplifikovať vírusové genómy, čo brzdí produkciu vírusových potomkov a ich rozšírenie v bunkovej kultúre (König et al. 2019). Ďalšími sľubnými systémami sú ľudské bunky podobné hepatocytom (HLC), generované z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek alebo embryonálne kmeňové bunky, ktoré sú citlivé na HBV a podporujú obmedzenú produkciu a šírenie vírusu (König et al. 2019).



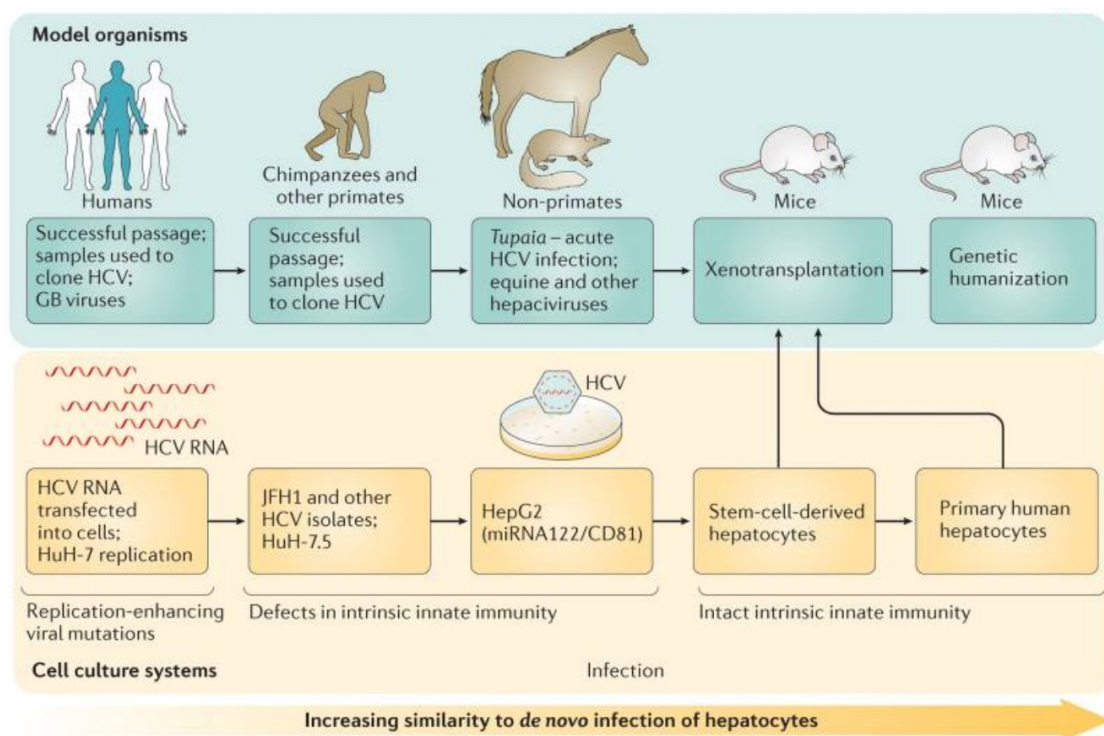
Obr. 18 Vytvárajúce sa modely na štúdium životného cyklu a patogenézy HBV (Prevzaté od: Thomas a Liang 2016)

### Modely pre HCV

Od objavy HCV v roku 1989 predstavoval nedostatok systému bunkových kultúr na produkciu infekčných HCV viriónov hlavnú prekážku pri skúmaní tohto patogénu a pri navrhovaní profylaktických a terapeutických stratégií (Catanese a Dorner 2015). Pri absencii modelu

bunkovej kultúry sa výskumné úsilie zameralo na charakterizáciu klonovaných vírusových sekvencií. Krátko po identifikácii HCV nasledovala sekvencia takmer kompletného genómu pôvodného izolátu označovaného ako HCV-1, ako aj niekoľko ďalších izolátov s vysokou homológiou (HC-J1) (Lohmann 2019). Izoláty HCV odvodené od pacienta však nedokázali iniciovať produktívnu infekciu v bunkovej kultúre. V roku 1997 bol vývoj molekulárnych klonov HCV, ktoré boli infekčné u šimpanzov, dôležitým počiatočným prielomom, avšak tieto vírusové genómy neprodukovali vírusové častice v bunkovej kultúre. Potom následne boli vyvinuté rôzne náhradné systémy, ktoré rozoberajú jednotlivé kroky životného cyklu HCV ako napríklad subgenomický replikón, rozpustný proteín E2 (sE2) a HCV pseudočastice (HCVpp) (Catanese a Dorner 2015).

Jednotlivé proteíny HCV, pseudočastice HCVpp, replikóny a HCV odvodené z bunkovej kultúry sú teda k dispozícii na rozčlenenie životného cyklu HCV. Bunkové systémy na štúdium HCV sa pohybujú od bunkových línií hepatómu po primárne systémy hepatocytov. Na štúdium HCV infekcie sa môžu použiť tiež geneticky humanizované a ľudské pečeňové chimérické myši (Catanese a Dorner 2015). Počiatočné modely ale umožnili študovať iba špecifické aspekty životného cyklu HCV, ako je vírusová replikácia so subgenomickým replikónom a vstup pomocou HCVpp. Následný vývoj protokolov na rast infekčných častíc HCV v bunkovej kultúre (HCVcc) podnietil výskum celého cyklu infekcie HCV a interakcie vírus-hostiteľ, potrebných na šírenie vírusu (Catanese a Dorner 2015).



Obr. 19 Vytvárajúce sa modely na štúdium životného cyklu a patogenézy HCV (Prevzaté od: Thomas a Liang 2016).

Tab. 2 Bežne používané modely bunkových kultúr na štúdium HBV a HCV

<b>Bunková biológia</b>	<b>Bunka Huh-7</b>	<b>Bunka HepG2</b>	<b>Bunka HepaRG</b>	<b>Hepatocyty pochádzajúce z kmeňových buniek</b>	<b>Primárne ľudské hepatocyty</b>
<b><i>Funkčná vrodená imunita</i></b>	Minimálna	Mierna	Plne funkčná	Plne funkčná	Plne funkčná
<b><i>Dĺžka šírenia</i></b>	Neurčitá	Neurčitá	Neurčitá	<1 mesiac	<1 mesiac
<b><i>Polarizované</i></b>	Nie	Áno	Áno	Áno	Áno
<b><i>Zvečnený</i></b>	Áno	Áno	Áno	Nie	Nie
<b><i>Dostupnosť</i></b>	Vysoká	Vysoká	Stredná	Nízka	Nízka
<b><i>Podporuje infekciu HBV</i></b>	Nie, vyžaduje sa NTCP	Nie, vyžaduje sa NTCP	Áno, vyžaduje diferenciáciu	Áno	Áno
<b><i>Podporuje HCV infekciu</i></b>	Áno	Nie, vyžaduje CD81 a miR-122	Áno, vyžaduje diferenciáciu	Áno	Áno

(Prevzaté od: Thomas a Liang 2016).

## 5.1 Primárne ľudské hepatocyty

Najvhodnejším systémom bunkovej kultúry na štúdium hepatotropných vírusov sú primárne ľudské hepatocyty (PHH) (Wang et al. 2019). PHH boli bunkami prvej línie použitými na infekciu HBV (Yuan et al. 2018). Je zrejmé, že PHH sa považujú za zlatý štandard pre infekciu HBV, pretože priamo odrážajú špecifický metabolizmus a funkčnosť ľudskej pečene (Zeilinger et al. 2016, Ni a Urban 2017, Witt-Kehati et al. 2016, Thomas a Liang 2016).

Tieto normálne bunky sa získavajú od pacientov podstupujúcich resekciu pečene (zvyčajne pre nádor pečene) a izolujú sa z vonkajších okrajov nádoru. Okrem toho môžu byť PHH tiež bežne získavané z fetálnych pečeni od potratených embryí a môžu tiež slúžiť ako substrát pre infekciu (Thomas a Liang 2016). Prístup k týmto bunkám je teda obmedzený. Reprodukovateľnosť experimentálnych výsledkov navyše závisí od mnohých faktorov, vrátane spôsobu prípravy alebo variability darcov (Ni a Urban 2017).

Tieto bunky sú však fenotypicky nestabilné in vitro a strácajú svoju permisivitu na infekciu HBV krátko po izolácii a nanosení na kultivačné misky. Skoršie pokusy infikovať PHH infekčnými inokulami HBV sa stretli s veľkou variabilitou medzi darcami hepatocytov, ako aj s nízkou mierou a krátkou trvanlivosťou infekcie, a to aj po doplnení DMSO na podporu stavu diferenciácie buniek (Witt-Kehati et al. 2016).

Všetky nevýhody PHH ako vysoké náklady, obmedzená dostupnosť, zložitá manipulácia, variabilita darcov, de-diferenciácia vedúca k rýchlej strate HBV citlivosti a replikácii (König et al. 2019) a zlá náchylnosť na dlhodobú infekciu HBV (Yuan et al. 2018) prinútili vedcov preskúmať alternatívne zdroje buniek, vrátane bunkových línií pečene a pluripotentných kmeňových buniek (Zeilinger et al. 2016).

### *Systémy in vitro založené na primárnych nehumánnych hepatocytoch*

Vírus hepatitídy typu Woodchuck (WHV) bol prvým z cicavčích a vtačích hepadnavírusov opísaných po objave HBV. Ukázalo sa, že primárne kultúry hepatocytov svišťa sú náchylné na infekciu WHV, čo vedie k tvorbe cccDNA a aktívnej vírusovej replikácii, a preto sa používali ako platforma na štúdium účinku antivírusových liekov na perzistenciu cccDNA. Avšak bolo publikovaných iba niekoľko in vitro štúdií využívajúcich systém WHV, najpravdepodobnejšie kvôli problémom s reprodukciou podmienok na dosiahnutie produktívnej infekcie. Hlavná užitočnosť systému WHV však zostala v kontexte in vivo štúdie na infikovaných zvieratách, ktoré boli kľúčové pre štúdie antivírusových liekov, ako aj pre objasnenie molekulárnych dráh v karcinogéze spojenjej s HBV a interakcie medzi vírusom a antivírusovou imunitnou odpoveďou (Witt-Kehati et al. 2016).

Na rozdiel od PHH a WHV hepatocytov sa zistilo, že s primárnymi kačacími hepatocytmi infikovanými vírusom kačacej hepatitídy B (DHBV) je manipulácia oveľa ľahšia a veľmi užitočná pri štúdiu základných otázok v životnom cykle vírusu, najmä pri tvorbe a amplifikácii cccDNA. DHBV má síce podobný životný cyklus ako ľudský HBV, avšak líši sa od HBV vo viacerých vlastnostiach, vrátane kratšieho genómu a absencie funkčného proteínu HBx. Preto závery odvodené zo systému DHBV týkajúce sa amplifikácie a údržby cccDNA, ako aj vstupu vírusov nemusia pre HBV platiť. Z toho dôvodu sú klinicky irelevantné (Witt-Kehati et al. 2016).

Na druhej strane *Tupaia belangeri* (viď kapitolu 5.8) je okrem ľudí a šimpanzov jediný druh vnímavý na infekciu HBV. Ukázalo sa, že primárne hepatocyty *Tupaia* podporujú infekciu HBV in vitro, aj keď rozsah účinnosti infekcie a šírenie vírusu v tomto systéme nie sú celkom jasné. Dôležité je, že primárne hepatocyty *Tupaia* sa použili ako cieľové bunky pre experimenty so syntetickým peptidom pre-S1, ktoré boli kľúčové pri identifikácii NTCP ako receptora pre HBV a HDV (Witt-Kehati et al. 2016).

## 5.2 HepaRG

Veľkým krokom vpred bolo zavedenie novej bunkovej línie hepatómu, označenej ako HepaRG, ktorá má morfológické a funkčné znaky podobné primárnym hepatocytom, či už ide o metabolizmus liečiva alebo schopnosť podporovať infekciu HBV aj HCV (Thomas a Liang 2016, Witt-Kehati et al. 2016).

HepaRG je bunková línia pečenejých progenitorových buniek, ktorá bola vyvinutá z buniek získaných z resekcii nádoru u jedinca infikovaného HCV s rakovinou pečene (Verrier et al. 2016b, Allweiss a Dandri 2016, Thomas a Liang 2016). Po izolácii týchto buniek však nedošlo k in vitro infekcii. Tieto bipotentné pečenejé progenitorové bunky sa môžu diferencovať na biliárne aj hepatocytárne bunky a môžu sa neobmedzene deliť. Avšak na to, aby boli tieto bunky úplne schopné podporovať infekciu HBV a HCV, musia byť ošetrené DMSO, aby sa podporilo ďalšie dozrievanie do diferencovanejších buniek podobných hepatocytom (Thomas a Liang 2016). Witt-Kehati et al. (2016) navyše dodáva, že je okrem DMSO potrebné doplniť aj kortikoidy. Neskôr bolo možné použiť túto bunkovú líniu aj ako substrát pre HCV infekciu. V tejto štúdií boli výskumníci schopní použiť HCV gt 3 odvodený zo séra na potvrdenie citlivosti HCV na infekciu (Thomas a Liang 2016).

Avšak tento infekčný systém stále trpel podstatnými obmedzeniami, ako je relatívne nízka účinnosť infekcie, prísne podmienky na udržanie stavu diferenciácie týchto buniek a potreba suplementácie PEG na dosiahnutie infekcie (Witt-Kehati et al. 2016, Thomas a Liang 2016, König et al. 2019). Použitie PEG síce uľahčí vstup vírusu, zvýšením interakcií medzi HBV viriónom a bunkovou membránou, ale celková miera infekcie je nízka s minimálnym rozšírením vírusu medzi bunkami (Thomas a Liang 2016). Medzi ďalšie nevýhody patrí aj to, že v prípade buniek



HepaRG nie je možné vyhodnotiť účinky genetického pozadia na infekciu HBV (Sakurai et al. 2017).

HepaRG je jedinou zavedenou citlivou bunkovou líniou exprimujúcou NTCP. Jeho heterogenita v expresii albumínu a chromozomálne abnormality však neumožňujú štúdiu kompletného životného cyklu HBV a vyhodnotenie antivírusových zlúčenín. Je teda nutná už spomínaná diferenciácia vyvolaná DMSO (Wose Kinge et al. 2020). HepaRG sa po diferenciácii podobá PHH vzhľadom na mnoho markerov špecifických pre hepatocyty vrátane expresie enzýmov CYP450, pečene špecifických transkripčných faktorov a transportných proteínov, ako je HBV špecifický receptor NTCP (Ni a Urban 2017).

Je pozoruhodné, že bunky HepaRG podporujú ako vírusový vstup, tak aj produkciu cccDNA a sú teda vhodné na štúdium veľkého počtu krokov v životnom cykle HBV (Verrier et al. 2016b). Schopnosť tohto systému rekapitulovať celý životný cyklus HBV v kontexte autentickej infekcie ustanovila jeho úlohu ako experimentálnej platformy pre štúdie zaoberajúce sa kľúčovými otázkami v biológii HBV, ako je napríklad úloha vrodenej imunitnej odpovede v boji proti HBV infekcii, regulácia cccDNA a mechanizmy vstupu vírusu (Witt-Kehati et al. 2016).

Na rozdiel od iných buniek pochádzajúcich z rakoviny pečene si bunky HepaRG zachovávajú veľký počet fyziologických funkcií pečene a preukazujú transkriptomický obrazec, ktorý sa viac podobá hepatocytom. Konkrétne úroveň expresie CYP450 a expresia vrodenej imunitných zložiek odráža hladinu expresie PHH (Verrier et al. 2016b).

Ukázalo sa tiež, že bunky HepaRG exprimujú kľúčové molekuly vrodenej imunitného systému. Relatívna nízka citlivosť buniek HepaRG v porovnaní s PHH závisí od rôznych faktorov a možno ju čiastočne prekonať konštitutívnou expresiou NTCP, ktorá umožňuje infekciu bez úplnej diferenciácie. Ektopická expresia NTCP neinterferuje so schopnosťou bunkovej diferenciácie indukovanej DMSO (Ni a Urban 2017).

HepaRG sa vo veľkej miere používajú na metabolické a toxikologické testy liečiv. V tejto súvislosti sa na identifikáciu malých molekúl inhibujúcich infekciu HBV, ako je ezitimib, použili systémy HepaRG / HBV a HDV (Witt-Kehati et al. 2016).

### **5.3 HepG2**

Ďalšou bunkovou líniou, ktorá sa použila na štúdium látok vírusovej hepatitídy je bunková línia HepG2. Táto bunková línia bola odvodená z pečeneového tkaniva 15-ročného mužského pacienta bielej rasy, ktorý mal dobre diferencovaný hepatoblastóm. Na rozdiel od bunkovej línie Huh-7 je bunková línia HepG2 polarizovaná a ukázalo sa, že je oveľa užitočnejšia na štúdium HBV ako na HCV (Thomas a Liang 2016). V poslednom desaťročí nastal ale pokrok ktorý umožnil, aby boli bunky HepG2 užitočnejšie aj pre štúdium HCV. Bolo pozorované, že bunkám

HepG2 chýba miR-122, čo je nevyhnutné na podporu životného cyklu HCV. Okrem toho, bunky HepG2 tiež vykazujú veľmi nízku expresiu CD81. V tomto dôsledku sa preukázalo, že bunky HepG2, ktoré sú vybrané tak, aby stabilne exprimovali receptor CD81 aj miR-122, môžu byť infikované HCV a podporovať replikáciu vírusu (Thomas a Liang 2016). Expresia CD81 a miR-122 v bunkách HepG2 teda významne zvyšuje ich náchylnosť na infekciu HCV (So a Randall 2021).

Je zaujímavé, že kvôli rozdielom v antivírusovej vrodenej imunite v rámci tejto bunkovej línie v porovnaní s bunkami Huh-7 sa tento model ukázal ako užitočný pri štúdiu obranných dráh hostiteľa a pri validácii výsledkov získaných v PHH. Konkrétne bola geneticky zmenená bunková línia schopná produkovať veľké množstvo IFN- $\lambda$  typu III v reakcii na infekciu HCV, čo sa tiež pozorovalo aj v PHH (Thomas a Liang 2016).

Na základe objavu NTCP ako funkčného vstupného receptora HBV boli vytvorené bunkové línie hepatómu konštitutívne exprimujúce ľudský gén NTCP, ktoré preukázali úspešné zavedenie infekcie HBV u významného podielu buniek hepatómu transfekovaných NTCP (Allweiss a Dandri 2016). Nakoľko NTCP v ľudských hepatómových bunkách chýba (Yan et al. 2015), tak exogénna expresia NTCP v bunkových líniách hepatómu spôsobila, že bunkové línie boli náchylné na infekciu HBV. Vytvorenie bunkových línií založených na HepG2 a Huh7, v ktorých je nadmerne exprimovaný NTCP poskytuje veľmi potrebnú a ľahko prístupnú platformu pre štúdium HBV (Wose Kinge et al. 2020). Thomas a Liang (2016) uvádzajú, že bunky HepG2, ktoré stabilne exprimujú NTCP sú už tým pádom vhodné na štúdium infekcie HBV infekčnými viriónmi (Thomas a Liang 2016).

Navyše sa očakáva, že dostupnosť týchto nových in vitro testov urýchli identifikáciu nových antivírusových liekov a pochopenie faktorov, ktoré sa podieľajú na počiatočných fázach infekcie HBV (Allweiss a Dandri 2016). Napríklad bunky HepG2-NTCP by sa mohli použiť na identifikáciu chemikálií zameraných na kľúčové kroky životného cyklu vírusu vrátane HBV cccDNA a na umožnenie vývoja nových antivirotik proti infekcii (Wose Kinge et al. 2020).

Infekcia HBV v systémoch bunkových kultúr, vrátane dospelých PHH, buniek hepatómu HepaRG a novších buniek HepG2-NTCP je zosilnená po pridaní PEG, ktorý podporuje väzbu HBV na HSPG. Udržiavanie PEG v médiu pre bunkovú kultúru zvyšuje infekciu najmenej o jeden rád, v dôsledku zlepšeného šírenia vírusu (Wose Kinge et al. 2020).

## 5.4 Huh-7

Bunková línia Huh-7, vytvorená v roku 1982, bola odvodená z dobre diferencovaného HCC, ktorý bol odstránený 57-ročnému Japoncovi, ktorý kvôli nádoru podstúpil resekciu pečene. Táto bunková línia bola užitočná pri štúdiách HBV, ale bežnejšie sa používala pri modeloch in vitro

na štúdium HCV. Spočiatku bola bunková línia Huh-7 úspešná v množení subgenomických mutantov obsahujúcich luciferázu, ktoré kodovali iba neštruktúrne proteíny HCV. Výsledkom bolo, že táto bunková línia sa použila ako primárny substrát na generovanie replikónu, ktorý kontinuálne exprimoval a replikoval genóm HCV RNA bez integrácie medziproduktu DNA do bunkového genómu (Thomas a Liang 2016).

## 5.5 HCVpp

Hlavným prielomom v skúmaní procesu vstupu HCV bol vývoj pseudočastíc (HCVpp) (Catanese a Dorner 2015). Tieto pseudočastice využívajú schopnosť retrovírusov inkorporovať heterológne glykoproteíny do svojej membrány počas pučania (Wilson a Stamataki 2012). HCVpp tak pozostávajú z častíc retrovírusového jadra obklopených lipidovou dvojvrstvou, obsahujúcou funkčné komplexy HCV E1E2. Najvýznamnejšie vlastnosti HCVpp sú tie, že sa dajú pripraviť tak, aby zobrazovali HCV glykoproteíny ľubovoľného vírusového genotypu a tiež sprostredkovávajú abortívny infekčný cyklus a umožňujú integráciu rôznych markerových génov (Bartosch et al. 2010).

HCVpp sa produkujú kotransfekciou buniek 293T tromi expresnými plazmidmi kódujúcimi: (1) HCV glykoproteíny E1 a E2, (2) proteíny Gag – Pol vírusu ľudskej imunodeficiencie (HIV) alebo vírusu myšej leukémie (MLV) a (3) retrovírusový genóm obsahujúci reportérový gén (Catanese a Dorner 2015, Riva a Dubuisson 2019). Prítomnosť reportérového génu, ako je GFP alebo luciferáza, umožňuje kvantitatívne meranie vstupu pseudočastíc HCV do cieľových buniek (Riva a Dubuisson 2019, Catanese a Dorner 2015). Bartosch et al. (2010) udávajú, že retrovírusový genóm kóduje markerové gény pre fluorescenčnú, luminiscenčnú alebo selektívnu detekciu (Bartosch et al. 2010).

Vývoj infekčných HCV pseudočastíc (HCVpp) umožnil štúdie vstupného aspektu životného cyklu vírusu a charakterizáciu protilátok neutralizácie (Wilson a Stamataki 2012, Riva a Dubuisson 2019). Konkrétnejšie išlo o štúdiu úlohy glykoproteínov E1 a E2 pri vstupe HCV (Catanese a Dorner 2015). Infekcia HCVpp buniek hepatómu bola odstránená špecifickými neutralizačnými činidlami E1 a E2, aby sa potvrdilo, že E1 aj E2 sú nevyhnutné pre vstup HCV a poskytla tak prvý funkčný test na skrining účinkov neutralizujúcich protilátok na vstup vírusu (Wilson et al. 2012).

Poslúžil taktiež na identifikáciu a validáciu kandidátskych faktorov, receptorov (Catanese a Dorner 2015) a koreceptorov ako CLDN-1 a OCLN. Systém HCVpp dodnes pomáha pri porozumení väzby, pripojenia a internalizácie HCV (Wilson a Stamataki 2012).

## 5.6 HCVcc

Ďalší systém pozostáva z replikatívnych častíc HCV nazývaných HCVcc. Tieto častice pochádzajú z bunkovej kultúry a rutinne sa používajú na štúdium každého kroku životného cyklu HCV (Bartosch et al. 2010, Riva a Dubuisson 2019).

Infekcia buniek HCV izolátmi pochádzajúcimi od pacienta nevedie k produktívnej infekcii a dôvody zostávajú nejasné (Catanese a Dorner 2015). Práve v roku 2005 nastal veľký prielom vo výskume HCV, keď niekoľko laboratórií uviedlo kmeň HCV, ktorý replikuje a uvoľňuje infekčné častice v bunkovej kultúre HCVcc. Kmeň bol klonovaný z vírusu genotypu 2a izolovaného od japonského pacienta so závažnou akútnou infekciou HCV. Tento jedinečný klon sa označoval ako japonská fulminantná hepatitída 1 (JFH-1). Objav HCVcc mal za následok, že bolo možné študovať celý vírusový životný cyklus *in vitro*. Na rozdiel od všetkých predchádzajúcich testovaných genómov HCV viedla infekcia buniek hepatómu JFH-1 k uvoľneniu potomstva vírusu schopného infikovať naivné bunky. HCVcc potvrdila hlavné nálezy dosiahnuté pomocou HCVpp, vrátane identifikácie koreceptorov HCV a naďalej zvyšuje naše chápanie životného cyklu HCV. Úspešná izolácia JFH-1 navyše pripravila pôdu pre vývoj niekoľkých chimérických konštruktov HCVcc predstavujúcich rôzne genotypy. Bol vyvinutý plne replikujúci sa systém HCVcc z vírusu genotypu 1a (H77-S) a bol infekčný aj pre šimpanzy. Tento izolát však nebol taký infekčný ako JFH-1 *in vitro* (Wilson a Stamatakis 2012, Riva a Dubuisson 2019). Catanese a Dorner (2015) udávajú, že JFH-1 je schopný iniciovať nízkoúrovňovú infekciu v bunkách Huh-7, čo otvára cestu k štúdiu úplného životného cyklu HCV v bunkovej kultúre.

Systém HCVcc viedol k identifikácii nových vstupných faktorov, ako sú NPC1L1, EGFR a EphA2. Tento modelový systém umožnil po prvýkrát študovať skladanie a výstup HCV a charakterizáciu biofyzikálnych a ultraštruktúrnych vlastností viriónu HCV (Catanese a Dorner 2015).

Posledné štúdie využívajúce bunky podobné hepatocytom pochádzajúce z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek (iPSC) a ľudských embryonálnych kmeňových buniek (hESC) ukázali, že tieto bunky môžu byť infikované HCVcc, čo ponúka príležitosť študovať prínos genetiky hostiteľa k patogenéze HCV (Catanese a Dorner 2015).

## 5.7 Kmeňové bunky

Pokrok v množení kmeňových buniek v kultúre viedol k vzrušujúcim modelom, ktoré možno použiť na štúdium vírusovej hepatitídy. Teraz sú k dispozícii metódy na diferenciáciu kmeňových buniek smerom k endodermálnej línii a potom na podporu vývoja do zrelej hepatocytov. Kmeňové bunky embryonálneho pôvodu sú kontroverzným zdrojom z dôvodu potreby odvodiť

tieto bunky z potratených embryí a z dôvodu možnosti dlhodobých biomedicínskych aplikácií (vrátane klonovania) (Thomas a Liang 2016).

#### Indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC)

iPSC sú pluripotentné preprogramované bunky odvodené buď z kože dospelých alebo z krvných buniek a boli prvýkrát objavené japonskými vedcami po zavedení génov potrebných na expresiu súboru transkripčných faktorov v špecializovaných dospelých bunkách (Wose Kinge et al. 2020).

IPSC sú schopné sebaobnovy a diferenciacie na rôzne typy buniek čo z nich robí sľubný zdroj buniek pre regeneračnú terapiu pri niekoľkých chorobných stavoch. Na obmedzenie predsudkov o variabilite darcov a v snahe zvýšiť dostupnosť hepatocytov sa v roku 2006 bunky podobné hepatocytom (HLC) odvodili od iPSC a v roku 2014 vedci prvýkrát zistili, že HBV môže infikovať HLC odvodené z iPSC. Ukázali, že HBsAg bol efektívne produkovaný v supernatante po infekcii; hladiny HBsAg však postupne klesali na základné hodnoty. V jednej zo štúdií vedci pozorovali zvýšenie sekrécie HBsAg v supernatante kultúry až 17 dní po infekcii HBV v iPSC-HLC. To naznačovalo, že iPSC-HLC môžu podporovať dlhodobú infekciu HBV. Ďalší výskumníci toto zistenie podporili, keď využili ľudské HLC odvodené od iPSC ako robustný a pohodlný model in vitro na štúdium HBV. iPSC-HLC teda poskytujú sľubný model infekcie HBV in vitro a pripravujú cestu k disekcii základných mechanizmov infekcie HBV a vývoja nových liekov proti HBV (Wose Kinge et al. 2020).

#### Ľudské bunky podobné hepatocytom (HLC)

Ľudské bunky podobné hepatocytom (HLC) sú generované z indukovaných pluripotentných kmeňových buniek alebo embryonálnych kmeňových buniek. Sú citlivé na HBV a podporujú obmedzenú produkciu a šírenie vírusu (König et al. 2019). Ukázalo sa, že bunky podobné hepatocytom pochádzajúce z ľudských kmeňových buniek (hHLC) sú sľubným novým nástrojom na štúdium HBV a iných hepatotropných vírusových infekcií in vitro. Tieto hHLC sú fyziologicky podobné PHH, majú pomalú diferenciaciu, sú dostupné pre dlhodobú in vitro infekciu a je možné s nimi geneticky manipulovať. Predchádzajúce štúdie preukázali, že hHLC odvodené z ľudských kmeňových buniek boli expandovateľné v pečeni myši a boli permissívne pre infekciu vírusom hepatitídy C (Yuan et al. 2018).

V poslednej dobe si ľudské bunky podobné hepatocytom diferencované od ľudských embryonálnych kmeňových buniek (ESC) a indukovaných-pluripotentných kmeňových buniek (iPSC) získali veľkú pozornosť nielen vďaka prísľubu regeneračných liekov, ale aj kvôli ich potenciálu pre modelovanie metabolizmu liekov a patogénnu infekcia in vitro (Sakurai et al. 2017).

## 5.8 Zvieracie modely

### Šimpanz

Šimpanzy sú jedinými imunokompetentnými zvieratami, ktoré sú úplne náchylné na infekciu ľudským HBV. Pri stimulácii infekčným sérom sa u šimpanzov vyvinie akútna a chronická infekcia HBV so sprievodnou hepatítidou a bunkovým imunitným profilom podobným profilu pozorovanému u pacientov infikovaných HBV (Allweiss a Dandri 2016).

Šimpanzy boli zároveň nevyhnutné pre štúdie bezpečnosti a vývoj vakcíny proti HBV. V priebehu niekoľkých rokov sa uskutočňovali infekčné štúdie s rôznymi veľkosťami očkovacej látky a rôznymi vírusovými kmeňmi. Uplatniteľnosť terapeutického očkovania ako možnej možnosti liečby u chronicky infikovaných pacientov sa tiež skúmala pomocou šimpanzov, napríklad DNA vakcín alebo terapeutických protilátok. Nedávno bola imunitná modulácia na zvýšenie antivírusovej imunity prostredníctvom aktivácie TLR-7 skúmaná u šimpanzov chronicky infikovaných HBV, kde liečba perorálne aktívnym agonistom TLR-7 viedla k zníženiu markerov HBV a zlepšeniu funkcií imunitných buniek pri súčasnom zvýšení apoptózy hepatocytov (Allweiss a Dandri 2016).

Šimpanz bol použitý pre niektoré štúdie antivírusovej účinnosti a je jediným modelom pre štúdie adaptívnej imunity a odpovede na vakcínu. V roku 1997 sa ukázalo, že transkripty RNA z konsenzuálnych klonov genotypu 1a iniciujú infekciu po intrahepatálnej injekcii šimpanzom, čo definuje kritické genetické prvky HCV. V súčasnosti sú k dispozícii klony genotypov 1–4 infekčné pre šimpanzy (Scheel a Rice 2013).

Naše vedomosti o životných cykloch obidvoch vírusov (HBV, HCV) a vývoji zodpovedajúcich antivírusových liekov sťažuje nedostatok ľahko manipulovateľných malých zvieracích modelov pre oba patogény. Aj keď sú šimpanzy náchylné na obe infekcie, ich použitie je obmedzené z etických a praktických dôvodov (Bissig et al. 2010). V roku 2013 Národný inštitút zdravia výrazne obmedzil používanie ľudoopov kvôli veľkým etickým obavám. Budúci výskum bude teda ešte viac závisieť od alternatívnych nástrojov výskumu (Allweiss a Dandri 2016).

### Makak

HBV je pôvodný pre šimpanzy a iné primáty, ako sú gibony a gorily, u ktorých sa na rozdiel od človeka všeobecne vyvinie iba mierne ochorenie pečene. Úsilie o prechod HBV na menšie primáty (okrem človeka) bolo neúspešné. Jedinou výnimkou boli zatiaľ makaky, u ktorých sa preukázalo, že podporujú replikáciu HBV po intrahepatálnej inokulácii konštruktov HBV DNA, čo vedie k samolimitujúcej hepatitíde. Ďalej sa zistilo, že makaky cynomolgus z ostrova Maurícius boli prirodzene infikované ľudským HBV. HBV izolovaný z týchto chronicky infikovaných opíc mohol byť pasážovaný neinfikovaným makakom barbarkým. Okrem toho primárne hepatocyty izolované z makakov cynomolgus môžu podporovať replikáciu HBV, keď

sa genómy HBV prenášajú rekombinantnou bakulovírusovou transdukciou. Preto sú potrebné ďalšie štúdie s cieľom posúdiť, do akej miery môžu tieto veľké odchované zvieratá predstavovať nový model výskumu pre imunologické a antivírusové štúdie (Allweiss a Dandri 2016).

Uvádza sa, že maurícijské makaky cynomolgus majú pretrvávajúcu infekciu HBV. Aj keď makaky rhesus nie sú prirodzene náchylné na infekciu HBV, transgénna expresia ľudského NTCP v ich hepatocytoch umožňuje infekciu HBV. Infekcia HBV pretrvávala u 2 transgénnych makakov, čo viedlo k indukcii odpovedí T-buniek špecifických pre HBV, zatiaľ čo HBV sa rýchlo eliminovala z 2 ďalších makakov. Tieto makaky by mohli byť užitočným, imunokompetentným primátom na štúdium infekcie HBV (Hu et al. 2019a).

### **Tupaia**

Tupaia patrí medzi malé cicavce, ktoré sa svojím vzhľadom podobajú veвериčiam a zdieľajú značnú homológiu s ľuďmi aj primátmi. Genomická analýza odhalila, že rod Tupaia má bližšie k ľuďom ako ku hlodavcom. Aj keď boli kedysi klasifikované ako primáty, tak neskôr ich štúdie zaradili do vlastnej čeľade Tupaiidae (Tsukiyama-Kohara a Kohara 2014). Kvôli úzkemu fylogenetickému vzťahu medzi primátmi a Tupaia belangeri môže HBV tieto zvieratá prechodne infikovať (Allweiss a Dandri 2016). Ide teda v podstate o jediné zviera, ktoré nie je primát a je experimentálne citlivé na infekciu HBV (Hu et al. 2019a, Allweiss a Dandri 2016) a tiež na HCV (Tsukiyama-Kohara a Kohara 2014).

In vivo infekcia dospelých zvierat vedie k miernej a prechodnej infekcii s nízkou úrovňou vírusovej replikácie (Hu et al. 2019a, Allweiss a Dandri 2016). V niektorých štúdiách sa pozorovala fibróza pečene a rozvoj HCC, zatiaľ čo v iných sa zaznamenal rýchly klírens HBV (Hu et al. 2019a). Allweiss a Dandri (2016) navyše udávajú, že infekcia novorodencov zvierat HBV vyvolala chronickú infekciu so strednými hladinami virémie a imunitne patologické zmeny v pečeni dlhodobo infikovaných zvierat.

Tupaia sa považuje za veľmi vhodný používaný model na štúdium vírusovej infekcie a tiež pri predklinickom vývoji liekov. Na druhej strane je ich použitie v súčasnosti spojené s problémami (Tsukiyama-Kohara a Kohara 2014). Ide o pomerne veľké zvieratá, s ktorými sa v zajatí ťažko manipuluje a ktoré nie sú ľahko dostupné (Inuzuka et al. 2014). Taktiež sa udáva, že u týchto in vivo modelov je nízka účinnosť infekcie a experimentálne obmedzeniami najmä v dôsledku nedostatku inbredných kmeňov Tupaia (Allweiss a Dandri 2016). Nakoľko sú hepatocyty Tupaia vhodné na in vitro štúdie infekcie HBV, tak predstavujú priaznivejšiu alternatívu voľby (Allweiss a Dandri 2016). Tieto modely boli použité napríklad na identifikáciu NTCP ako receptora HBV (Hu et al. 2019a, Tsukiyama-Kohara a Kohara 2014). Navyše bolo identifikovaných niekoľko rovnakých vysoko konzervatívnych a variabilných génov u Tupaia ako u ľudí. Relatívne vysoká homológia bola pozorovaná medzi človekom a Tupaia pri HCV.

Išlo napríklad o vírusový receptor CD81, SR-BI, proteíny tesného spojenia claudín I a okluzín I, najmä v povrchových glykoproteínových oblastiach receptora a vírusu, ktoré interagujú s transmembránovými proteínmi (Tsukiyama-Kohara a Kohara 2014).

### Modely myši

#### **Transgénne myši**

Myši sú najlepšie charakterizované a najpohodlnejšie malé laboratórne zvieratá, ale nemôžu byť infikované HBV. Na prekonanie týchto obmedzení sa vygenerovali geneticky modifikované myši exprimujúce buď jednotlivé vírusové proteíny, alebo celý genóm HBV (Allweiss a Dandri 2016). HBV transgénne myši exprimujú jednotlivé vírusové proteíny (obalový, jadrový, prejadrový alebo X proteín) alebo všetky vírusové gény (Hu et al. 2019a).

Spočiatku sa konštruovali transgénne myši exprimujúce každý vírusový proteín. Tieto myši sa použili na vyhodnotenie virológie a onkogénneho potenciálu každého vírusového proteínu. Potom boli generované transgénne myši exprimujúce úplný replikón HBV. Tento model produkuje infekčné virióny a umožňoval testovať účinnosť antivírusových látok, ako sú inhibitory HBV, siRNA a cytokíny in vivo (Hwang a Park 2018). Pomocou transgénnych myši pre celý genóm HBV bola zistená schopnosť myších hepatocytov produkovať infekčné virióny HBV, morfológicky nerozoznatelné od viriónov pochádzajúcich z človeka (Hu et al. 2019a, Inuzuka et al. 2014). Pretože tieto myši sú transgénne pre HBV, tak nemajú potenciál vírusového klirensu (Hu et al. 2019a). Navyše, keďže sú imunologicky tolerantné voči vírusovým proteínom a u myši produkujúcich HBV nebolo pozorované žiadne poškodenie pečene, tak štúdie preukázali, že samotný HBV nie je cytopatický (Allweiss a Dandri 2016, Hwang a Park 2018). Štúdie využívajúce HBV transgénne myši teda objasnili, že HBV nie je priamo cytopatický pre hepatocyty a že patogenéza ochorenia aj vírusový klirens sú sprostredkované antivírusovou adaptívnou imunitnou odpoveďou na HBV (Inuzuka et al. 2014). Patogénne funkcie adaptívnej imunity boli demonštrované pozorovaním, že adoptívny prenos HBV-antigén-špecifických cytotoxických T buniek (CTL) na HBV transgénne myši spôsobuje u týchto myši akútne nekroinflamačné ochorenie pečene, pri ktorých samotná replikácia HBV nevykazuje žiadny cytopatický účinok (Hwang a Park 2018, Inuzuka et al. 2014).

Najdôležitejším zistením v tomto modeli bolo, že antigén-špecifické CTL nespôsobujú iba hepatocelulárne poškodenie, ale tiež necytopaticky inhibujú expresiu génu HBV a replikáciu vírusu. Vírusový klirens je úplne blokový protilátkami pre IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$ , čo naznačuje, že tieto cytokíny sú zodpovedné za necytopatický antivírusový účinok CTL (Allweiss a Dandri 2016, Inuzuka et al. 2014). Dôležitosť CTL v patogenéze ochorenia a vírusovom klirensu bola ďalej potvrdená štúdiami šimpanzov infikovaných HBV (Inuzuka et al. 2014).



V polovici 80. rokov sa na štúdium úlohy a onkogénneho potenciálu týchto proteínov HBV použili prvé HBV transgénne myši selektívne exprimujúce proteíny HBV, ako sú HBsAg, HBeAg alebo HBx. Ukázalo sa napríklad, že samotná produkcia HBsAg nevedie k zápalu pečene. Expresia HBsAg spolu s nadmernou expresiou veľkého antigénu však viedla k jeho akumulácii v ER, čo viedlo k nekroinformatívnym reakciám a následnému vývoju HCC. Je zaujímavé, že vyššia rýchlosť bunkovej proliferácie a následný vývoj HCC bola pozorovaná u tých transgénnych myší, ktoré exprimovali vysoké hladiny HBsAg (Allweiss a Dandri 2016). Myši transgénne pre proteín HBx viedli ku kontroverzným výsledkom, pokiaľ išlo o ich onkogénny potenciál. Aj keď prvé správy ukázali, že u myší exprimujúcich HBx sa vyvíja HCC, ďalšie štúdie v nasledujúcich rokoch naznačujú, že samotný HBx nestačí na vyvolanie vývoja nádoru, ale slúži skôr ako senzibilizátor na chemické karcinogény alebo iné bunkové onkogény (Allweiss a Dandri 2016).

### **Transfektované myši**

Na prekonanie obmedzení HBV transgénnych myší sa používajú vektory na zavedenie HBV DNA do pečene myší (Hu et al. 2019a). Hydrodynamická transfekcia myšej pečene genómom HBV sa použila na štúdium imunobiológie HBV, ale nepodporuje vírusovú infekciu (Bissig et al. 2010). Tento proces zahŕňa rýchle vstreknutie veľkého množstva tekutiny cez chvostovú žilu. Hydrodynamická injekcia plazmidov nesúcich nadmernú dĺžku HBV 1,3X má za následok vysoké hladiny replikácie HBV, vysoké hladiny HBV DNA v krvi a adaptívnu imunitnú reakciu, ktorá vyčistí HBV. Systém bol upravený tak, aby sa stanovila perzistencia HBV a aby sa umožnili štúdie imunitnej tolerancie voči vírusu (Hu et al. 2019a).

HBV DNA sa môže tiež dodávať do myších hepatocytov prostredníctvom adenovírusov (AdV) alebo vektorov založených na adenovírusoch. Produkcia proteínu HBV bola pozorovaná až 3 mesiace po intravenóznei injekcii AdV-HBV, po ktorej nasledoval klírens HBV odpoveďami sprostredkovanými B-bunkami a T-bunkami. Hydrodynamické injekcie a vektory AdV môžu indukovať vrodené imunitné odpovede, takže nálezy z týchto systémov by sa mali interpretovať opatrne. Nakoniec tieto systémy môžu duplikovať sérokonverziu HBeAg alebo HBsAg bez prejavov ochorenia pečene (Hu et al. 2019a).

Hepatocyty z transfekovaných myší neobsahujú HBV cccDNA, ale mohlo by k tomu dôjsť ďalšou genetickou manipuláciou myší. Okrem úlohy pri štúdiu imunitných odpovedí počas akútnej infekcie HBV sa na hodnotenie antivírusových látok a stratégií na vyvolanie imunitnej odpovede proti HBV použili aj systémy hydrodynamickej injekcie a adeno-asociovaného vírusu HBV. Hydrodynamická injekcia siRNA, ktorá znižuje expresiu oblasti HBV DNA, je konzervovaná medzi genotypmi alebo siRNA a znižuje expresiu konzervovaných oblastí génu X, znížila hladinu HBsAg u myší (Hu et al. 2019a).

### **Imunodeficientné myši**

Imunodeficientné myši s ľudskými hepatocytmi poskytujú komplikovaný, ale užitočný zvierací model pre štúdie vstupu, replikácie a vrodenej (nie adaptívnej) imunity. V alternatívnych prístupoch bol HCV upravený na infikovanie myších buniek alebo samotných myší, ktoré boli geneticky humanizované, aby umožnili vstup HCV. Tento prístup je stále obmedzený kvôli nízkej vírusovej replikácii a produkcii vírusu (Scheel a Rice 2013). Imunodeficientná uPA myš umožňuje repopuláciu pečene ľudskými hepatocytmi, ktoré môžu byť infikované HCV alebo HBV. Myši model uPA má však určité obmedzenia, ktoré zahŕňajú nadmernú úmrtnosť, nízku účinnosť chovu, transgénnu reverziu a celkové spravovanie kolónií (Bissig et al. 2010).

### **Humanizované chimérické myši**

Pretože myši nie sú prirodzeným hostiteľom HBV, nie je možné u transgénnych myší alebo myší s replikónom HBV študovať celý infekčný proces (od vstupu vírusu po syntézu cccDNA a intrahepatálne šírenie). Z tohto dôvodu je potrebný model ľudskej pečeneovej chimérickej myši (Hwang a Park 2018). Na štúdium infekcie HBV sú najbežnejšie používané myši, ktoré exprimujú aktivátor plazminogénu urokinázového typu pod kontrolou albumínového promótoru (alb-uPA) / myši s ťažkou kombinovanou imunodeficienciou (SCID) (Hu et al. 2019a, Hwang a Park 2018). Tieto myši majú ako novorodenci subakútne zlyhanie pečene, ale ich pečeň sa môže rekonštituovať s ľudskými hepatocytmi (Hu et al. 2019a).

Po spätnom krížení myší alb-uPA s imunodeficientnými myšami sa ľudské hepatocyty zavedú intrasplenickou injekciou. Ďalej sa rozmnožuje a znovu osídľuje malé množstvo hepatocytov, ktoré sa dostanú do poranenej pečene. Engraftované ľudské hepatocyty sa potom udržiavajú stabilne. Tento model myši má však niekoľko nevýhod, medzi ktoré patrí neplodnosť, potenciálne smrteľné krvácanie a poruchy obličiek (Hwang a Park 2018).

Chiméry môžu byť infikované vírusmi HBV a ich infikované štepené ľudské hepatocyty generujú funkčné HBV cccDNA a šírenie vírusov. Pretože tieto myši nemajú imunitný systém, nepoužívajú sa na štúdium antivírusovej imunitnej odpovede. Avšak ľudské T bunky môžu byť prenesené do myší, aby sa študovala ich odpoveď na infekciu ľudských hepatocytov HBV (Hu et al. 2019a).

Chimérické myši preto poskytujú jedinečné platformy na štúdium mechanizmov tvorby cccDNA HBV a priamych štúdií antivírusových látok. Napríklad sa zistilo, že myrcludex B, blokuje de novo infekciu ľudských hepatocytov HBV a vírusom šíreným v chimérach FRG (Hu et al. 2019a).

## 7. DISKUSIA

Vírusy HBV a HCV využívajú množstvo účinných faktorov a mechanizmov na zahájenie svojho vstupu do bunky, kde následne dochádza k ich replikácii, skladaniu, dozrievaniu a následnému výstupu nových častíc z bunky za účelom efektívneho množenia sa v organizme. Ich zložitý životný cyklus, schopnosť pretrvávajúť v organizme, či rozvoj rezistencie na liečivá, robí z týchto vírusov ťažko liečiteľný cieľ. V pochopení životného cyklu vírusov HBV a HCV nastal v posledných rokoch obrovský pokrok. Na druhej strane, niektoré otázky ostávajú stále nezodpovedané a názory vedcov sa nie vždy jednoznačne zhodujú.

Ak sa na to pozrieme postupne, tak v prípade vstupu HCV sa výskumníci zhodujú na tom, že využíva na svoj vstup klatrínom sprostredkovanú endocytózu. Avšak v prípade vstupu HBV to už také jednoznačné nie je. Nastala totiž otázka, či HBV využíva na svoj vstup klatrínom, alebo kaveolínom sprostredkovanú endocytózu. Herrscher et al. (2020) túto nejasnosť vo svojom článku aj spomenuli. Chakraborty et al. (2020) napríklad uvádzajú, že vírus HBV používa tak ako klatrínom sprostredkovanú endocytózu, tak aj na kaveolínové závislé endocytové dráhy. Herrscher et al. (2020) uviedli, že na iniciáciu produktívnej infekcie v bunkách HepaRG využíva HBV vstupnú cestu sprostredkovanú kaveolínom-1. Avšak v inej štúdií po ošetrovaní primárnych Tupaia hepatocytov chemickými inhibítormi kaveolínom sprostredkovanej endocytózy sa infekcia HBV nezhoršila. To že HBV vyžaduje vstupnú cestu sprostredkovanú kaveolínom-1 na zahájenie produktívnej infekcie v bunkách HepaRG uviedli aj Macovei et al. (2010) a zároveň popierajú, že by HBV využíval klatrínom sprostredkovanú endocytózu. Niektoré štúdie na druhej strane tvrdia presný opak a to, že HBV využíva klatrínom sprostredkovanú endocytózu. Zmienili sa o tom napríklad Hwang a Park (2018), ktorí uviedli, že NTCP umožňuje viriónu HBV prechádzať cez plazmatickú membránu práve pomocou klatrínom sprostredkovanej endocytózy. Herrscher et al. (2020) píše, že sa skutočne ukázalo, že doména preS1 obalových proteínov HBV interaguje s klatrínom a proteínovým adaptérom 2 (AP-2) počas vstupu do imortalizovaných ľudských primárnych hepatocytov. Tento výsledok bol navyše potvrdený významným poklesom infekcie HBV po stlmení klatrínového ťažkého reťazca (CHC) a AP-2. Štúdia uskutočnená v roku 2018 skúmala absorpciu HBV do buniek HepG2-NTCP a preukázala, že silibinín (liek o ktorom je známe, že inhibuje klatrínom sprostredkovanú endocytózu), znižoval vstup HBV. Okrem toho, analýza elektrónovou mikroskopiou odhalila, že častice HBV boli prítomné vo vezikulách potiahnutých klatrínom v skorom štádiu infekcie. Tieto údaje teda potvrdzujú predstavu, že klatrínom sprostredkovaná endocytóza je hlavným spôsobom vstupu pre HBV, aj keď kaveolínom sprostredkovaná endocytóza možno taktiež zohráva určitú úlohu.

Objavenie NTCP malo teda za následok obrovský pokrok vo viacerých oblastiach. Primárne hepatocyty Tupaia a bunková línia HepaRG prispeli k objasneniu vírusovej vstupnej dráhy a

úlohy vírusových proteínov vo vstupnom procese. Objavenie NTCP ako vstupného receptora pre HBV (HDV) viedlo k vytvoreniu modelov bunkových kultúr účinných na infekciu HBV a k identifikácii nových antivírusových zlúčenín. Watashi a Wakita (2015) tvrdia, že zrazenie endogénneho NTCP v HepaRG, PTH a primárnych ľudských hepatocytoch (PHH) viedla k zníženiu infekcií HBV a zároveň, že ektopická expresia NTCP prepožičiava vírusovú citlivosť bunkám HepG2 a Huh-7, ktoré inak nepodporujú infekciu HBV. Tento posledný fakt potvrdzujú aj ďalší ako napríklad Thomas a Liang (2016), Allweiss a Dandri (2016) alebo Wose Kinge et al. (2020). Yan et al. (2015) túto skutočnosť spomenuli tiež, ale zmienili sa o tom len v prípade buniek HepG2. Tieto, ale aj ďalšie údaje potvrdzujú, že NTCP je nevyhnutný pri HBV a zároveň, zdôrazňujú jeho dôležitú úlohu pri umožnení náchylnosti buniek na infekciu.

To, že NTCP je hlavným vstupným receptorom pre HBV (HDV) bolo spomenuté vo viacerých štúdiách. Avšak zohráva NTCP nejakú úlohu aj pri HCV? V jednej štúdii exogénna expresia NTCP v bunkách hepatómu Huh7.5.1 zvýšila infekciu HCV, zatiaľ čo potlačenie expresie NTCP znížilo vstup HCV (Verrier et al. 2016a). Na skúmanie účinku expresie NTCP na HCV infekciu sa bunková línia Huh7.5.1 transdukovala, aby exprimovala ľudský NTCP. Bunky Huh7.5.1-NTCP exprimovali významne vyššie hladiny NTCP mRNA a proteínov a povrchové hladiny NTCP ako pôvodné bunky Huh7.5.1. Na posúdenie, či expresia NTCP ovplyvňuje infekciu HCV sa použili HCVcc a HCVpp rôznych genotypov. Expresia NTCP významne zvýšila infekciu HCVcc (Jc1 a JcR2A) a vstup HCVpp (genotypy 1b, 2a, 3a a 4) v porovnaní s pôvodnými (rodičovskými) bunkami. Úloha NTCP pri infekcii HCV sa potvrdzovala umlčaním expresie NTCP v bunkách Huh7.5.1-NTCP pomocou siRNA zameranej na NTCP pred infekciou HCVcc. Po umlčaní NTCP v bunkách Huh7.5.1-NTCP sa celková expresia proteínu znížila o približne 80%, čo zodpovedalo významnému zníženiu infekcie HCVcc (Verrier et al. 2016a). Eller et al. (2018) uvádzajú, že NTCP uľahčuje infekciu HCV moduláciou vrodenej antivírusovej reakcie prostredníctvom funkcie transportu žlčových kyselín. Keďže sa ukázalo, že žlčové kyseliny zvyšujú replikáciu HCV, tak je pravdepodobné, že expresia a aktivita NTCP moduluje infekciu HCV prostredníctvom multimodálneho mechanizmu účinku. Verrier et al. (2016a) v článku udávajú, že použitím analýz microarray v bunkových líniiach a PHH sa zistilo, že transport žlčových kyselín sprostredkovaný NTCP reguluje vrodenej antivírusovej reakcie, čím inhibuje infekciu HCV a odhaľuje tak jeho regulačnú úlohu pri infekcii hostiteľskými bunkami HCV a potenciálnu imunomodulačnú aktivitu. Na rozdiel od HBV ale nebola identifikovaná žiadna priama interakcia medzi obalovými proteínmi HCV a NTCP. Namiesto toho sa zistilo, že funkcia transportéra žlčových kyselín NTCP je dôležitá pre vstup HCV. Je známe, že žlčové kyseliny modulujú bunkové antivírusové reakcie inhibíciou signalizácie interferónu typu I a tým znižujú expresiu génov stimulovaných IFN (ISG). Ukázalo sa, že NTCP reguluje infekciu HCV indukciou represie ISG sprostredkovanou žlčovými kyselinami v hepatocytoch vrátane IFITM1, IFITM2 a

IFITM3. Je známe, že tieto transmembránové proteíny obmedzujú vstup niekoľkých vírusov, vrátane HCV. IFITM1 blokuje interakciu medzi HCV a jeho receptormi, zatiaľ čo IFITM2 a IFITM3 inhibujú vstup v kroku po endocytóze blokovaním uvoľňovania viriónov do cytoplazmy (Eller et al. 2018).

Oproti HBV alebo HDV, ktoré pre svoj vstup vyžadujú priamu interakciu s NTCP, tak NTCP moduluje vstup HCV nezávisle od mechanizmov priamej väzby. Taktiež je dosť málo pravdepodobné, že by účinok NTCP na infekciu HCV zahŕňal HCV E2 alebo väzobné faktory CD81 a SR-BI. Expressia NTCP nemodulovala ani expresiu vstupných faktorov CLDN1 a OCLN alebo EGFR (Verrier et al. 2016a). Navyše, činidlá zamerané na NTCP v klinickom vývoji môžu tiež inhibovať infekciu HCV, čo je zaujímavé najmä u pacientov so súčasnou infekciou HBV / HDV / HCV (Verrier et al. 2016a). Myrcludexom B sprostredkovaná inhibícia NTCP blokuje import žľových kyselín, čo následne stimuluje expresiu ISG a inhibuje vstup HCV a infekciu (Eller et al. 2018). V jednej zo štúdií sa skúmala úloha NTCP v súvislosti s prenosom z bunky na bunku a výsledky naznačujú, že NTCP môže skutočne zohrávať úlohu aj v tomto šírení medzi bunkami (Verrier et al. 2016a). Všetky tieto zistenia v súvislosti s NTCP podporujú jeho zásadnú úlohu v zmysle interakcie vírusu s hepatocytmi. Bližšie skúmanie funkcie NTCP v súvislosti s HCV by mohlo znamenať veľký krok vpred, avšak v súčasnosti sú potrebné bližšie výskumy, nakoľko je táto problematika v článkoch málokedy spomenutá. Môže to byť aj faktom, že NTCP sa v článkoch spája najmä v súvislosti s HBV a HDV a v prípade HCV existuje stále málo informácií o problematike v spojitosti s NTCP. Podstatné ale je, že si vedci túto skutočnosť uvedomujú a v blízkej dobe by sa tak mohlo objaviť značne väčšie množstvo štúdií.

Vírusové hepatitídy B a C sú charakteristické svojou schopnosťou pretrvávania v organizme aj po vymiznutí primárnej infekcie. V prípade HBV sa v tejto súvislosti spomína cccDNA, ktorá je schopná naštartovať opätovne cyklus infekcie a navyše pretrváva v organizme v dostatočne stabilnej forme. U HCV je dôvod perzistencie menej jasný. Lohmann (2019) uvádza, že pozitívne reťazové RNA vírusy zvyčajne spôsobujú skôr akútne ako perzistentné infekcie, avšak HCV je výnimkou, nakoľko spôsobuje pretrvávajúce infekcie u 70% infikovaných osôb. Biológia chronicity HCV a potenciálne mechanizmy, ktoré HCV využívajú na perzistenciu, nie sú dostatočne pochopené. Určité mechanizmy boli predpokladané najmä na základe nálezov z iných chronických vírusových infekcií, ako je vírus ľudskej imunodeficiencie (HIV) a HBV. Avšak v posledných rokoch došlo k nárastu štúdií, ktoré ukazujú, že HCV prijíma nespočetné množstvo mechanizmov na zrušenie vírusovo špecifických imunitných odpovedí u hostiteľa s cieľom nastolenia perzistencie. Ide najmä o vírusové únikové mutácie, vírusový rast na privilegovaných miestach a antagonizmus (Barathan et al. 2018). Úplné pochopenie všetkých potrebných aspektov perzistencie vírusu HCV v organizme by mohlo byť veľmi zásadným, nakoľko hovoríme

o jednom z hlavných problémov v súvislosti s liečbou. Na druhej strane by to ale nemuselo znamenať ľahko riešiteľný cieľ, ako to vidíme práve v prípade HBV (cccDNA).

Pretrvávajúce infekcia HBV a HCV sú navyše jedným z hlavných rizikových faktorov pre rozvoj HCC. Hu et al. (2019b) uviedli, že HBV je necytopatický vírus a nekóduje prototyp onkogénu. Poškodenie pečene je spôsobené imunitnou odpoveďou hostiteľa, ktorá vedie k zápalu, apoptóze a regenerácii a tiež k hromadeniu genetických a epigenetických zmien. Genomická nestabilita v dôsledku integrácie HBV DNA a zhoršenej opravy DNA, môže byť tiež významným faktorom prispievajúcim k hepatokarcinogéne (Hu et al. 2019b). Neriešený zápal významne prispieva k rozvoju a progresii HCC. V tejto súvislosti je dôležité vytknúť fakt, že v prípade HCV je veľký problém pri diagnostike tohto ochorenia a väčšina pacientov je asymptomatických, čo má za následok, že dochádzajú k lekárovi až keď je ochorenie v značne pokročilom štádiu. Je nutné podotknúť, že aj keď chronická infekcia HBV / HCV / HDV vedie k vyššej miere vývoja HCC, tak nie u všetkých trvale infikovaných jedincov sa rozvinie rakovina pečene. Toto pozorovanie teda naznačuje, že samotné vírusy pravdepodobne nie sú dostatočné na vývoj rakoviny. Mitchell et al. (2015) v článku napísali, že počas vírusovej infekcie vírusy generujú lncRNA na uľahčenie indukcie cytopaticity a patogenity. Navyše, rast rakovinových buniek si vyžaduje aj preprogramovanie metabolizmu bunky a zahŕňa tiež narušenie normálnych mechanizmov, ktoré regulujú bunkový cyklus a tým prispievajú k rozvoju rakoviny. Pretrvávajúci imunitne sprostredkovaný zápal pečene a s tým súvisiace fibrogénne reakcie na hojenie rán sú pravdepodobne dôležitými faktormi rakoviny pečene pri CHC. Aktivované zápalové bunky podporujú prokarcinogénne mikroprostredie uvoľňovaním reaktívnych foriem kyslíka (ROS) a dusíka (RNS) a indukujú peroxidáciu lipidov. Expresia niektorých proteínov HCV, najmä jadrového a NS5A môže tiež priamo prispievať k indukcii oxidačného stresu (Mitchell et al. 2015). Jedinci s CHB vykazujú 1,5- až 4-krát vyššiu hladinu oxidačného stresu (produkty 8-oxoguanínovej DNA, peroxidácia lipidov, oxidácia proteínov, znížená hladina antioxidantného enzýmu glutatiónu a vyššie oxidačné formy) v pečeni a plazme / sére v porovnaní s HBV negatívnymi jedincami. Extracelulárny oxidačný stres môže byť imunitne sprostredkovaný expresiou prozápalových cytokínov alebo uvoľňovaním ROS z bunkovej deštrukcie. Vnútorňý oxidačný stres v ER a mitochondriách môže byť sprostredkovaný proteínmi spojenými s HBV HBsAg, HBcAg a HBx (D'souza et al. 2020).

Vývoj dvoch odlišných skupín antivírusových látok proti hepatitíde C, DAA a HTA, viditeľne ovplyvnil možnosti liečby HCV. Mali za dôsledok najmä vyššiu mieru SVR v rámci infikovaných pacientov a zníženie nežiadúcich vedľajších účinkov v porovnaní s predošlou štandardnou liečbou. V posledných rokoch prešla terapia HCV revolúciou schválením viacerých DAA, ktoré umožňujú liečbu bez IFN so značným zlepšením SVR nad 90%. Eliminácia HCV je možná pomocou DAA, ale takáto liečba má stále niekoľko nevýhod. Ide najmä o obmedzený prístup k

liečbe, zlyhanie liečby u niektorých pacientov a pretrvávajúce riziko vzniku HCC po liečbe u pacientov s pokročilou fibrózou (Crouch et al. 2018). Kitab et al. (2021) uviedli, že diskusia ohľadom DAA v súvislosti s HCC stále pokračuje. Niektoré štúdie ukázali, že liečba DAA nebola spojená so zvýšeným vývojom HCC. Iné štúdie preukázali protichodné výsledky, ktoré naznačujú, že liečba DAA je spojená s nárastom recidívy HCC u pacientov predtým vyliečených transplantáciou pečene. Tieto zistenia spoločne naznačujú, že dohľad nad HCC by mal pokračovať najmä u pacientov s pokročilou fibrózou a cirhózou. Je zaujímavé, že pretrvávajúce riziko vzniku HCC po SVR u pacientov liečených DAA vyvoláva otázky o mechanizmoch, ktoré udržiavajú riziko HCC u týchto pacientov po vírusovej liečbe.

Rezistencia voči liekom zostáva výzvou v súčasnej a budúcej liečbe hepatitídy C. Konečným cieľom liečby HCV je režim bez IFN, ktorý je pangenotypový a vysoko účinný. Fofana et al. (2014) spomínajú, že vstupné inhibítory zamerané na hostiteľa pôsobením na bunkové ciele, ktoré sú menej náchylné na mutácie môžu spôsobiť vyššiu genetickú bariéru. Na vyliečenie infekcie HCV by mal totiž terapeutický liek kombinovať silný antivírusový účinok a vysokú genetickú bariéru vírusovej rezistencie. Na rozdiel od DAA, ktoré sa zameriavajú na vírusové proteíny s vysokou variabilitou, sa očakáva, že väčšina HTA bude mať vysokú genetickú bariéru vírusovej rezistencie, pretože hostiteľské faktory sú menej náchylné na mutácie. Okrem toho, HTA sú zvyčajne genotypovo nezávislé, a tak vykazujú pangenotypovú antivírusovú aktivitu. Hlavnou obavou pri používaní HTA je však ich interferencia s fyziologickými funkciami cielených hostiteľských faktorov, ktoré môžu vyvolať bunkovú toxicitu a vedľajšie účinky mutácie (Kitab et al. 2021). Výskum HTA sa zameril na množstvo bunkových hostiteľských faktorov, ktoré sú potrebné pre vstup a replikáciu vírusu HCV, ako je napr. receptor SR-BI, cyklofilín A (CypA), 3-hydroxy-3-metylglutaryl-CoA reductáza (HMGCoA reductáza), syntáza mastných kyselín (FASN) a miRNA-122. Takéto zacielenie sa na hostiteľské faktory potrebné pre vírusovú infekciu je pravdepodobne atraktívnou doplnkovou stratégiou na riešenie problémov DAA. Môžeme teda všeobecne skonštatovať, že kombinácia HTA a DAA by mohla zlepšiť liečbu prostredníctvom kombinovaného mechanizmu účinku a zlepšiť tak liečbu ťažko liečiteľných pacientov s CHC.

Liečba CHB je náročnou a stále neuspokojivou oblasťou na celom svete. Napriek vývoju perorálnych NA a rozšírenému používaniu imunitných stimulátorov, ako sú IFN- $\alpha$  alebo PEG-IFN- $\alpha$  je stále potrebné zlepšenie štandardov liečby CHB. Problém liečby CHB začína samotnou povahou vírusu HBV. Dôvodom je jeho zložitosť samotného replikačného cyklu, čo síce vedie k viacerým potenciálnym terapeutickým cieľom, ale niektoré z nich zostávajú nezládnuteľné. Množstvo štúdií vyzdvihuje liečbu pomocou NA. NA majú ale zásadnú nevýhodu a to tú, že sa nemôžu zacieliť na cccDNA (Hu et al. 2019b). Tým pádom NA nedokážu CHB vyliečiť, nakoľko cccDNA naďalej pretrváva v jadre hepatocytov. Novým cieľom terapie HBV je teda dosiahnuť „funkčné vyliečenie“ alebo dokonca „absolútne vyliečenie“ so stratou / sérokonverziou HBsAg a

klírensom cccDNA. Začínajú sa objavovať nové látky (DAA a HTA) pre CHB. Inhibítory vstupu HBV, siRNA, inhibítory kapsidov, CRISPR / Cas9 sa zdajú byť veľmi účinné ale sú len v skorom štádiu vývoja. Nové lieky zamerané na zníženie alebo elimináciu cccDNA a / alebo HbsAg sa taktiež zdajú byť sľubné. cccDNA je teda vynikajúci cieľ, pretože eliminácia / kontrola cccDNA vedie k liečbe HBV. Inhibítory nukleokapsidov inhibujú tvorbu a zhromažďovanie častíc jadra, čo vedie k zlyhaniu produkcie zrelého viriónu a blokovaniu dopĺňovania cccDNA. Tieto liečebné postupy by mohli napomôcť manažmentu liečby CHB, avšak sú potrebné ďalšie štúdie, nie len čo sa týka ich účinnosti, ale aj prípadných nežiadúcich účinkov.

Na predikciu infekčného cyklu vírusu a na štúdium testovania nových liečiv zameraných na hepatitídy sú potrebné ľudské pečeňové bunky, odrážajúce funkciu orgánu in vivo. Okrem toho musia byť bunky dostupné vo veľkom počte a v konštantnej kvalite. Každý zo súčasných dostupných zdrojov pečeňových buniek má svoje špecifické výhody, ale aj nedostatky. PHH síce vykazuje funkcie podobné pečeni, ale ich použitie vo väčších skriningových štúdiách je obmedzené ich dostupnosťou. Naproti tomu línie hepatómových buniek a pluripotentné kmeňové bunky sa vyznačujú vysokou proliferačnou kapacitou a bohatou dostupnosťou, zatiaľ čo ich použitiu bránia určité funkčné odchýlky (bunky hepatómu) alebo neúplné dozrievanie (pluripotentné kmeňové bunky). Prístupy založené na komplexných technológiách 2D a 3D kultúry sú dôležité na zlepšenie prediktívnej hodnoty a spoľahlivosti modelov pečene in vitro vo farmakologickom výskume a modelovaní chorôb (Zeilinger et al. 2016). Revill et al. (2019) uviedli, že transformovaná povaha hepatómových buniek má za dôsledok, že úplne neodrážajú primárne pečeňové bunky. Aj keď sú PHH prirodzené cieľové bunky na infekciu HBV in vivo, tak je ich použitie obmedzené nutnosťou použitia PEG a DMSO a vysokým množstvom vstupného vírusu na infekciu. Navyše sú drahé, majú obmedzenú polarizáciu a životnosť in vitro. Rozdiely medzi šaržami ovplyvňujú účinnosť infekcie a reakcie na infekciu. Z toho vyplýva, že ideálne by bolo objavenie modelov in vitro, ktoré by eliminovali potrebu PEG a zabezpečili by jednotnosť infekcie medzi laboratóriami. Thomas a Liang (2016) zmienili, že bunky HepG2, ktoré stabilne exprimujú NTCP sú vhodné na štúdium infekcie HBV infekčnými viriónmi a tak sa uľahčilo rutinné a spoľahlivé štúdium celého životného cyklu HBV. Na druhej strane, Wose Kinge et al. (2020) vo svojom článku píše, že aj keď vylepšené techniky výrazne zvýšili účinnosť infekcie buniek exprimujúcich NTCP, systém stále nedokáže rekapitulovať celý životný cyklus HBV. Ako dôvod uviedli ten, že na rozdiel od in vivo, systém vyžaduje veľmi vysokú multiplicitu infekcie (MOI), infekcia je krátkodobá, nevedie k podstatnému rozšíreniu vírusu a je detegované iba malé množstvo cccDNA. HLC diferencované in vitro od embryonálnych kmeňových buniek alebo od indukovaných pluripotentných kmeňových buniek a trojrozmerné mikrofluidné kultúry pečene majú šancu tieto kritéria splniť a umožniť analýzu kompletného životného cyklu HBV.



Vývoj systému bunkovej kultúry založeného na klone HCV JFH-1 a bunkovej línii hepatómu Huh-7 pochádzajúceho z človeka bol prelomom vo výskume HCV (So a Randall 2021). Imunitne oslabené modely myši, ktoré rekapitulujú celý životný cyklus HCV, boli užitočné pri skúmaní mnohých aspektov životného cyklu HCV vrátane antivírusových zásahov. Myši si ale vyžadujú humanizáciu pečene, aby sa stali náchylnými na infekciu HCV, prípadne sa vírus môže prispôbiť prostrediu myši. K dispozícii sú imunokompetentné myši s (geneticky) humanizovanou pečeňou, ale majú za následok ďalšiu optimalizáciu (Vercauteren et al. 2015). Revill et al. (2019) uviedli, že ani žiadny zo súčasných zvieracích modelov HBV nie je optimálny, najmä v súvislosti s výskumom liečby HBV. Od šimpanza sa upustilo a jediný primát, ktorý je výskumnej komunite k dispozícii je Tupaia. Tento model má však tiež svoje nevýhody. Expressia NTCP na hepatocytoch makaka po infekcii rekombinantným vírusovým vektorom viedlo k infekcii HBV. Ak by sa tento model zlepšil, mal by potenciál nielen lepšie pochopiť imunobiológiu a patogenézu infekcie HBV a testovať imunomodulačné prístupy k liečbe chronickej infekcie HBV, ale aj študovať terapeutický potenciál liekov zameraných na HBV vrátane tých, ktoré sa zameriavajú na cccDNA. Navyše dodávajú, že sú presvedčení o tom, že vytvorenie modelu ľudského transgéneho makaka-NTCP by mohlo mať vysokú prioritu pre výskumnú komunitu liečenú HBV (Revill et al. 2019). Transfektované, transdukované alebo transgéne myši s genómami HBV môžu podporovať len replikáciu HBV, pričom životný cyklus HBV je neúplný z dôvodu nedostatočného vstupu vírusu, tvorby cccDNA a vírusového šírenia. Ľudské pečeňové bunky podporujúce infekciu HBV sa transplantujú do imunodeficientných myši. Tieto myši, ale vykazujú zjavnú imunodeficienciu a ich udržiavacie systémy sú veľmi zložité (Guo et al. 2018). Napriek existencii modelov imunodeficientných humanizovaných myši, ktoré umožňujú štúdie infekcie HBV a šírenie in vivo, ako aj hodnotenie účinnosti priamych antivírusových zlúčenín v PHH infikovaných HBV, imunokompetentné modely myši, ktoré sú náchylné na infekciu HBV začínajú byť k dispozícii až teraz. Humanizované modely myši tiež umožnia štúdie o dlhodobých účinkoch liekov na udržiavanie cccDNA. Ďalší vývoj modelov dvojitej humanizovanej myši (pečeň a imunitný systém) umožní štúdiom imunitne sprostredkovaného klírensu. Narušenie súčasného vnútrobunkového bloku proti infekcii HBV a tvorbe cccDNA v myších hepatocytoch by vytvorilo malý zvierací model, ktorý umožňuje analýzu imunitnej odpovede na HBV, ktorá môže uľahčiť elimináciu a kontrolu cccDNA sprostredkovanú imunitným systémom, podobne ako klírens akútnej infekcie HBV (Revill et al. (2019). Revill et al. (2019) sa taktiež domnievajú, že ďalší vývoj humanizovaných modelov myši, ktoré sú prístupné infekcii HBV, by mal dostať vysokú prioritu vzhľadom na ich veľký potenciál umožniť štúdie mechanizmov regulujúcich metabolizmus a klírens cccDNA.

## 8. ZÁVER

Vírusové hepatitídy B a C predstavujú už dlhodobo známy a ťažko riešiteľný problém. HBV a HCV sú charakteristické svojou perzistenciou v organizme, prechodom do chronického štádia ochorenia a rozvojom HCC, čo z nich robí dostatočne adekvátnu hrozbu pre ľudstvo. Ich vcelku zložitý životný cyklus spojený s nedostatkom modelových systémov do značnej miery sťažuje vývoj nových liečiv.

Vzhľadom ale na neustálu snahu vedeckých pracovníkov sa objasnilo množstvo donedávna neznámych mechanizmov a vstupných faktorov (prelomový NTCP), čím sa terapia týchto ochorení posunula za posledné roky výrazne dopredu. Novo vyvíjané liečivá zahŕňajúce DAA a HTA, preukázali oproti doterajším liečebným postupom výrazne lepšiu účinnosť. Stále sú však potrebné ďalšie štúdie, vzhľadom na ich efektívnosť, bezpečnosť a možné účinnejšie spôsoby kombinácie. Eliminácia HCV je vďaka DAA možná, čo potvrdzuje vysoká miera SVR. Úplné vyliečenie hepatitídy B je ale stále ťažko dosiahnuteľné. Aj keď sa v posledných rokoch zaznamenal obrovský pokrok v manažmente liečby a súčasné liečebné postupy sú primerané, tak ešte stále nie sú úplne ideálne. Navyše je urgentná potreba nových, efektívnejších a robustných modelových systémov na zlepšenie našich vedomostí o týchto hepatitídach.

Kombinácia zlúčenín zameraných na vstupné faktory a doplnkové kroky vírusového životného cyklu, ako je replikácia sa zdajú byť sľubným liečebným postupom. Nie len naplnenie cieľov liečby, ale aj včasná identifikácia infikovaných pacientov a dostupnosť nových liečiv pre širokú verejnosť budú hlavnými výzvami do budúcnosti. Úplné vyliečenie hepatitídy B a C je síce náročným, ale určite nie nedosiahnuteľným cieľom, ktorý sa snáď v blízkej budúcnosti naplní.

## 9. LITERATÚRA

Ahmed S, Zahoor A, Ibrahim M, et al. Enhanced Efficacy of Direct-Acting Antivirals in Hepatitis C Patients by Coadministration of Black Cumin and Ascorbate as Antioxidant Adjuvants. *Oxid Med Cell Longev.* 2020;2020:7087921. Published 2020 Jun 3. doi:10.1155/2020/7087921

Albecka A, Montserret R, Krey T, et al. Identification of new functional regions in hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *J Virol.* 2011;85(4):1777-1792. doi:10.1128/JVI.02170-10

Alberione, M P., Moeller, R., Kirui, J., Ginkel, C., Doepke, M. et al. (2020) Single-nucleotide variants in human CD81 influence hepatitis C virus infection of hepatoma cells *Medical Microbiology and Immunology*, 209(4): 499-514

Alexopoulou A, Vasilieva L, Karayiannis P. New Approaches to the Treatment of Chronic Hepatitis B. *J Clin Med.* 2020;9(10):3187. Published 2020 Oct 1. doi:10.3390/jcm9103187

Allweiss L, Dandri M. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2016;64(1 Suppl):S17-S31. doi:10.1016/j.jhep.2016.02.012

Arends JE, Lieveld FI, Ahmad S, Ustianowski A. New Viral and Immunological Targets for Hepatitis B Treatment and Cure: A Review. *Infect Dis Ther.* 2017;6(4):461-476. doi:10.1007/s40121-017-0173-y

Bagga S, Bouchard MJ. Cell cycle regulation during viral infection. *Methods Mol Biol.* 2014;1170:165-227. doi:10.1007/978-1-4939-0888-2\_10

Balagopal A, Grudda T, Ribeiro RM, et al. Single hepatocytes show persistence and transcriptional inactivity of hepatitis B. *JCI Insight.* 2020;5(19):e140584. Published 2020 Oct 2. doi:10.1172/jci.insight.140584

Banse P, Moeller R, Bruening J, et al. CD81 Receptor Regions outside the Large Extracellular Loop Determine Hepatitis C Virus Entry into Hepatoma Cells. *Viruses.* 2018;10(4):207. Published 2018 Apr 20. doi:10.3390/v10040207

Barathan M, Mohamed R, Yong YK, et al. Viral Persistence and Chronicity in Hepatitis C Virus Infection: Role of T-Cell Apoptosis, Senescence and Exhaustion. *Cells.* 2018;7(10):165. Published 2018 Oct 12. doi:10.3390/cells7100165

Barrow E, Nicola AV, Liu J. Multiscale perspectives of virus entry via endocytosis. *Virol J.* 2013;10:177. Published 2013 Jun 5. doi:10.1186/1743-422X-10-177

Bartosch B, Dubuisson J. Recent Advances in Hepatitis C Virus Cell Entry. *Viruses*. 2010; 2(3):692-709. doi:10.3390/v2030692

Baudi I, Inoue T, Tanaka Y. Novel Biomarkers of Hepatitis B and Hepatocellular Carcinoma: Clinical Significance of HBcrAg and M2BPGi. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3):949. Published 2020 Jan 31. doi:10.3390/ijms21030949

Baugh JM, Garcia-Rivera JA, Gallay PA. Host-targeting agents in the treatment of hepatitis C: a beginning and an end?. *Antiviral Res*. 2013;100(2):555-561. doi:10.1016/j.antiviral.2013.09.020

Baumert TF, Berg T, Lim JK, Nelson DR. Status of Direct-Acting Antiviral Therapy for Hepatitis C Virus Infection and Remaining Challenges. *Gastroenterology*. 2019;156(2):431-445. doi:10.1053/j.gastro.2018.10.024

Bissig KD, Wieland SF, Tran P, et al. Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest*. 2010;120(3):924-930. doi:10.1172/JCI40094

Blight KJ, Norgard EA. HCV Replicon Systems. In: Tan SL, ed. *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology*. Norfolk (UK): Horizon Bioscience; 2006.

Block TM, Rawat S, Brosgart CL. Chronic hepatitis B: A wave of new therapies on the horizon. *Antiviral Res*. 2015;121:69-81. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.014

Bukh J. The history of hepatitis C virus (HCV): Basic research reveals unique features in phylogeny, evolution and the viral life cycle with new perspectives for epidemic control. *J Hepatol*. 2016;65(1 Suppl):S2-S21. doi:10.1016/j.jhep.2016.07.035

Burlone ME, Budkowska A. Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 5):1055-1070. doi:10.1099/vir.0.008300-0

Buskirk, J. *Ribavirin: Biochemistry, Clinical Applications and Potential Side Effects*. 2013. ISBN 9781628088137.

Cann AJ. Replication of Viruses. *Encyclopedia of Virology*. 2008;406-412. doi:10.1016/B978-012374410-4.00486-6

Carcamo WC, Nguyen CQ. Advancement in the development of models for hepatitis C research. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2012;2012.

Casaos J, Gorelick NL, Huq S, Choi J, Xia Y, Serra R, Felder R, Lott T, Kast RE, Suk I, Brem H, Tyler B, Skuli N. The Use of Ribavirin as an Anticancer Therapeutic: Will It Go Viral? *Mol Cancer Ther*. 2019 Jul;18(7):1185-1194. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-18-0666. PMID: 31263027.

Catanese MT, Dorner M. Advances in experimental systems to study hepatitis C virus in vitro and in vivo. *Virology*. 2015;479-480:221-233. doi:10.1016/j.virol.2015.03.014

Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J. Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*. 2006;87(Pt 5):1075-1084. doi:10.1099/vir.0.81646-0

Colpitts CC, Tsai PL, Zeisel MB. Hepatitis C Virus Entry: An Intriguingly Complex and Highly Regulated Process. *Int J Mol Sci*. 2020;21(6):2091. Published 2020 Mar 18. doi:10.3390/ijms21062091

Cornberg M, Lok AS, Terrault NA, Zoulim F; 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference Faculty. Guidance for design and endpoints of clinical trials in chronic hepatitis B - Report from the 2019 EASL-AASLD HBV Treatment Endpoints Conference [published online ahead of print, 2019 Nov 12]. *Hepatology*. 2019;10.1002/hep.31030. doi:10.1002/hep.31030

Crouchet E, Wrensch F, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Host-targeting therapies for hepatitis C virus infection: current developments and future applications. *Therap Adv Gastroenterol*. 2018;11:1756284818759483. Published 2018 Mar 21. doi:10.1177/1756284818759483

Dai X, Zhang X, Ostrikov K, Abrahamyan L. Host receptors: the key to establishing cells with broad viral tropism for vaccine production. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46(2):147-168. doi:10.1080/1040841X.2020.1735992

Del Campo JA, Rojas Á, Romero-Gómez M. Entry of hepatitis C virus into the cell: a therapeutic target. *World J Gastroenterol*. 2012;18(33):4481-4485. doi:10.3748/wjg.v18.i33.4481

Do A, Reau NS. Chronic Viral Hepatitis: Current Management and Future Directions. *Hepatol Commun*. 2020 Jan 20;4(3):329-341.

Donkers JM, Appelman MD, van de Graaf SFJ. Mechanistic insights into the inhibition of NTCP by myrcludex B. *JHEP Rep*. 2019;1(4):278-285. Published 2019 Aug 1. doi:10.1016/j.jhepr.2019.07.006

Douam F, Ding Q, Ploss A. Recent advances in understanding hepatitis C. *F1000Res*. 2016;5:F1000 Faculty Rev-131. Published 2016 Feb 3. doi:10.12688/f1000research.7354.1

Douam F, Lavillette D, Cosset FL. The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015;129:63-107. doi:10.1016/bs.pmbts.2014.10.003

D'souza S, Lau KC, Coffin CS, Patel TR. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2020;26(38):5759-5783. doi:10.3748/wjg.v26.i38.5759

Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S3-S13. doi:10.1016/j.jhep.2014.06.031

Duncan JD, Urbanowicz RA, Tarr AW, Ball JK. Hepatitis C Virus Vaccine: Challenges and Prospects. *Vaccines.* 2020; 8(1):90. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010090>

Elgner F, Hildt E, Bender D. Relevance of Rab Proteins for the Life Cycle of Hepatitis C Virus. *Front Cell Dev Biol.* 2018;6:166. Published 2018 Dec 4. doi:10.3389/fcell.2018.00166

Eller C, Heydmann L, Colpitts CC, Verrier ER, Schuster C, Baumert TF. The functional role of sodium taurocholate cotransporting polypeptide NTCP in the life cycle of hepatitis B, C and D viruses. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75(21):3895-3905. doi:10.1007/s00018-018-2892-y

Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses.* 2014;6(2):535-572. Published 2014 Feb 6. doi:10.3390/v6020535

Fénéant L, Potel J, François C, et al. New Insights into the Understanding of Hepatitis C Virus Entry and Cell-to-Cell Transmission by Using the Ionophore Monensin A. *J Virol.* 2015;89(16):8346-8364. doi:10.1128/JVI.00192-15

Fofana I, Jilg N, Chung RT, Baumert TF. Entry inhibitors and future treatment of hepatitis C. *Antiviral Res.* 2014;104:136-142. doi:10.1016/j.antiviral.2014.02.001

Geddawy A, Ibrahim YF, Elbahie NM, Ibrahim MA. Direct Acting Anti-hepatitis C Virus Drugs: Clinical Pharmacology and Future Direction. *J Transl Int Med.* 2017;5(1):8-17. Published 2017 Mar 31. doi:10.1515/jtim-2017-0007

Gerresheim GK, Roeb E, Michel AM, Niepmann M. Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells. *Cells.* 2019;8(11):1410. Published 2019 Nov 8. doi:10.3390/cells8111410

Gish RG. Treating HCV with ribavirin analogues and ribavirin-like molecules. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan;57(1):8-13. doi: 10.1093/jac/dki405. Epub 2005 Nov 17. Erratum in: *J Antimicrob Chemother.* 2006 Aug;58(2):488.

Glasa J., Skladaný E., Holomán J., Liečba chronickej vírusovej hepatitídy C, Metodický list Ústrednej komisie racionálnej farmakoterapie a liekovej politiky MZ SR, 2004, ročník 8, 34., 4-5.

González-Grande R, Jiménez-Pérez M, González Arjona C, Mostazo Torres J. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol.* 2016;22(4):1421-1432. doi:10.3748/wjg.v22.i4.1421

Grassi G, Di Caprio G, Fimia GM, Ippolito G, Tripodi M, Alonzi T. Hepatitis C virus relies on lipoproteins for its life cycle. *World J Gastroenterol.* 2016;22(6):1953-1965. doi:10.3748/wjg.v22.i6.1953

Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol.* 2011;195(7):1071-1082. doi:10.1083/jcb.201108131

Guo WN, Zhu B, Ai L, Yang DL, Wang BJ. Zvieracie modely na štúdium infekcie vírusom hepatitídy B. *Zool Res.* 2018;39(1):25-31. doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2018.013

Harris HJ, Farquhar MJ, Mee CJ, et al. CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol.* 2008;82(10):5007-5020. doi:10.1128/JVI.02286-07

He Q, Li W, Ren J, et al. ZEB2 inhibits HBV transcription and replication by targeting its core promoter. *Oncotarget.* 2016;7(13):16003-16011. doi:10.18632/oncotarget.743

Herrscher C, Roingard P, Blanchard E. Hepatitis B Virus Entry into Cells. *Cells.* 2020;9(6):1486. Published 2020 Jun 18. doi:10.3390/cells9061486

Hézode C, Bronowicki JP. Ideal oral combinations to eradicate HCV: The role of ribavirin. *J Hepatol.* 2016 Jan;64(1):215-25. doi: 10.1016/j.jhep.2015.09.009. Epub 2015 Sep 26. PMID: 26409316.

Hu J, Lin YY, Chen PJ, Watashi K, Wakita T. Cell and Animal Models for Studying Hepatitis B Virus Infection and Drug Development. *Gastroenterology.* 2019a;156(2):338-354. doi:10.1053/j.gastro.2018.06.093

Hu J, Protzer U, Siddiqui A. Revisiting Hepatitis B Virus: Challenges of Curative Therapies. *J Virol.* 2019b;93(20):e01032-19. Published 2019 Sep 30. doi:10.1128/JVI.01032-19

Hůlek P., Urbánek P., kolektiv, *Hepatologie*, 3. vydání 2018, Grada, 2018.

Hwang JR, Park SG. Mouse models for hepatitis B virus research. *Lab Anim Res.* 2018;34(3):85-91. doi:10.5625/lar.2018.34.3.85

Chakraborty A, Ko C, Henning C, et al. Synchronised infection identifies early rate-limiting steps in the hepatitis B virus life cycle. *Cell Microbiol.* 2020;22(12):e13250. doi:10.1111/cmi.13250

Chatterji U, Garcia-Rivera JA, Baugh J, et al. The combination of alisporivir plus an NS5A inhibitor provides additive to synergistic anti-hepatitis C virus activity without detectable cross-resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(6):3327-3334. doi:10.1128/AAC.00016-14

Inuzuka T, Takahashi K, Chiba T, Marusawa H. Mouse models of hepatitis B virus infection comprising host-virus immunologic interactions. *Pathogens*. 2014;3(2):377-389. Published 2014 Apr 23. doi:10.3390/pathogens3020377

Irshad M, Gupta P, Irshad K. Molecular targeting of antiviral drugs used against hepatitis C virus infection. *Hepatoma Res* 2018;4:23. doi:0.20517/2394-5079.2018.25

Ji M, Mei X, Jing X, Xu X, Chen X, Pan W. The cooperative complex of Argonaute-2 and microRNA-146a regulates hepatitis B virus replication through flap endonuclease 1. *Life Sci*. 2020;257:118089. doi:10.1016/j.lfs.2020.118089

Jiang B, Hildt E. Intracellular Trafficking of HBV Particles. *Cells*. 2020;9(9):2023. Published 2020 Sep 2. doi:10.3390/cells9092023

Kang L, Pan J, Wu J, Hu J, Sun Q, Tang J. Anti-HBV Drugs: Progress, Unmet Needs, and New Hope. *Viruses*. 2015;7(9):4960-4977. Published 2015 Sep 15. doi:10.3390/v7092854

Kitab B., Kohara M., Tsukiyama-Kohara K. Host-Targeting Antivirals for Treatment of Hepatitis C. IntechOpen. 2021. Published 2021 Jan 25. DOI: 10.5772/intechopen.95373.

Koh C, Liang TJ. What is the future of ribavirin therapy for hepatitis C? *Antiviral Res*. 2014 Apr;104:34-9. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.01.005. Epub 2014 Jan 25. PMID: 24468277; PMCID: PMC6299454.

König A, Yang J, Jo E, et al. Efficient long-term amplification of hepatitis B virus isolates after infection of slow proliferating HepG2-NTCP cells. *J Hepatol*. 2019;71(2):289-300. doi:10.1016/j.jhep.2019.04.010

Kostrábová A., Pastoreková S., Betáková T. Biosyntéza vírusov I. diel. 2017. ISBN 978-80-223-4402-9.

Kunden RD, Khan JQ, Ghezelbash S, Wilson JA. The Role of the Liver-Specific microRNA, miRNA-122 in the HCV Replication Cycle. *Int J Mol Sci*. 2020;21(16):5677. Published 2020 Aug 7. doi:10.3390/ijms21165677

Lee HW, Lee JS, Ahn SH. Hepatitis B Virus Cure: Targets and Future Therapies. *Int J Mol Sci*. 2020;22(1):213. Published 2020 Dec 28. doi:10.3390/ijms22010213

Lempp FA, Urban S. Inhibitors of hepatitis B virus attachment and entry. *Intervirology*. 2014;57(3-4):151-157. doi:10.1159/000360948



Lin CL, Kao JH. Hepatitis B viral factors and treatment responses in chronic hepatitis B. *J Formos Med Assoc.* 2013;112(6):302-311. doi:10.1016/j.jfma.2013.02.001

Liu F, Shimakami T, Murai K, et al. Efficient Suppression of Hepatitis C Virus Replication by Combination Treatment with miR-122 Antagonism and Direct-acting Antivirals in Cell Culture Systems. *Sci Rep.* 2016b;6:30939. Published 2016 Aug 3. doi:10.1038/srep30939

Liu Q, Somiya M, Kuroda S. Elucidation of the early infection machinery of hepatitis B virus by using bio-nanocapsule. *World J Gastroenterol.* 2016a;22(38):8489-8496. doi:10.3748/wjg.v22.i38.8489

Lohmann V. Hepatitis C virus cell culture models: an encomium on basic research paving the road to therapy development. *Med Microbiol Immunol.* 2019;208, 3–24. doi:10.1007/s00430-018-0566-x

Macovei A, Radulescu C, Lazar C, et al. Hepatitis B virus requires intact caveolin-1 function for productive infection in HepaRG cells. *J Virol.* 2010;84(1):243-253. doi:10.1128/JVI.01207-09

Megahed FAK, Zhou X, Sun P. The Interactions between HBV and the Innate Immunity of Hepatocytes. *Viruses.* 2020;12(3):285. Published 2020 Mar 5. doi:10.3390/v12030285

Mettlen M, Chen PH, Srinivasan S, Danuser G, Schmid SL. Regulation of Clathrin-Mediated Endocytosis. *Annu Rev Biochem.* 2018;87:871-896. doi:10.1146/annurev-biochem-062917-012644

Mitchell JK, Lemon SM, McGivern DR. How do persistent infections with hepatitis C virus cause liver cancer?. *Curr Opin Virol.* 2015;14:101-108. doi:10.1016/j.coviro.2015.09.003

Mitra B, Thapa RJ, Guo H, Block TM. Host functions used by hepatitis B virus to complete its life cycle: Implications for developing host-targeting agents to treat chronic hepatitis B. *Antiviral Res.* 2018;158:185-198. doi:10.1016/j.antiviral.2018.08.014

Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut.* 2015;64(12):1972-1984. doi:10.1136/gutjnl-2015-309809

Negishi H, Taniguchi T, Yanai H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018;10(11):a028423. Published 2018 Nov 1. doi:10.1101/cshperspect.a028423

Nguyen MH, Wong G, Gane E, Kao JH, Dusheiko G. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy. *Clin Microbiol Rev.* 2020;33(2):e00046-19. Published 2020 Feb 26. doi:10.1128/CMR.00046-19

Ni Y, Urban S. Hepatitis B Virus Infection of HepaRG Cells, HepaRG-hNTCP Cells, and Primary Human Hepatocytes. *Methods Mol Biol.* 2017;1540:15-25. doi:10.1007/978-1-4939-6700-1\_2

Nicolini LA, Orsi A, Tatarelli P, Viscoli C, Icardi G, Sticchi L. A Global View to HBV Chronic Infection: Evolving Strategies for Diagnosis, Treatment and Prevention in Immunocompetent Individuals. *Int J Environ Res Public Health.* 2019;16(18):3307. Published 2019 Sep 9.

Niepmann M, Gerresheim GK. Hepatitis C Virus Translation Regulation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7):2328. Published 2020 Mar 27. doi:10.3390/ijms21072328

Ono C, Fukuhara T, Li S, et al. Various miRNAs compensate the role of miR-122 on HCV replication. *PLoS Pathog.* 2020;16(6):e1008308. Published 2020 Jun 23. doi:10.1371/journal.ppat.1008308

Palumbo E. Pegylated interferon and ribavirin treatment for hepatitis C virus infection. *Ther Adv Chronic Dis.* 2011;2(1):39-45. doi:10.1177/2040622310384308

Popescu CI, Riva L, Vlaicu O, Farhat R, Rouillé Y, Dubuisson J. Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism. *Biology (Basel).* 2014;3(4):892-921. Published 2014 Dec 15. doi:10.3390/biology3040892

Qian XJ, Zhu YZ, Zhao P, Qi ZT. Entry inhibitors: New advances in HCV treatment. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5(1):e3. Published 2016 Jan 6. doi:10.1038/emi.2016.3

Revill PA, Chisari FV, Block JM, et al. A global scientific strategy to cure hepatitis B [published correction appears in *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019 Jul;4(7):e7]. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2019;4(7):545-558. doi:10.1016/S2468-1253(19)30119-0

Riva L, Dubuisson J. Similarities and Differences Between HCV Pseudoparticle (HCVpp) and Cell Culture HCV (HCVcc) in the Study of HCV. *Methods Mol Biol.* 2019;1911:33-45. doi:10.1007/978-1-4939-8976-8\_2

Rong L, Perelson AS. Treatment of hepatitis C virus infection with interferon and small molecule direct antivirals: viral kinetics and modeling. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(2):131-148. doi:10.1615/critrevimmunol.v30.i2.30

Rybecká S., Liptáková A., Stuchlík S. HCV infection – more than 20 years of drug development. Department of Molecular Biology, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava 2Institute of Microbiology, Faculty of Medicine, Comenius University, Bratislava 3Science Park, Comenius University, Bratislava. *Newslab*, 2019; 10 (1): 37 – 39.

Ryu WS. Virus Life Cycle. *Molecular Virology of Human Pathogenic Viruses*. 2017;31-45. doi:10.1016/B978-0-12-800838-6.00003-5

Sai LT, Yao YY, Guan YY, Shao LH, Ma RP, Ma LX. Hepatitis B virus infection and replication in a new cell culture system established by fusing HepG2 cells with primary human hepatocytes. *J Microbiol Immunol Infect*. 2016;49(4):471-476. doi:10.1016/j.jmii.2014.08.008

Sakurai F, Mitani S, Yamamoto T, et al. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection. *Sci Rep*. 2017;7:45698. Published 2017 Apr 4. doi:10.1038/srep45698

Samreen B, Khaliq S, Ashfaq UA, et al. Hepatitis C virus entry: role of host and viral factors. *Infect Genet Evol*. 2012;12(8):1699-1709. doi:10.1016/j.meegid.2012.07.010 (Samreen et al. 2012).

San Martín C. Virus Maturation. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1215:129-158. doi:10.1007/978-3-030-14741-9\_7

Shaw J, Gosain R, Kalita MM, et al. Rationally derived inhibitors of hepatitis C virus (HCV) p7 channel activity reveal prospect for bimodal antiviral therapy. *Elife*. 2020;9:e52555. Published 2020 Nov 10. doi:10.7554/eLife.52555

Scheel TK, Rice CM. Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nat Med*. 2013;19(7):837-849. doi:10.1038/nm.3248

So C-W, Randall G. Three-Dimensional Cell Culture Systems for Studying Hepatitis C Virus. *Viruses*. 2021; 13(2):211.

Somiya M, Liu Q, Kuroda S. Current Progress of Virus-mimicking Nanocarriers for Drug Delivery. *Nanotheranostics*. 2017;1(4):415-429. Published 2017 Oct 31. doi:10.7150/ntno.21723

Spengler U. Direct antiviral agents (DAAs) - A new age in the treatment of hepatitis C virus infection. *Pharmacol Ther*. 2018;183:118-126. doi:10.1016/j.pharmthera.2017.10.009

Steven AC, Heymann JB, Cheng N, Trus BL, Conway JF. Virus maturation: dynamics and mechanism of a stabilizing structural transition that leads to infectivity. *Curr Opin Struct Biol*. 2005;15(2):227-236. doi:10.1016/j.sbi.2005.03.008

Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance. *World J Gastroenterol*. 2014;20(18):5427-5434. doi:10.3748/wjg.v20.i18.5427

Suzuki T. Hepatitis C Virus Replication. *Adv Exp Med Biol*. 2017;997:199-209. doi:10.1007/978-981-10-4567-7\_15

- Thomas E, Liang TJ. Experimental models of hepatitis B and C - new insights and progress. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016;13(6):362-374. doi:10.1038/nrgastro.2016.37
- Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol*. 2016;64(1 Suppl):S4-S16. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.027
- Tsai KN, Kuo CF, Ou JJ. Mechanisms of Hepatitis B Virus Persistence. *Trends Microbiol*. 2018;26(1):33-42. doi:10.1016/j.tim.2017.07.006
- Tsukiyama-Kohara K, Kohara M. Tupaia belangeri as an experimental animal model for viral infection. *Exp Anim*. 2014;63(4):367-374. doi:10.1538/expanim.63.367
- Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res*. 2020;182:104925. doi:10.1016/j.antiviral.2020.104925
- Veesler D, Johnson JE. Virus maturation. *Annu Rev Biophys*. 2012;41:473-496. gerrdoi:10.1146/annurev-biophys-042910-155407
- Vercauteren K, de Jong YP, Meuleman P. Animal models for the study of HCV. *Curr Opin Virol*. 2015;13:67-74. doi:10.1016/j.coviro.2015.04.009
- Verrier ER, Colpitts CC, Bach C, et al. Solute Carrier NTCP Regulates Innate Antiviral Immune Responses Targeting Hepatitis C Virus Infection of Hepatocytes. *Cell Rep*. 2016a;17(5):1357-1368. doi:10.1016/j.celrep.2016.09.084
- Verrier ER, Colpitts CC, Schuster C, Zeisel MB, Baumert TF. Cell Culture Models for the Investigation of Hepatitis B and D Virus Infection. *Viruses*. 2016b;8(9):261. Published 2016 Sep 20. doi:10.3390/v8090261
- Wahid B. Successful treatment of HBV, HCV, & HEV, with 12-week long use of tenofovir, sofosbuvir, daclatasvir, and ribavirin: A case report. *J Infect Public Health*. 2020;13(1):149-150. doi:10.1016/j.jiph.2019.06.004
- Wang J, Qu B, Zhang F, et al. Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cells as Model for Viral Hepatitis Research. *Stem Cells Int*. 2019;2019:9605252. Published 2019 Jun 12. doi:10.1155/2019/9605252
- Wang Y, Li Y. miR-146 promotes HBV replication and expression by targeting ZEB2. *Biomed Pharmacother*. 2018;99:576-582. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.097
- Wang Y, McGivern DR, Cheng L, et al. Ribavirin Contributes to Hepatitis C Virus Suppression by Augmenting pDC Activation and Type 1 IFN Production. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135232. Published 2015 Aug 14. doi:10.1371/journal.pone.0135232

Wang Z, Zhao Y, Zhang Y. Viral lncRNA: A regulatory molecule for controlling virus life cycle. *Noncoding RNA Res.* 2017;2(1):38-44. Published 2017 Mar 23. doi:10.1016/j.ncrna.2017.03.002

Watashi K, Sluder A, Daito T, et al. Cyclosporin A and its analogs inhibit hepatitis B virus entry into cultured hepatocytes through targeting a membrane transporter, sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP). *Hepatology.* 2014;59(5):1726-1737. doi:10.1002/hep.26982

Watashi K, Wakita T. Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus Entry, Species Specificity, and Tissue Tropism. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5(8):a021378. Published 2015 Aug 3. doi:10.1101/cshperspect.a021378

Wilson GK, Stamataki Z. In vitro systems for the study of hepatitis C virus infection. *Int J Hepatol.* 2012;2012:292591. doi:10.1155/2012/292591.

Witt-Kehati D, Bitton Alaluf M, Shlomai A. Advances and Challenges in Studying Hepatitis B Virus In Vitro. *Viruses.* 2016;8(1):21. Published 2016 Jan 14. doi:10.3390/v8010021

Woo ASJ, Kwok R, Ahmed T. Alpha-interferon treatment in hepatitis B. *Ann Transl Med.* 2017;5(7):159. doi:10.21037/atm.2017.03.69

Wose Kinge CN, Bhoola NH, Kramvis A. In Vitro Systems for Studying Different Genotypes/Sub-Genotypes of Hepatitis B Virus: Strengths and Limitations. *Viruses.* 2020;12(3):353. Published 2020 Mar 23. doi:10.3390/v12030353

Xing Y, Wen Z, Gao W, Lin Z, Zhong J, Jiu Y. Multifaceted Functions of Host Cell Caveolae/Caveolin-1 in Virus Infections. *Viruses.* 2020; 12(5):487. doi:10.3390/v12050487

Yan H, Liu Y, Sui J, Li W. NTCP opens the door for hepatitis B virus infection. *Antiviral Res.* 2015;121:24-30. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.002

Yuan L, Liu X, Zhang L, et al. A Chimeric Humanized Mouse Model by Engrafting the Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Hepatocyte-Like Cell for the Chronic Hepatitis B Virus Infection. *Front Microbiol.* 2018;9:908. Published 2018 May 8. doi:10.3389/fmicb.2018.00908

Zeilinger K, Freyer N, Damm G, Seehofer D, Knöspel F. Cell sources for in vitro human liver cell culture models. *Exp Biol Med (Maywood).* 2016;241(15):1684-1698. doi:10.1177/1535370216657448

Zeisel MB, Lupberger J, Fofana I, Baumert TF. Host-targeting agents for prevention and treatment of chronic hepatitis C - perspectives and challenges. *J Hepatol.* 2013;58(2):375-384. doi:10.1016/j.jhep.2012.09.022