

УДК [616.36-002.14-02:578.891]-085

Перспективы лечения вирусного гепатита В

Э. Де Клерк

Институт медицинских исследований Реги, Католический университет Лейвина, Бельгия

Переведена и печатается с согласия автора и редакции журнала "International Journal of Antimicrobial Agents" 1999;12/2:81-97.

В настоящее время в мире инфицированы вирусом гепатита В (HBV) 350 млн человек. Несмотря на существование вакцины, HBV остается одним из важнейших вирусов, вызывающих заболевания у человека. α Интерферон является единственным препаратом, одобренным во всем мире для лечения хронического гепатита В. Однако терапия интерфероном нередко приводит к развитию нежелательных лекарственных реакций, а результаты лечения, как правило, оказываются неудовлетворительными. Основное направление в развитии новых препаратов для терапии вирусного гепатита В направлено на подавление специфической ДНК-полимеразы HBV. Проводится оценка возможного использования для лечения больных аналогов нуклеозидов (и нуклеотидов), эффективность

которых при лечении других вирусных инфекций уже доказана.

Являвшиеся первоначально случайными находками при поиске эффективных анти-HSV и анти-ВИЧ агентов такие препараты, как фамциловир (пенцикловир), BMS-200475 (энтекавир), ламивудин (3TC), (-)FTC, L(-)Fd4C, L-FMAU, DAPD (DXG), bis(POM)-PMEA и bis(POC)-PMPA, в настоящее время являются многообещающими средствами терапии вирусного гепатита В. Можно утверждать, что будущее химиотерапии больных вирусным гепатитом В принадлежит использованию комбинаций лекарственных средств.

Ключевые слова: вирусный гепатит В, противовирусная терапия.

Perspectives for the Treatment of Hepatitis B Virus Infections

E. De Clercq

Rega Institute for Medical Research, Katholieke Universiteit Leuven, Belgium

Translated and reprinted with permission from "International Journal of Antimicrobial Agents" 1999;12/2:81-97

There are an estimated 350 million people throughout the world who are chronically infected with *hepatitis B virus* (HBV). Although HBV infection can be prevented through vaccination, HBV has remained the most significant viral pathogen infecting man. Interferon α is currently the only treatment specifically approved by regulatory authorities throughout the world for chronic hepatitis B. However, interferon therapy is associated with several side effects and variable, and often unsatisfactory, response rates. Recent attempts at developing an effective therapy for HBV infections have

capitalized on the HBV-specified DNA polymerase as target enzyme. A variety of nucleosides (and nucleotides) that had proved to be effective against other viral infections are further examined for their anti-HBV potential.

Primarily resulting as a spin-off the search for effective anti-HSV and anti-HBV agents, such compounds as famciclovir (penciclovir), BMS-200475 (entecavir), lamivudine (3TC), (-)FTC, L(-)Fd4C, L-FMAU, DAPD (DXG), bis(POM)-PMEA and bis(POC)-PMPA have been identified as effective and promising candidate anti-HBV drugs. But as it has become obvious, future HBV therapy may reside in combination drug therapy to achieve the highest possible virus reduction and minimize the likelihood of drug resistance development.

Key words: viral hepatitis B, antiviral therapy.

Контактный адрес:

Erik De Clercq

Тел.: +32 16 337367

Факс: +32 16 337340

Эл. почта: erik.declercq@rega.kuleuven.ac.be

Введение

В настоящее время в мире инфицированы вирусом гепатита В (HBV) 350 млн человек. Все носители HBV подвержены высокому риску развития цирроза печени и первичной *гепатоцеллюлярной карциномы* (ГЦК).

Наибольшая частота носительства HBV отмечается в странах Юго-Восточной Азии и Африки, 20% населения этих регионов хронически инфицированы HBV. Несмотря на существование вакцины, HBV в настоящее время остается важнейшим инфекционным агентом, вызывающим заболевание у человека, особенно в развивающихся странах.

α -Интерферон является единственным препаратом, одобренным во всем мире для лечения *хронического вирусного гепатита* (ХВГ) В [1]. Однако терапия α -интерфероном нередко приводит к развитию нежелательных лекарственных реакций, а результаты лечения, как правило, оказываются неудовлетворительными. Среди причин неэффективности лечения интерферонами называют:

1) иммунологическую толерантность к HBV в

случае перинатального инфицирования и заражения в раннем детстве [2];

2) персистенцию ковалентно замкнутой циркулярной ДНК вируса (ссДНК) в печени [3].

Генетический аппарат HBV представлен двухцепочечной кольцевидной молекулой ДНК, состоящей из 3200 пар нуклеотидов. В геноме находятся 3 перекрывающиеся рамки считывания, кодирующие вирусную ДНК-полимеразу, сердцевинный антиген (HBcAg), поверхностный антиген (HBsAg) и активирующий экспрессию всех генов вируса белок Х.

После заражения при помощи ДНК-полимеразы одноцепочечные участки короткой цепи ДНК HBV достраиваются с образованием РНК-репликативного прегенома. Образовавшийся пренуклеотид включает в себя прегеномную РНК- и ДНК-полимеразу.

Следующий этап репликации, происходящий в цитоплазме инфицированного гепатоцита, – обратная транскрипция, то есть синтез полной антисмысловой цепи ДНК на РНК матрице при помощи вирусоспецифичной ДНК-полимеразы, обладающей свойствами обратной транскриптазы (ревертазы) с последующим разрушением прегеномной РНК. Затем на антисмысловой цепи синтезируется смысловая цепь ДНК HBV [4].

Образовавшаяся кольцевидная структура ДНК HBV вместе с ДНК-полимеразой включается в нуклеокапсид вируса и формируется наружная оболочка вируса, состоящая из HBsAg и HBeAg. На этом процесс репликации генома HBV заканчивается и новая вирусная частица выходит из гепатоцита (рис. 1). Наряду со вновь образованными полноценными вирусными частицами из инфицированной клетки высвобождаются также “пустые” вирусные частицы, содержащие HBsAg и HBeAg.

Серологическими маркерами ХВГ В являются HBsAg, анти-HBcAg, ДНК HBV, HBeAg, а также повышение активности АлАТ (рис. 2). Определение ДНК HBV в крови особенно важно для оценки качества антивирусной терапии. Если в крови сохраняется ДНК HBV, в качестве показателей эффективности антивирусной терапии может служить нормализация активности АлАТ, иногда HBeAg-сероконверсия – исчезновение HBeAg и появление антител к HBeAg.

Основное направление создания новых препаратов для терапии вирусного гепатита В – поиск средств, подав-

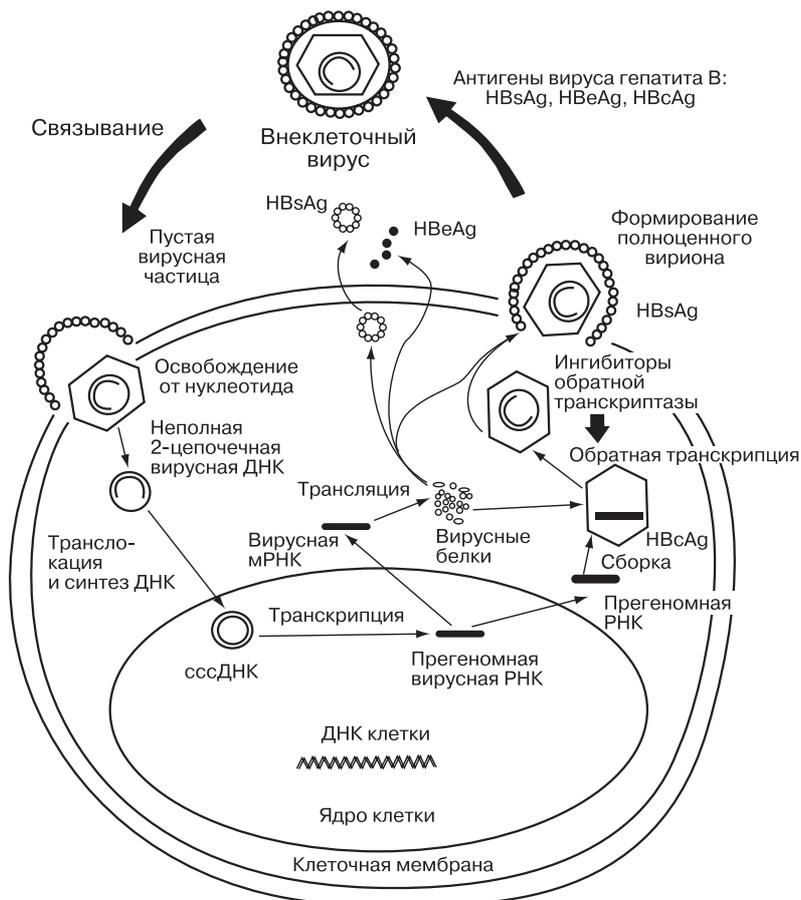


Рис. 1. Жизненный цикл вируса гепатита В и механизм действия ингибиторов обратной транскриптазы

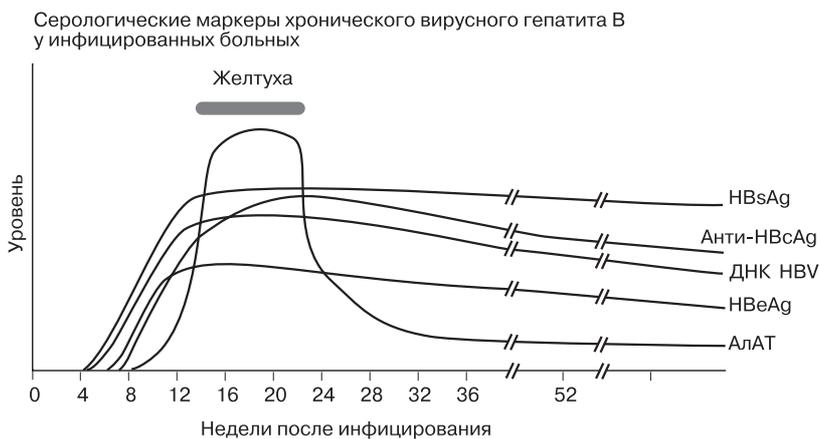


Рис. 2. Хроническая HBV-инфекция: серологические маркеры

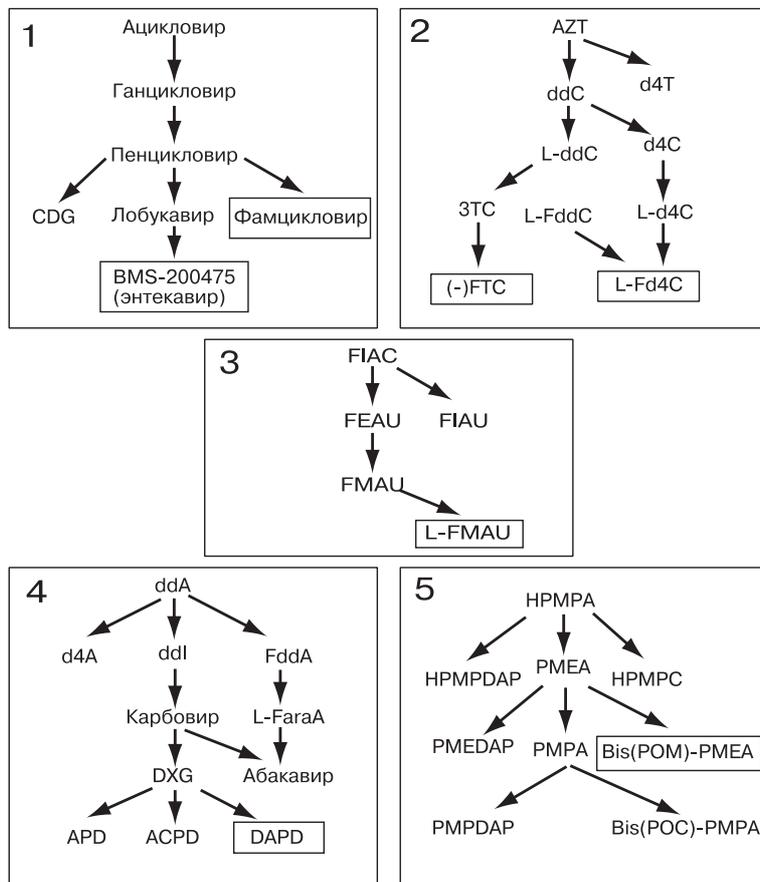


Рис. 3. Генеалогия основных аналогов нуклеозидов (или нуклеотидов), которые могут играть роль (или быть предшественниками) анти-HBV препаратов. Ациклические (или карбоциклические) аналоги гуанозина. Аналоги дидеоксинуклеозида пиридина. 2'-фторзамещенные арабинозилпиримидины. Аналоги дидеоксинуклеозида пурина. Ациклические фосфонаты нуклеозидов. В рамки помещены наиболее интенсивно исследуемые и перспективные субстанции

ляющих функцию специфической ДНК-полимеразы HBV, так как этому ферменту отводится решающая роль в синтезе вирусной частицы. Кроме того, ингибиторы вирусных ДНК-полимераз уже успеш-

но используются для лечения инфекций, вызванных вирусами простого герпеса (HSV), опоясывающего лишая (VZV), цитомегаловирусом (CMV) и ретровирусами (вирус иммунодефицита человека – ВИЧ, или HIV).

В настоящее время проводится оценка возможного использования для лечения вирусного гепатита В аналогов нуклеозидов (и нуклеотидов), эффективность которых уже доказана: либо против HSV, VZV, CMV, либо против HIV. Причем некоторые из этих препаратов в отношении HBV оказались даже эффективнее, чем в отношении HSV или HIV.

В зависимости от препарата-предшественника можно выделить 5 групп аналогов нуклеозидов:

- 1) ацикловир – для ациклических (или карбоциклических) аналогов гуанозина;
- 2) азидотимидин (AZT) – для аналогов дидеоксинуклеозида пиридина;
- 3) 1-(2'-деокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодцитозин (FIAU) – для аналогов 2'-фторзамещенных арабинозилпиримидинов;
- 4) дидезоксиаденозин (ddA) – для аналогов пуриновых дидеоксинуклеозидов;
- 5) (S)-9-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)аденин (HPMPA) для ациклических нуклеозидных фосфонатов (рис. 3).

На рис. 4 изображены структурные формулы основных представителей (и/или наиболее часто используемых) анти-HBV препаратов для каждой из 5 категорий:

1-й класс – пенцикловир и его пролекарственные формы фамцикловир, лобукавир и BMS-200475 (энтекавир);

2-й класс – 3TC (ламивудин), (-)FTC и L(-)Fd4C;

3-й класс – L-FMAU;

4-й класс – DXG (и его пролекарственные формы DAPD, APD и ACPD);

5-й класс – PMEА (адефовир) и РМРА (тенофовир), а также их пролекарственные формы bis(POM)-PMEA (адефовир дипивоксил) и bis(POC)-PMPA (тенофовир дисопротил фумарат).

Сравнительная активность *in vitro* некоторых анти-HBV препаратов

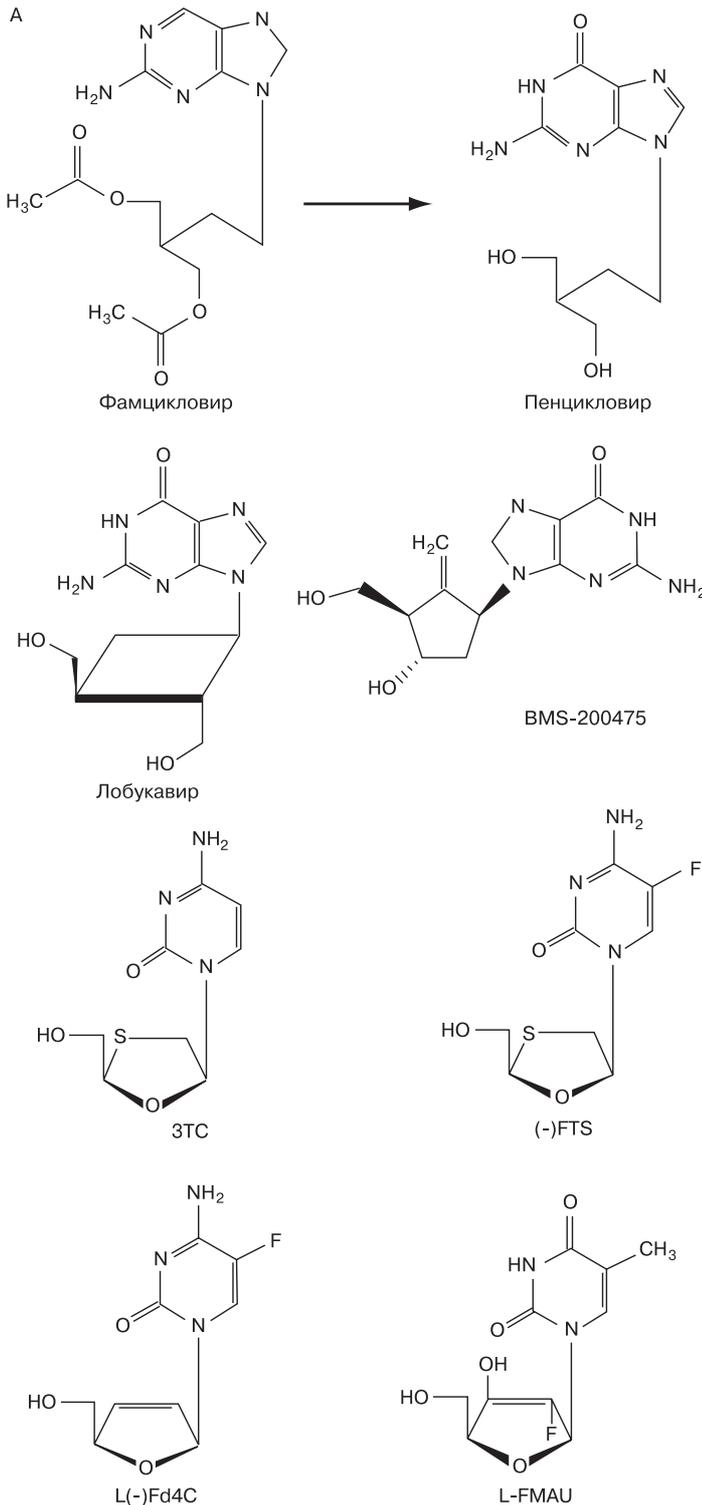


Рис. 4. Структурная формула наиболее репрезентативных анти-HBV препаратов (и их пролекарств): пенциклоvir (фамциклоvir), лобукаvir, BMS-200475 (энтекаvir), 3TC, (-)FTC, L-FMAU, DXG (APD, ACPD, DAPD), PMEA [bis(POM)-PMEA] и PMEA [bis(POC)-PMPA]

Клеточная линия HB 611 гепатобластомы человека, особенно Hep G2 2.2.15, несущих геном HBV, наиболее часто используется для определения ингибирующих эффектов антивирусных препаратов на репликацию HBV. Подавление синтеза промежуточных продуктов внутриклеточной ДНК HBV и/или продукции внеклеточной ДНК вируса можно использовать в качестве маркеров антивирусной активности [5, 6].

При оценке клинической эффективности аналогов нуклеозидов, проводившейся в различных лабораториях, условия в которых могли различаться [6–18], хорошие результаты получены для следующих препаратов, селективно ингибирующих репликацию HBV (см. таблицу): пенциклоvir [6], BMS-200475 [7], 3TC [6, 10, 11], (-)FTC [10], L-FddC, L-d4C и L-FdC [9], L-FMAU [13], DXG и его предшественник ACPD [16], а также для ациклических фосфонатов нуклеозидов PMPA, PMEA, PMEDAP, PMPA и PMPDAP [5, 17, 18].

При сравнении действия BMS-200475, пенцикловира и ламивудина (3TC) в одинаковых условиях [7] оказалось, что BMS-200475 значительно эффективнее, чем 3TC (EC_{50} составляет 0,00375 и 0,116 мкМ соответственно), а пенциклоvir неактивен в отношении HBV (EC_{50} равна 100 мкМ).

В то время как 2',3'-дидезоксиаденозин (ddA) и 2',3'-дидегидро-2',3'-дидезоксиаденозин (d4A) оказались мало- или неактивны в отношении HBV, их арилоксифосфорамидатпроизводные Cf1093 и Cf1001 подавляли репликацию HBV в клетках Hep G2 2.2.15 при EC_{50} 0,1 – 0,01 мкМ [14], равной EC_{50} для 3TC. Арилоксифосфорамидатпроизводный 3TC (Cf1109) подавлял репликацию HBV при такой же EC_{50} , что и у 3TC [11].

Из всех аналогов L-нуклеозидов L-FMAU является первым аналогом L-тимидина, который специфически подавляет репликацию ДНК HBV [13]. Все остальные аналоги L-нуклеозидов, активные в отношении HBV, то есть L-FddC, L-d4C, L-Fd4C, 3TC и (-)FTC, представляют собой аналоги L-цитидина.

Из нециклических фосфонатов нуклеозидов наибольшие надежды в отношении активности против HBV возлагают на PMEA, PMPA и их 2,6-диаминопуриновые аналоги PMEDAP и PMPDAP. Подавление репликации *вируса гепа-*

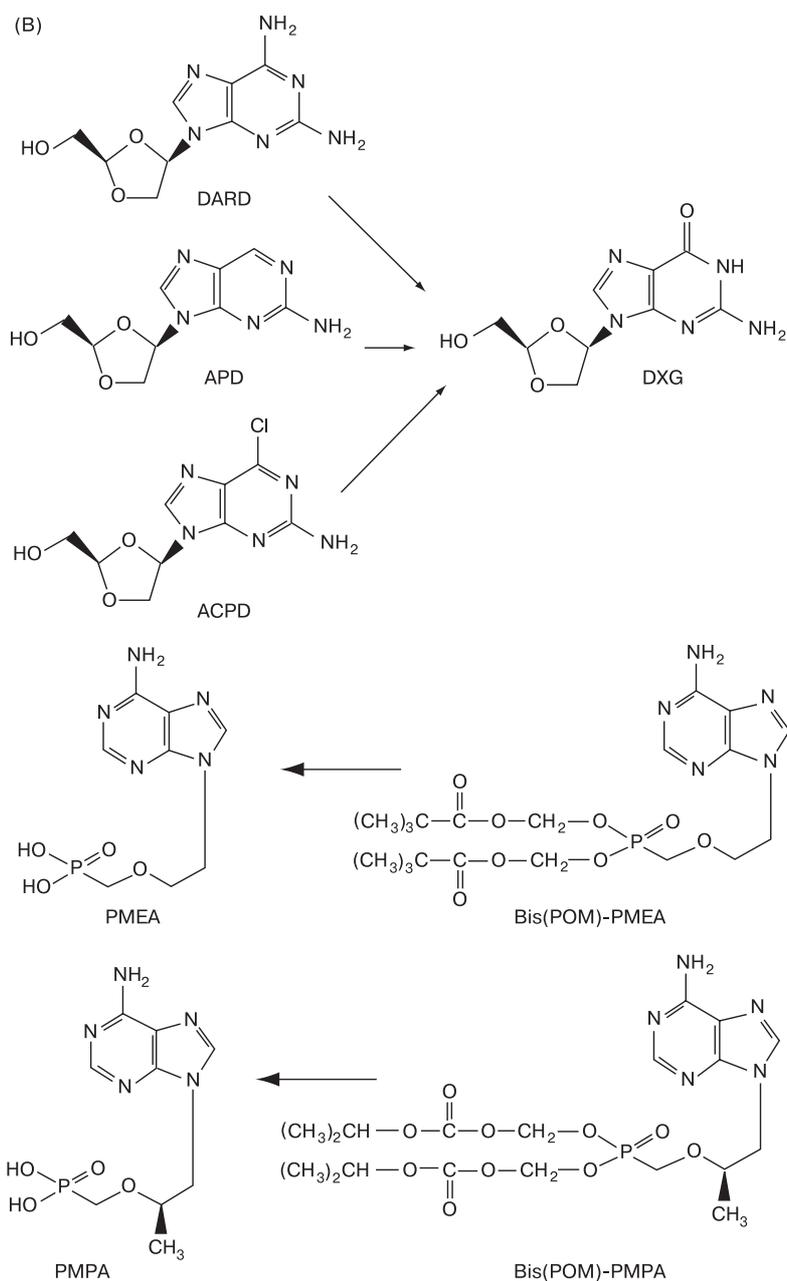


Рис. 4. (Окончание)

тита В пекинских уток (DHBV – duck hepatitis B virus) препаратами доказана *in vitro* [18, 20].

Механизм действия противовирусных препаратов

Многоступенчатый механизм репликации гепаднавирусов начинается с обратной транскрипции прегеномной РНК (рис. 1). Синтез ДНК запускается стартовым белком, который непосредственно прикрепляется к первому нуклеотиду антисмысловой цепи ДНК [21]. Затем на антисмысловой цепи синтезируется смысловая цепь ДНК с образованием

завершенной двухцепочечной ДНК вируса.

Таким образом, вирусоспецифическая ДНК-полимераза гепаднавирусов обладает активностью РНК-зависимой (обратно транскриптазной) и ДНК-зависимой ДНК-полимеразы. Обсуждаемые в статье противовирусные агенты блокируют активность обоих ферментов.

С этих позиций все препараты, активные против HBV, независимо от класса, к которому они принадлежат (1, 2, 3, 4 или 5-му), должны быть фосфорилированы внутри клетки с образованием трифосфатов (рис. 3, 5). Реакция фосфорилирования происходит, в свою очередь, независимо от присутствия вируса или продуктов его жизнедеятельности в клетке [22].

Доказано, что клеточные ферменты катализируют реакцию фосфорилирования таких противовирусных агентов, как ламивудин (ЗТС) и пенцикловир, в гепатоцитах или клетках гепатобластомы, то есть Her G2 2.2.15. Наиболее важными ферментами, вовлеченными в процесс фосфорилирования, являются диоксицитидинкиназа, dCMP-киназа и NDP (нуклеозид дифосфат)-киназа [23].

После ферментативного преобразования в трифосфатные формы ЗТС пенцикловир и другие препараты этого класса приводят к терминации цепи ДНК и таким образом подавляют репликацию ДНК HBV [22, 24].

Теоретически за счет дополнительного эквивалента 3'-гидроксильной группы пенцикловир, как и ганцикловир, может непосредственно встраиваться в вирусную ДНК. Специфичность ЗТС, пенцикловира и других представителей этого класса значительно зависит от специфичности их трифосфатов к ДНК-полимеразе HBV, родственной человеческим ДНК-полимеразам α , β , γ , δ и ϵ .

Следует отметить, что препараты не должны взаимодействовать с ДНК-полимеразами клеток человека и не влиять на синтез митохондриальной ДНК, так как в этом случае значительно повышается гепатотоксичность.

В данной ситуации обнадеживает то, что у 5'-трифосфатов таких препаратов, как L-Fd4C и L-FMAU, подавляющая активность по отношению к ДНК-полимеразам некоторых вирусов значительно

Сравнительная активность некоторых противовирусных препаратов в отношении синтеза ДНК HBV в клетках гепатобластомы Нер G2 2.2.15

Препарат	EC ₅₀ (мкМ) ^a	CC ₅₀ (мкМ) ^b	SI ^c	Литература
Ацикловир	>100			6,7
Ганцикловир	>100			7
Пенцикловир	0,6 3,5 (мкг/мл) 100	448	747	6 8 7
CDG (2'-карбоциклический диоксигуанозин)	0,05			7
Лобукавир	0,02 2,5 (мкг/мл)			8 7
BMS-200475	0,00375	30	8000	7
AZT	>100			7
d4T	>100			7
ddC	6,2 100		–	9 7
d4C	3			9
L-FddC	0,036 0,2			9 7
L-d4C	0,008			9
L-Fd4C	0,002			9
ЗТС	0,008 0,02 0,03 0,116 0,2 5 (мкг/мл)	–	–	10 11 9 7 6 8
–FTC	0,01			10
FIAU	0,9 10	344	382	12 7
L-FMAU	0,1	>200	2000	13
ddA	>10			14
d4A	>10			14
ddI	>100			7
L-FaraA	1,5	>200	133	15
DXG	0,09 3,4 (мкг/мл)			16 8
ACPD	0,001			16
DAPD	4 (мкг/мл)			8
HPMPA	1,1 1,5	77 >100	79 >67	17d 18
HPMPDAP	1,3	32	25	17
HPMPC	29 14	193 >100	7 >7	17 18
РМЕА	0,2 0,7 1,2 0,09 (мкг/мл)	107 150 >100	535 200 >83	17 19 18 8
РМЕДАР	0,07	122	1742	17d
РМРА	1,5 0,03 (мкг/мл)	>100	>67	18 8
РМРДАР	0,22	>100	>455	18

^a EC₅₀: 50% эффективная концентрация.

^b CC₅₀: 50% цитотоксическая концентрация.

^c SI: индекс селективности, или коэффициент CC₅₀/EC₅₀.

^d Данные, полученные на HB 611, а не на клетках гепатобластомы Нер G2 2.2.15.

выше, чем по отношению к ДНК-полимераза человека [25, 26]. Однако специфичность 5'-трифосфатов L-Fd4C и L-FMAU в отношении ДНК-полимеразы HBV все еще является предметом изучения.

В культуре клеток L-F4dC подавляет репликацию HBV в 10 раз сильнее, чем ЗТС [27]. При этом в концентрации до 10 мкМ L-Fd4C не проявлял активности в отношении синтеза митохондриальной ДНК. Более выраженная анти-HBV активность L-Fd4C в сравнении с таковой у ЗТС может объясняться более высокой внутриклеточной концентрацией 5'-трифосфатов L-F4dC, чем ЗТС. 5'-трифосфат L-Fd4C конкурентно по отношению к dCTP подавляет ДНК-полимеразу HBV при K_i , равной 0,07 мкМ [27].

Ациклические фосфонаты нуклеозидов изначально имеют фосфатомиметическую (фосфонатную) группу. Поэтому для превращения в активный метаболит препаратам этой группы необходимо только 2 реакции фосфорилирования вместо 3 (рис. 5).

Фосфорилирование до дифосфатных форм у РМЕА и, вероятно, у РМРА (РМЕАpp и РМРАpp) происходит в один или два этапа с помощью 5-фосфорибозил-*l*-пирофосфатсинтетазы [28] или АМР (dAMP)-киназы соответственно.

Селективная антивирусная активность ациклических фосфонатов нуклеозидов объясняется тем, что их дифосфорилированные формы имеют большую аффинность (меньший K_i) к вирусной ДНК-полимеразе, то есть к ДНК-полимеразам

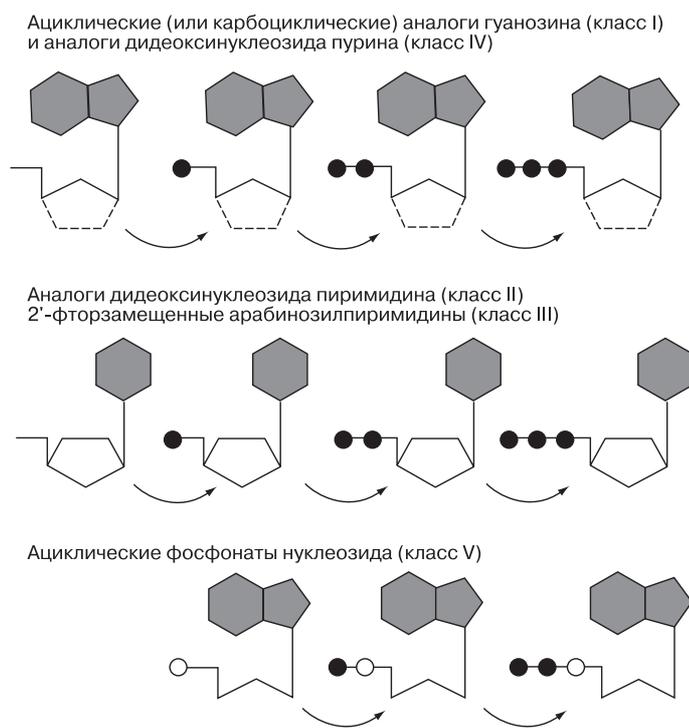


Рис. 5. Внутриклеточный метаболизм анти-НВВ препаратов до их трифосфатных форм: ациклические (или карбоциклические) дидеоксинуклеозидные аналоги гуанозина и пурина. Для превращения в активные метаболиты, то есть в трифосфатные формы, которые затем конкурируют с нормальными субстратами за ДНК-полимеразу, пириимидиновые дидеоксинуклеозиды и 2'-фторзамещенные арабинозилпириимидины нуждаются в 3-ступенчатом фосфорилировании, в то время как ациклические фосфонаты нуклеозидов нуждаются лишь в 2-ступенчатом фосфорилировании

HSV-1, CMV и HIV, чем к клеточным ДНК-полимеразам α , β , γ , δ и ϵ [30, 31].

В дальнейшем необходимо оценить специфичность РМЕАрр и РМРАрр к ДНК-полимеразе НВВ. На примере реакции обратной транскрипции HIV доказано, что РМЕА и РМРА вызывают терминацию цепи. РМРА является более "точным" терминатором цепи обратной транскриптазы HIV-1, чем РМЕА, так как он в меньшей степени инкорпорируется в клеточные ДНК-полимеразы α , β и γ [32].

In vivo активность антивирусных агентов на животных моделях (пекинских уток и сурков)

Подавление репликации ДНВВ достигнуто при лечении пенцикловиrom пекинских уток с хроническим вирусным гепатитом В – перорально 20 мг/кг или 100 мг/кг 2 раза в день в течение 21 дня или фамцикловиrom – перорально 5 мг/кг или 25 мг/кг 2 раза в день в течение 21 дня.

Показателями подавления репликации были

снижение уровня вирусной ДНК в плазме крови и уровня ДНК-полимеразы [33]. Через 4 дня от начала лечения указанные маркеры в крови не определялись. Однако через 2–8 дней после отмены препаратов уровни ДНК ДНВВ и ДНК-полимеразы возвращались к прежнему, что свидетельствует о возобновлении репликации вируса.

В другом исследовании показано существенное снижение уровня внутриклеточной ДНК вируса (включая ссДНК), РНК и белка (предшественника S-антигена и сердцевинного антигена) при лечении пекинских уток, инфицированных ДНВВ, путем введения пенцикловиrom внутривентриально по 10 мг/кг в день в течение 10 дней [34]. Токсичности, связанной с применением пенцикловиrom, не зарегистрировано. Однако, несмотря на терапию пенцикловиrom, в небольших субпопуляциях эпителиальных клеток желчных протоков обнаруживались антигены ДНВВ и ДНК вируса.

При длительных курсах лечения пенцикловиrom (10 мг/кг в день) в течение 12–24 нед у пекинских уток, врожденно инфицированных ДНВВ, отмечалось значительное снижение уровня всех промежуточных продуктов репликации вируса, включая ссДНК, без признаков токсичности препарата [3].

Подавление репликации ДНВВ отмечено при лечении экспериментально зараженных уток L-FddC в дозе 25–50 мг/кг 2 раза в день. Ингибирующий эффект L-FddC выражен сильнее, чем у ddC, и не связан с токсичностью препарата. Однако после отмены L-FddC, назначенного коротким курсом (5 дней), как и при лечении пенцикловиrom, отмечалось возобновление репликации вируса [35].

Значительное снижение уровня вирусемии достигнуто у экспериментально зараженных уток при назначении L-FMAU перорально короткими курсами (5–8 дней) в дозе 40 мг/кг в день, при этом признаков гепатотоксичности препарата не отмечалось [36]. В отличие от его D-формы (D-FMAU) и "классической" (D-) формы FIAU, L-FMAU не уменьшал содержание митохондриальной ДНК, не влиял на функцию митохондрий и не инкорпировался в клеточную ДНК [13].

Вирус гепатита сурков (ВГС, или WHV – *woodchuck hepatitis virus*) является более подходящей моделью для оценки эффективности анти-НВВ агентов, чем ДНВВ, по двум причинам.

Во-первых, по генетической ультраструктуре ВГС гораздо ближе к НВВ, чем к ДНВВ: последовательность нуклеотидов ВГС на 70% повторяет структуру НВВ.

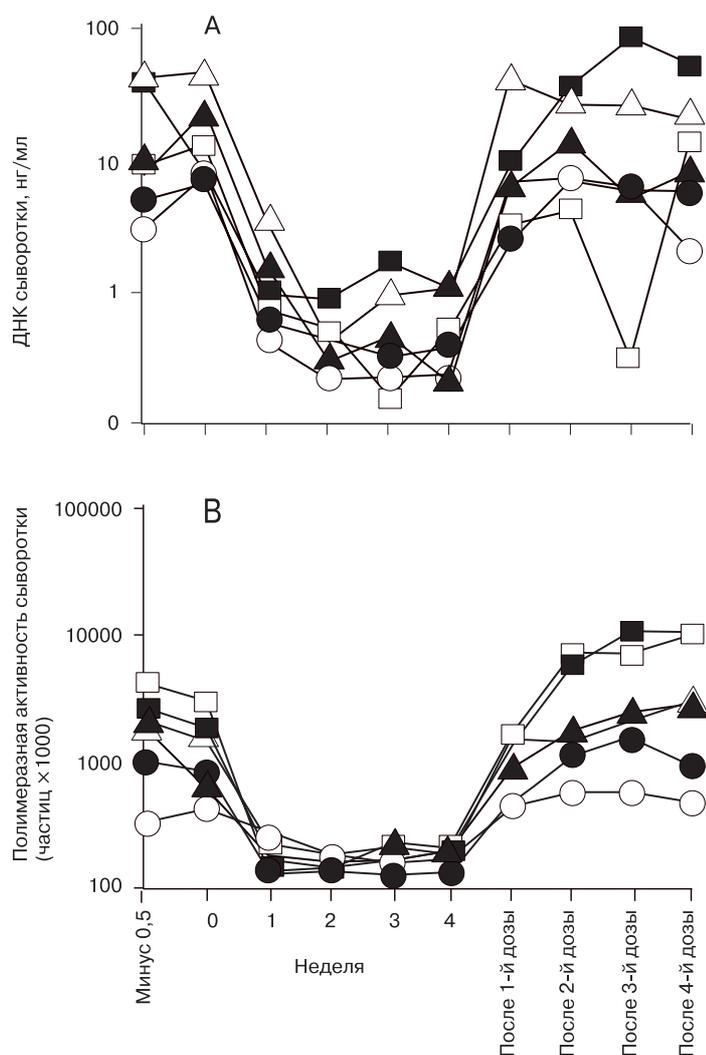


Рис. 6. Эффективность назначения (-)FTC (30 мг/кг 2 раза в день интраперитонеально) на уровень виремии (панель А) и сывороточную активность вирусной ДНК-полимеразы (панель В) [37]

Во-вторых, степень повреждения печени в большей степени соответствует повреждению печени пациентов, инфицированных HBV, чем повреждениям печени уток, зараженных DHBV (по J.M. Cullen et al.) [37].

Экспериментально активность (-)FTC в отношении ВГС подтверждена после назначения препарата внутривенно в дозе 30 и 20 мг/кг 2 раза в день и последующего определения уровня ДНК ВГС, а также активности частично ассоциированной ДНК-полимеразы [37].

Снижение уровня ДНК ВГС в плазме в 20–150 раз (в среднем в 56 раз) регистрировали в группе, где препарат вводили по 30 мг/кг дважды в день и в 6–49 раз (в среднем в 27 раз) в группе, где препарат назначали по 20 мг/кг дважды в день. Уровень ДНК-полимеразы снижался соответственно

(рис. 6). Через 1 нед после отмены препарата уровни ДНК ВГС и ДНК-полимеразы стали прежними. При курсе лечения до 25 дней (-)FTC токсичности не наблюдалось [37].

У сурков, инфицированных ВГС, при длительном курсе лечения ламивудином (ЗТС) медленно, но последовательно снижался титр вируса в плазме до 0,3% и менее от исходного уровня [38].

Несмотря на продолжительность терапии от 3 до 12 мес, более 95% гепатоцитов у большинства животных оставались инфицированными, а существенное снижение уровня внутрипеченочной ссДНК отмечали только у 3 животных, из которых 2 были в группе, получавшей ЗТС, и один – в группе плацебо. Более того, отмечался рост титра вируса у животных, получавших ЗТС, что может свидетельствовать о распространении резистентных к препарату вирусов через 9–12 мес от начала лечения.

В исследовании W.S. Mason et al. [38] ламивудин не влиял на риск развития новообразований печени, возможно, в силу того, что его назначали животным, инфицированным ВГС более года (13–16 мес). В другом исследовании [39] ламивудин, назначенный животным с более ранними сроками заражения ВГС, вызвал незначительное устойчивое снижение вирусемии и уменьшение риска развития ГЦК.

Клинические исследования анти-HBV препаратов

Некоторые авторы сообщают о положительном влиянии фамцикловира, назначенного для профилактики вирусного гепатита В у пациентов после трансплантации печени [40, 41]. У больных ХВГ В при 10-дневном курсе лечения фамцикловир эффективно снижал репликацию HBV [42].

Из 8 пациентов, получавших перед трансплантацией печени фамцикловир для профилактики рецидива вирусного гепатита В, у 2 после курса лечения не выявлялась ДНК HBV. Была продемонстрирована сероконверсия анти-HBsAg, оба пациента оставались ДНК HBV-негативными в течение 2 лет при контрольном их посещении после трансплантации [43].

В другом исследовании доказано, что длительный курс терапии фамцикловиром (125 мг 3 раза в день в течение 3 лет, комбинированная – с интерфероном α -2b) позволял контролировать уровень ДНК HBV и уменьшать проявление симптомов

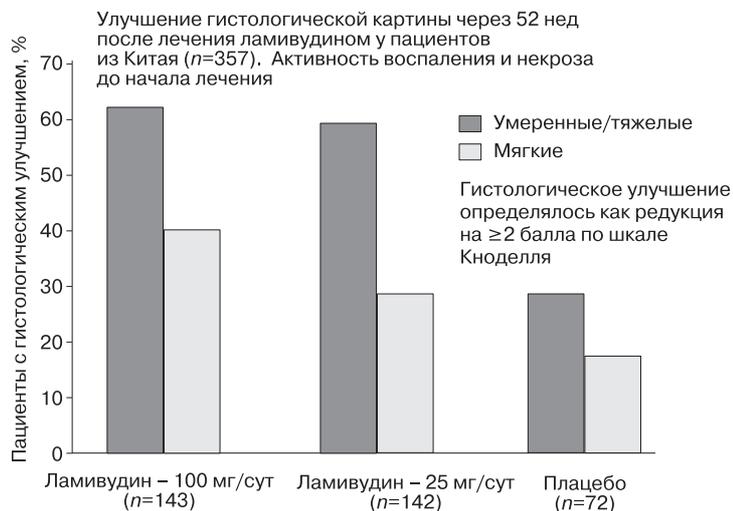


Рис. 7. Улучшение или ухудшение течения воспаления и некроза до и после лечения, выявляемые при биопсии у больных хроническим вирусным гепатитом В, получавших ламивудин (25 и 100 мг/сут в течение 1 года) и плацебо [2]

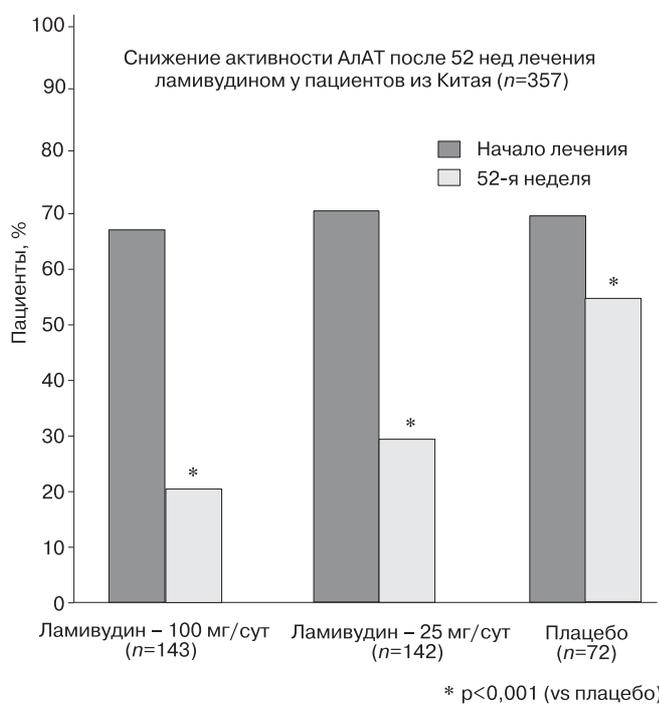


Рис. 8. Кумулятивный процент больных хроническим вирусным гепатитом В с устойчивым снижением активности аланинаминотрансферазы, наступившим после лечения ламивудином (25 и 100 мг/сут в течение 1 года) по сравнению с плацебо [2]

HBV-ассоциированного узелкового полиартериита [44].

В Китае в течение года проводилось двойное слепое рандомизированное исследование, в рамках которого 358 больных ХВГ В получали ламивудин перорально 1 раз в день: 142 больным ламивудин назначали по 25 мг, 143 – по 100 мг, а 73 – плацебо [2].

Гистологическая картина (по признакам некроза и воспаления) печени улучшилась на 2 балла и более по индексу Кноделля: у 56% пациентов, получавших 100 мг ламивудина, у 49% – 25 мг ламивудина, у 25% – плацебо (рис. 7).

У пациентов, которым ламивудин был назначен в дозе 100 мг, уменьшилась степень фиброза, улучшились серологические показатели сероконверсии, в частности исчез HBeAg, отсутствовало развитие антител к HBeAg и не определялся уровень ДНК HBV (16%), отмечены наивысшая супрессия ДНК HBV (снижение на 98% на 52-й неделе лечения) и самый продолжительный период нормализации уровня активности АлАТ (72%). На рис. 8 представлен кумулятивный процент больных с устойчивой нормализацией уровня активности АлАТ: 65% пациентов, получавших 25 мг препарата, 72% – получавших 100 мг, 24% – получавших плацебо [2].

В исследовании С.Л. Lai et al. [2] в течение года соотношение числа пациентов с сероконверсией HBeAg (исчезновение HBeAg и появление антител к HBeAg) и снижением ДНК HBV в сыворотке крови до неопределяемого уровня было следующим: 13% в группе пациентов, получавших 25 мг ламивудина, 16% в группе, получавшей 100 мг ламивудина, и 4% в группе, получавшей плацебо (рис. 9).

Среди причин, обуславливающих развитие иммунотолерантности у больных ХВГ В, основная роль отводится HBeAg [45]. Поэтому исчезновение HBeAg и сероконверсия от HBeAg к анти-HBeAg может быть расценена как восстановление иммунной системы, которое в дальнейшем может привести к выздоровлению от вирусного гепатита В.

Ациклические фосфонаты нуклеозидов адефовир (PMEA) и тенофовир (PMPA) и их пролекарственные формы для перорального приема bis(РОМ)-PMEA (адефовир дипивоксил) и bis(-РОС)-PMPA (тенофовир дизопроксилфумарат) обладают многообещающей антивирусной активностью в отношении HIV и HBV.

В двух рандомизированных двойных слепых плацебо-контролируемых исследованиях адефовира дипивоксила у больных с ВИЧ-инфекцией доказано, что при пероральном приеме препарата один раз в день в дозе 125, 250 и 500 мг в течение 2, 6 или 12 нед в сыворотке крови снижается уровень РНК HIV-1 и увеличивается количество CD4⁺-Т-лимфоцитов [46, 47]. Bis(РОМ)-PMEA также был объ-

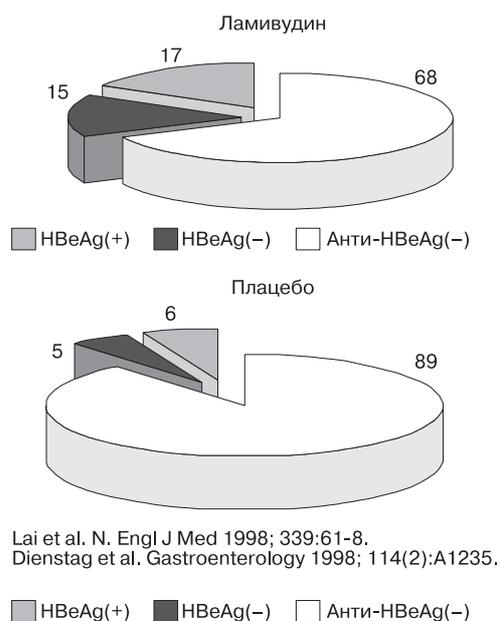


Рис. 9. Соотношение частоты больных хроническим вирусным гепатитом В с сероконверсией HBeAg после лечения ламивудином (25 и 100 мг/сут в течение 1 года) и плацебо [2]

ектом I/II и II фаз клинических испытаний у HBV-инфицированных.

У пациентов, получавших адефовир в течение 4 нед по 120 мг один раз в сутки, достигнуто снижение уровня ДНК HBV в плазме на $2 \log_{10}$ [48]. При увеличении продолжительности терапии адефовиром дипивоксилем до 12 нед (исследование GS 96-412) у пациентов, получавших 60 или 30 мг препарата один раз в день, уровень ДНК HBV в сыворотке крови снизился на 99,99%; у 3 из 15 пациентов, получавших 60 мг препарата, и у 4 из 15 пациентов, получавших 30 мг препарата, исчезал HBeAg [49]. При контрольном визите через 24 нед у 27% пациентов (8 из 30) в обеих группах HBeAg не выявлялся, у 20% (6 из 30) произошла сероконверсия – появление антител к HBeAg.

У одного пациента из группы, получавшей по 30 мг препарата, также достигнута элиминация HBsAg. Ни у одного из пациентов, получавших плацебо, элиминации или сероконверсии HBeAg и HBsAg не отмечено (материал представлен Dr. J. Heathcote на 49-м ежегодном собрании Американской ассоциации по изучению болезней печени 8 ноября 1998 г. Hepatology, Oct. 1998, прил.).

Резистентность к анти-HBV препаратам

За последние несколько лет появилось множество сообщений о возможности развития резистентности к ламивудину (ЗТС) у больных ХВГ В, длительное время получавших данный препарат. Меха-

низм развития резистентности обусловлен специфическими точечными мутациями (M550V/I, или M552V/I, в зависимости от системы нумерации кодонов) в консервативном локусе YMDD ДНК-полимеразы HBV [50–53].

Резистентность к ламивудину развивается при замене метионина на валин в локусе YMDD ДНК-полимеразы DHBV [54].

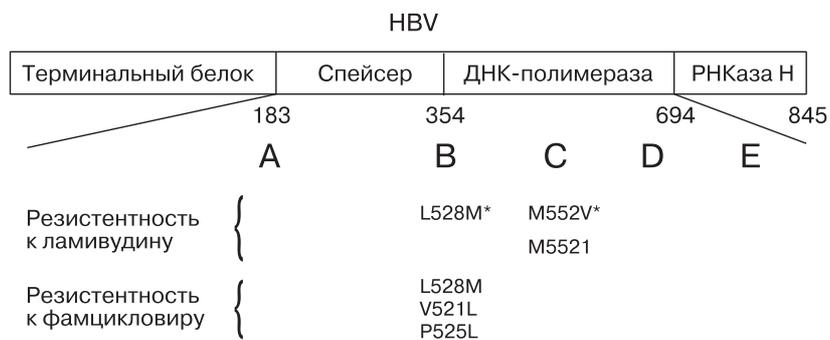
Резистентность HIV к ламивудину (ЗТС) опосредована такой же мутацией в локусе YMDD (в 184-й позиции обратной транскриптазы HIV). Замена метионина на валин или изолейцин в локусе YMDD уменьшает репликацию ДНК более чем в 100 раз по сравнению с таковой у вируса дикого типа, но дополнительные мутации вне локуса YMDD, например мутация Y(M(V>I)DD, увеличивают репликативную способность вируса. Таким образом, мутации Y(M>V/I)DD можно назвать “компенсаторными” [55].

Одной из таких “компенсаторных” мутаций, возникающих при длительном курсе лечения ламивудином, является мутация L526M (или L528M, в зависимости от системы нумерации кодонов). Данный тип мутации обнаруживается исключительно у пациентов с локусом Y(M>V)DD [56]. У пациентов с мутацией L526M выявляется снижение содержания HBV на 10% по сравнению с контрольной группой. Комбинация мутаций L526M и M550V увеличивает содержание вируса в 5 раз по сравнению с одиночной мутацией M550V. Более того, у пациентов с комбинированной мутацией (L526V, M550V) отмечается дальнейший рост резистентности к ламивудину примерно в 300 раз [55].

Следует отметить, что мутация M550V (или M552V) ДНК-полимеразы HBV (см. выше) эквивалентна мутации M539V, снижающей продукцию вируса и чувствительность к ламивудину в 7 и 330 раз соответственно [57]. Разновидность полимеразы, содержащей мутацию M539V, снижает чувствительность к (-)FTC, ddC и AZT [58].

Мутация L526M обнаружена также у пациента с развившейся резистентностью к пенцикловиру (фамцикловиру) [59]. В течение 4 лет этот больной рецидивирующим ХВГ В, возникшим после трансплантации печени, получал ганцикловир, фоскарнет и фамцикловир. Было выявлено снижение чувствительности вирионассоциированной ДНК-полимеразы к трифосфату пенцикловира. Снижение чувствительности к пенцикловиру (фамцикловиру) обусловлено тремя мутациями (V519, P523 и L526) в гене HBV-полимеразы, находившемся в В участке ДНК-полимеразы (рис. 10) [59].

У больных ХВГ В, получавших лечение PMEA [bis(РОМ)-PMEA или адефовир дипивоксил], ре-



* 90% двойных мутаций.

Рис. 10. Локализация мутаций ДНК-полимеразы HBV, ответственных за резистентность к анти-HBV препаратам. Данные мутации располагаются в пределах В и С домена ДНК-полимеразы HBV и характеризуются как V519L, P523L, L526M и M550V/I. В зависимости от системы кодирования эти мутации могут также обозначаться как V521L, P525L, L528M и M552V/I соответственно

зистентность к препарату не развивалась. При длительном назначении адефовира дипивоксила больным ВИЧ-инфекцией по 120 мг/сут в течение 12 мес у 8 из 29 пациентов развились отсутствовавшие ранее мутации обратной транскриптазы.

Появление мутаций трудно отнести только к результатам лечения адефовиrom дипивоксидом, так как больные принимали и другие противовирусные препараты [60]. У 2 из 8 пациентов развилась мутация K70E, но ни у одного из них не отмечена мутация K65R (развитие мутаций K70E и K65E доказано *in vitro* при применении адефовира дипивоксила).

В результате мутаций отмечено соответственно 16- и 9-кратное снижение чувствительности к адефовиру. Несмотря на развитие мутаций обратной транскриптазы, у всех 8 больных устойчиво снижался уровень вирусной нагрузки ($\geq 0,7 \log_{10}$ копий/мл по сравнению с началом лечения) [60]. Эти данные свидетельствуют о том, что развитие резистентности к РМЕА не является проблемой даже у больных ВИЧ-инфекцией, получающих терапию РМЕА [или bis(РОМ)-РМЕА].

Перспективы лечения вирусного гепатита В

Исключительно высокой противовирусной активностью в отношении HBV обладает препарат РМЕА и его пролекарственная форма для перорального приема bis(РОМ)-РМЕА. Ввиду предпочтительных фармакокинетических параметров, доказанной противовирусной активности и низкой токсичности необходимо дальнейшее изучение применения bis(РОС)-РМРА и bis(изопропилкарбонилметилового) эфира РМРА для лечения как больных вирусным гепатитом В, так и ВИЧ-инфекцией [61].

Уровень РМРАpp в покоящихся и активированных лимфоцитах периферической крови был в 1000 раз выше при лечении bis(РОС)-РМРА, чем при лечении РМРА. Кроме того, bis(РОС)-РМРА обеспечивал в 100 раз большую активность в отношении HIV установленных линий Т-лимфоцитов и лимфоцитов периферической крови.

Период полужизни РМРАpp, образовавшегося из bis(РОС)-РМРА или РМРА, был равен 12–15 ч в активированных лимфоцитах и 33–50 ч – в покоящихся лимфоцитах. Длительный период полужизни, уникальный для РМРАpp, позволяет снизить частоту приема данного препарата [62].

Продемонстрирована способность РМРА предотвращать развитие инфекции, обусловленной вирусом иммунодефицита обезьян (ВИО, или SIV) у макак, даже если лечение было начато через 24 ч после заражения. В этом отношении эффективность РМРА значительно превосходит таковую у AZT [63, 64]. В дальнейшем исследовании было доказано предупреждение инфицирования новорожденных макак при назначении РМРА по 30 мг/кг подкожно за 4 ч до перорального заражения ВИО и через 24 ч после него.

На основании приведенных данных можно предположить, что кратковременное назначение РМРА ВИЧ-инфицированным роженицам в начале родовой деятельности, а затем новорожденным сразу после рождения позволит снизить частоту ВИЧ-инфицирования в родах. Принимая во внимание высокую активность РМРА в отношении HBV *in vitro*, необходимо дальнейшее изучение эффективности РМРА или bis(РОС)-РМРА коротким курсом для профилактики интранатальной передачи HBV.

Очевидно, что для эффективного подавления репликации HIV необходимо применять комбинации противовирусных препаратов, например аналоги нуклеозидов, такие как AZT и ЗТС, с ингибиторами протеаз, например с индинавиром [66]. Комбинирование различных анти-HBV препаратов также может оказаться эффективнее, чем монотерапия.

Так, в эксперименте продемонстрировано синергидное действие *in vitro* комбинации РМЕА и пенцикловира, РМЕА и ламивудина в отношении HBV [67]. Флаванонид робустафлаван обладает синергизмом в комбинации с пенцикловиrom и ламивудином [68]. L(-)Fd4C в комбинации с AZT, d4T, ddC и ddI действует не только как синергист, но и снижает митохондриальную токсичность d4T, ddC и ddI [69].

ЗТС (ламивудин) и пенцикловир при комбинированном их применении действуют синергидно против ДНВВ в широком диапазоне клинически допустимых концентраций. Доказано также преимущество этой комбинации по сравнению с монотерапией по дестабилизации связей ковалентно замкнутой циркулярной ДНК данного вируса [70]. На основании полученных данных высказано предположение, что ЗТС и пенцикловир будут также проявлять синергизм *in vivo* [70].

Можно утверждать, что будущее химиотерапии больных вирусным гепатитом В принадлежит использованию комбинаций лекарственных средств, как это уже практикуется при лечении таких болезней, как туберкулез, онкозаболевания и СПИД. РМЕА и РМРА скорее всего будут играть важную роль в таких комбинациях.

В связи с этим необходимо заметить, что дифосфатная форма РМЕА (РМЕАpp) одинаково эффективна в отношении мутантной М552/І- и ДНК-полимеразы НВВ дикого типа [71]. Более того, доказана одинаковая активность РМЕАpp в отношении ДНК-полимеразы НВВ с двойной мутацией (L528M/L552V) ДНК-полимеразы ($K_i=0,079$ мкМ) и в отношении ДНК-полимеразы НВВ дикого типа ($K_i=0,10$ мкМ).

В то же время 5'-трифосфат ЗТС значительно слабее ингибирует ДНК-полимеразу НВВ с данной двойной мутацией ($K_i=6,3$ мкМ) по сравнению с ДНК-полимеразой НВВ дикого типа ($K_i=0,2$ мкМ). Это означает, что РМЕА может быть с успехом использован для лечения инфекций, резистентных к ЗТС, обусловленных штаммами НВВ и НВВ с двойной мутацией L528M/M552V.

Эффективность РМЕА в отношении вариантов НВВ, несущих мутации, ответственные за развитие резистентности к ламивудину и/или фамцикловиру (пенцикловиру), оправдывает применение РМЕА в качестве монотерапии инфекции НВВ, вызванной мутантными штаммами НВВ, а также комбинированное использование РМЕА в сочетании с ламивудином или фамцикловиrom до появления резистентности к двум последним препаратам.

Недавно предложена новая стратегия лечения ХВГ В, которая может использоваться в комбинации с препаратами, представленными в статье [72]. Данная стратегия базируется на нарушении метаболизма и транспорта гликопротеинов гепаднавирусов. В опыте доказано дозозависимое снижение концентрации ВГС у сурков, больных хроническим вирусным гепатитом при лечении N-нонил-деоксиножиримицином (ингибитор α -глюкозидаз), нарушающим метаболизм и транспорт гликопротеинов [72].

В концентрациях, подавляющих образование WHV, N-нонил-деоксиножиримицин не влиял на гликозилирование большинства гликопротеинов сыворотки крови, что указывает на вирусоспецифические свойства препаратов этого класса. Однако необходимы исследования переносимости и влияния этих препаратов при назначении их длительным курсом на элиминацию вируса из гепатоцитов.

Заключение

Первоначально некоторые препараты, являвшиеся случайными находками при поиске эффективных анти-НВВ и анти-НІV агентов, такие, как фамцикловир (пенцикловир), BMS-200475, ламивудин (ЗТС), (-)FТС, L(-)Fd4C, L-FMAU, DAPD (DXG), bis(РОМ)-РМЕА и bis(РОС)-РМРА, в настоящее время считаются многообещающими средствами терапии больных вирусным гепатитом В. Все эти препараты в концентрациях, значительно меньше токсических, подавляют репликацию НВВ в клетках Нер G2 2.2.15. Эти аналоги нуклеозидов, за исключением РМЕА (адефовира) и РМРА (тенофовира), перед превращением в активную форму трифосфата, ингибирующего ДНК-полимеразу НВВ, должны пройти три этапа фосфорилирования.

Для превращения в активные формы (РМЕАpp и РМРАpp соответственно), вызывающие терминацию цепи ДНК-полимеразы, ДНК, РМЕА (адефовир) и РМРА (тенофовир) проходят только два этапа фосфорилирования. Эффективность некоторых препаратов, например фамцикловира, ламивудина и адефовира, подтверждена на животных моделях при исследовании вирусных гепатитов пекинских уток и сурков.

Доказано также влияние лечения фамцикловиrom, ламивудином и адефовиrom на снижение уровня ДНК НВВ у больных ХВГ В. Однако при длительных курсах лечения фамцикловиrom и ламивудином в ДНК-полимеразе НВВ развивались мутации, приводящие к развитию резистентности (L528M и M552/I). Данные пенцикловиrom- и ламивудинорезистентные штаммы НВВ оставались чувствительными к адефовиру.

При лечении адефовиrom развития резистентных штаммов НВВ не отмечено. Очевидно, что будущее терапии инфекции, вызванной НВВ, как и в случае с ВИЧ-инфекцией, принадлежит использованию комбинированного лекарственного лечения. Это позволит не только добиться элиминации вируса, но и уменьшить вероятность развития резистентных штаммов НВВ.

Литература

1. Dusheiko G.M. Treatment and prevention of chronic viral hepatitis. *Pharmacol Ther* 1995;65:47-73.
2. Lai C.L., Chien R.N., Leung N.W.Y., et al. A 1-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1998;339:61S.
3. Lin E., Luscombe C., Colledge D., Wang Y.Y., Locarnini S. Long-term therapy with the guanine nucleoside analog penciclovir controls chronic duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2132-7.
4. Ganem D., Varmus H.E. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Ann Rev Biochem* 1987;56:651-93.
5. Yokota T., Mochizuki S., Konno K., Mori S., Shigeta S., DeClercq E. Inhibitory effects of selected antiviral compounds on human hepatitis B virus DNA synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:394-7.
6. Korba B.E., Boyd M.R. Penciclovir is a selective inhibitor of hepatitis B virus replication in cultured human hepatoblastoma cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1282-4.
7. Innaimo S.F., Seifer M., Bisacchi G.S., Stranding D.N., Zahler R., Colonno R.J. Identification of BMS-200475 as a potent and selective inhibitor of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:1444-8.
8. Ying C., Van Pelt J., Yap P., DeClercq E., Neyts J. Digoxigenin labelled probes for the detection of HBV-DNA in antiviral evaluation. Symposium on Emerging Therapies for Chronic Viral Hepatitis (Abstracts) Marriott Chateau Champlain Hotel. Montreal. Quebec, Canada. October 2-4, 1998.
9. Lin T.S., Luo M.Z., Liu M.C., et al. Design and synthesis of 2',3'-dideoxy-2',3'-dehydro- β -L-cytidine (β -L-d4C) and 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-P-1-5-fluorocytidine (β -L-Fd4C), two exceptionally potent inhibitors of human hepatitis B virus (HBV) and potent inhibitors of human immunodeficiency virus (HIV) in vitro. *J Med Chem* 1996;39:1757-9.
10. Furman P.A., Davis M., Liotta D.C., et al. The anti-hepatitis B virus activities, cytotoxicities, and anabolic profiles of the (-) and (+) enantiomers of *cis*-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine. *Antimicrob Agents Chemother* 1992;36:2682-92.
11. Balzarini J., Wedgwood O., Kruining J., Pelemans H., Heijtkink R., De Clercq E., McGuigan C. Anti-HIV and anti-HBV activity and resistance profile of 2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine (3TC) and its arylphosphoramidate derivative CF 1109. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;225:363-9.
12. Staschke K.A., Colacino J.M., Mabry T.E., Jones C.D. The in vitro anti-hepatitis B virus activity of FIAU [1-(2'-deoxy-2'-fluoro-1- β -D-arabinofuranosyl-5-iodo)uracil] is selective, reversible, and determined, at least in part, by the host cell. *Antiviral Res* 1994;23:45-61.
13. Pai S.B., Liu S.H., Zhu Y.L., Chu C.K., Cheng Y.C. Inhibition of hepatitis B virus by a novel L-nucleoside, 2'-fluoro-5-methyl-p-L-arabinofuranosyl uracil. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:380-6.
14. Balzarini J., Kruining J., Wedgwood O., et al. Conversion of 2',3'-dideoxyadenosine (ddA) and 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxyadenosine (ddA) to their corresponding aryl-oxophosphoramidate derivatives markedly potentiates their activity against human immunodeficiency virus and hepatitis B virus. *FEBS Lett* 1997;410:324-8.
15. Ma T., Lin J.S., Newton M.G., Cheng Y.C., Chu C.K. Synthesis and anti-hepatitis B virus activity of 9-(2-deoxy-2-fluoro- β -L-arabino-fluranosyl)purine nucleosides. *J Med Chem* 1997;40:2750-4.
16. Chen H., Boudinot F.D., Chu C.K., McClure H.M., Schinazi R.F. Pharmacokinetics of (-)- β -D-2-amino-purine dioxolane and (-)- β -D-2-amino-6-chloropurine dioxolane and their antiviral metabolite (-)- β -D-dioxolane guanine in rhesus monkeys. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:2332-6.
17. Yokota T., Konno K., Shigeta S., Holy A., Balzarini J., DeClercq E. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonate analogues on hepatitis B virus DNA synthesis in HB611 cells. *Antiviral Chem Chemother* 1994;5:57-63.
18. Heijtkink R.A., Kruining J., de Wilde G.A., Balzarini J., DeClercq E., Schalm S.W. Inhibitory effects of acyclic nucleoside phosphonates on human hepatitis B virus and duck hepatitis B virus infections in tissue culture. *Antimicrob Agents Chemother* 1994;38:2180-2.
19. Heijtkink R.A., deWilde G.A., Kruining J., et al. Inhibitory effect of 9-(2-phosphonylmethoxyethyl) adenine (PMEA) on human and duck hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 1993;21:141-53.
20. Yokota T., Konno K., Chonan E., et al. Comparative activities of several nucleoside analogs against duck hepatitis B virus in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1990;34:1326-30.
21. Wang G.H., Seeger C., The reverse transcriptase of hepatitis B virus acts as a protein primer for viral DNA synthesis. *Cell* 1992;71:663-70.
22. Shaw T., Mok S.S., Locarnini S.A. Inhibition of hepatitis B virus DNA polymerase by enantiomers of penciclovir triphosphate and metabolic basis for selective inhibition of HBV replication by penciclovir. *Hepatology* 1996;24:996-1002.
23. Liu S.H., Grove K.L., Cheng Y.C. Unique metabolism of a novel antiviral L-nucleoside analog, 2'-fluoro-5-methyl- β -L-arabino-furanosyluracil: a substrate for both thymidine kinase and deoxycytidine kinase. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:833-9.
24. Severini A., Liu X.Y., Wilson-J.S., Tyrrell D.L.J. Mechanism of inhibition of duck hepatitis B virus polymerase by (-)- β -L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1995;39:1430-5.
25. Kukhanova M., Li X., Chen S.H., et al. Interaction of p-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluoro-CTP with human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase and human DNA polymerases: implications for human immunodeficiency virus drug design. *Mol Pharmacol* 1998;53:801-7.
26. Kukhanova M., Lin Z.Y., Yas'co M., Cheng Y.C. Unique inhibitory effect of 1-(2'-deoxy-2'-fluoro- β -L-arabinofuranosyl)-5-methyluracil 5'-triphosphate on Epstein-

- Barr virus and human DNA polymerases. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1181-7.
27. Zhu Y.L., Dutschman G.E., Liu S.H., Bridges E.G., Cheng Y.C. Anti-hepatitis B virus activity and metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro- β -L(-)-5-fluorocytidine. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;2:1805-10.
 28. Balzarini J., Nave J.F., Becker M.A., Tatibana M., DeClercq E. Kinetic properties of adenine nucleotide analogues against purified 5-phosphoribosyl-1-pyrophosphate synthetases from *E. coli*, rat liver and human erythrocytes. *Nucleosides Nucleotides* 1995;14:1861-71.
 29. Merta A., Votruba I., Jindrich J., et al. Phosphorylation of 9-f2-phosphonomethoxyethyladenine and 9-(5')-(3-hydroxy-2-phosphonomethoxypropyl)-adenine by AMP (dAMP) kinase from L1210 cells. *Biochem Pharmacol* 1992;44:2067-77.
 30. Naesens L., Snoeck R., Andrei G., Balzarini J., Neyts J., DeClercq E. HPMPC (cidofovir), PMEA (adefovir) and related acyclic nucleoside phosphonate analogues: a review of their pharmacology and clinical potential in the treatment of viral infections. *Antiviral Chem Chemother* 1997;8:1-23.
 31. Kramata P., Votruba I., Olova B., Holy A. Different inhibitory potencies of acyclic phosphonomethoxyalkyl nucleotide analogs towards DNA polymerases alpha, delta and epsilon. *Mol Pharmacol* 1996;49:1005-11.
 32. Cihlar T., Chen M.S. Incorporation of selected nucleoside phosphonates and anti-human immunodeficiency virus nucleotide analogues into DNA by human DNA polymerases α , β and γ . *Antiviral Chem Chemother* 1997; 8:187-95.
 33. Tsiquaye K.N., Sutton D., Maung M., Boyd M.R. Antiviral activities and pharmacokinetics of penciclovir and famciclovir in Pekin ducks chronically infected with duck hepatitis B virus. *Antiviral Chem Chemother* 1996;7:153-9.
 34. Lin E., Luscombe C., Wang Y.Y., Shaw T., Locarnini S. The guanine nucleoside analog penciclovir is active against chronic duck hepatitis B virus infection in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:413-8.
 35. Zoulim F., Dannaoui E., Borel C., et al. 2',3'-Dideoxy- β -L-5-fluorocytidine inhibits duck hepatitis B virus reverse transcription and suppresses viral DNA synthesis in hepatocytes, both in vitro and in vivo. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:448-53.
 36. Aguesse-Germon S., Liu S.H., Chevallier M., et al. Inhibitory effect of 2'-fluoro-5-methyl-p-L-arabinofuranosyluracil on duck hepatitis B virus replication. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:369-76.
 37. Cullen J.M., Smith S.L., Davis M.G., et al. In vivo antiviral activity and pharmacokinetics of (-)-*cis*-5-fluoro-1-[2-(hydroxymethyl)-1,3-oxathiolan-5-yl]cytosine in woodchuck hepatitis virus-infected woodchucks. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41:2076-82.
 38. Mason W.S., Cullen J., Moraleda G., et al. Lamivudine therapy of WHV-infected woodchucks. *Virology* 1998;245:18-32.
 39. Korba B.E., Peek S.F., Toshkov I.A., et al. Treatment with lamivudine (3TC, 3'-thiacytidine) delays development of hepato-cellular carcinoma (HCC) in woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis B virus (WHV). Abstracts of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, San Diego, CA, September 24-27, 1998, Abstract no. H-54.
 40. Boker K.H., Ringe K., Kruger M., Pichlmayr R., Manns M.P. Prostaglandin E plus famciclovir—a new concept for the treatment of severe hepatitis B after liver transplantation. *Transplantation* 1994;57:1706-8.
 41. Kruger M., Tillmann H.L., Trautwein C., et al. Famciclovir treatment of hepatitis B virus recurrence after liver transplantation: a pilot study. *Liver Transpl Surg* 1996;2:253-62.
 42. Main J., Brown J.L., Howells C., et al. A double blind, placebo-controlled study to assess the effect of famciclovir on virus replication in patients with chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepatitis* 1996;3:211-5.
 43. Singh N., Gayowski T., Wannstedt C.F., Wagener M.M., Marino I.R. Pretransplant famciclovir as prophylaxis for hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transplantation* 1997;63:1415-9.
 44. Kruger M., Boker K.H.W., Zeidler H., Manns M.P. Treatment of hepatitis B-related polyarteritis nodosa with famciclovir and interferon α -2b. *J Hepatol* 1997;26:935-9.
 45. Milich D.R., Jones J.E., Huehes J.L., Price J., Raney A.K., McLachlan A. Is a function of the secreted hepatitis B e antigen to induce immunologic tolerance in utero? *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6599-603.
 46. Deeks S.G., Collier A., Lalezari J., et al. The safety and efficacy of adefovir dipivoxil, a novel anti-human immunodeficiency virus (HIV) therapy, in HIV-infected adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Infect Dis* 1997;176:1517-23.
 47. Barditch-Crovo P., Toole J., Hendrix C.W., et al. Anti-human immunodeficiency virus (HIV) activity, safety, and pharmacokinetics of adefovir dipivoxil 9-[2-bis-pivaloyloxymethyl]phosphonyl-methoxyethyladenine in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 1997;176:406-13.
 48. Gilson R.J., Cliopra K., Murray-Lyon I., et al. Adefovir dipivoxil (Bis-POM PMEA) treatment for chronic hepatitis B infection: a placebo-controlled phase I/II study. 36th Annual Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, LO. September 15-18, 1999A. Late Breakers, p. 7, no. LBI.
 49. Jeffers L., Heathcote E., Wright T., et al. A phase II dose-ranging, placebo-controlled trial of adefovir dipivoxil for the treatment of chronic hepatitis B virus infection. Abstracts of the Eleventh International Conference on Antiviral Research. San Diego, California. April 5-10, 1998. Late Breakers, p. 9, no. 197.
 50. Ling R., Mutimer D., Ahmed M., et al. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplantation recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996;24:711-3.
 51. Tipples G.A., Ma M.M., Fischer K.P., Bain V.G., Kneteman N.M., Tyrrell D.L. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine in vivo. *Hepatology* 1996;24:714-7.

52. Bartholomew M.M., Jansen R.W., Jeffers L.J., et al. Hepatitis-B-virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. *Lancet* 1997;349:20-2.
53. Honkoop P., Niesters H.G., deMan R.A., Osterhaus A.D., Schiølm S.W. Lamivudine resistance in immunocompetent chronic hepatitis B. Incidence and patterns. *J Hepatol* 1997;26:1393-5.
54. Fischer K.P., Tyrrell D.L.J. Generation of duck hepatitis B virus polymerase mutants through site-directed mutagenesis which demonstrate resistance to lamivudine [(-)-p-L-2',3'-dideoxy-3'-thiacytidine] in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1996;40:1957-60.
55. Fu L., Cheng Y.C. Role of additional mutations outside the YMDD motif of hepatitis B virus polymerase in L(-)SddC (3TO resistance. *Biochem Pharmacol* 1998;55:1567-72.
56. Niesters H.G.M., Honkoop P., Haagsma E.B., et al. Identification of more than one mutation in the hepatitis B virus polymerase gene arising during prolonged lamivudine treatment. *J Infect Dis* 1998;177:1382-5.
57. Ladner S.K., Miller T.J., King R.W. The M539V polymerase variant of human hepatitis B virus demonstrates resistance to 2'-deoxy-3'-thiacytidine and a reduced ability to synthesize viral DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:2128-31.
58. Ladner S.K., Miller T.J., Otto M.J., King R.W. The hepatitis B virus M539V polymerase variation responsible for 3TC resistance also confers cross-resistance to other nucleoside analogues. *Antiviral Chem Chemother* 1998;9:65-72.
59. Aye T.T., Bartholomeusz A., Shaw T., et al. Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J Hepatol* 1997;26:1148-53.
60. Mulato A.S., Lamy P.D., Miller M.D., et al. Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type I variants isolated from AIDS patients after prolonged adefovir dipivoxil therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1620-8.
61. Naesens L., Bischofberger N., Auaustijns P., et al. Antiretroviral efficacy and pharmacokinetics of oral bis(isopropyl)oxycarbonyloxymethyl-9-(2-phosphonylmethoxypropyl)adenine in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1568-73.
62. Robbins B.L., Srinivas R.V., Kim C., Bischofberger N., Fridland A. Anti-human immunodeficiency virus activity and cellular metabolism of a potential prodrug of the acyclic nucleoside phosphonate 9-R-(2-phosphonomethoxypropyl)adenine (PMPA) histisopropylmethylcarbonyl)PMPA. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:612-7.
63. Tsai C.C., Follis K.E., Sabo A., et al. Prevention of SIV infection in macaques by (R)-9-2-phosphonylmethoxypropyl)adenine. *Science* 1995;270:1197-9.
64. Van Rompay K.K.A., Martha M.L., Lifson I.D., et al. Administration of 9-[2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine (PMPA) for prevention of perinatal simian immunodeficiency virus infection in rhesus macaques. *AIDS Res Hum Retrovir* 1998;14:761-72.
65. Van Rompay K.K.A., Berardi C.J., Aguirre N.L., et al. Two doses of PMPA protect newborn macaques against oral simian immunodeficiency virus infection. *AIDS* 1998;12: F79-F83.
66. Havlir D.V., Richman D.D. Viral dynamics of HIV: implications for drug development and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* 1996;124:984-94.
67. Shaw T., Colledge D., Locarnini S.A. Synergistic inhibition of in vitro hepadnaviral replication by PMEA and penciclovir or lamivudine. Abstracts of the Tenth International Conference on Antiviral Research. Atlanta, Georgia. April 6-11. 1997, Abstract no. 33, p. A51.
68. Zembower D.E., Lin Y.M., Flavin M.T., Chen F.C., Korba B.E. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Res* 1998;39:81-8.
69. Dutschman G.E., Bridges E.G., Liu S.H., et al. Metabolism of 2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxy-p-L(-)-5-fluorocytidine' and its activity in combination with clinically approved anti-human immunodeficiency virus P-D(+) nucleoside analogs in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 1998;42:1799-804.
70. Colledge D., Locarnini S., Shaw T. Synergistic inhibition of hepadnaviral replication by lamivudine in combination with penciclovir in vitro. *Hepatology* 1997;26:216-25.
71. Xiong X., Flores C., Yang H., Toole J.J., Gibbs C.S. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology* 1998;27 (in press).
72. Block T.M., Lu X., Mehta A.S., et al. Treatment of chronic hepadnavirus infection in a woodchuck animal model with an inhibitor of protein folding and trafficking. *Nat Med* 1998;4:610-4