

VARIANTELE NATURALE DE REZISTENȚĂ PENTRU INHIBITORII DE POLIMERAZĂ AI VIRUSULUI HEPATITEI C LA PACIENȚII INFECTAȚI CU GENOTIPUL 1B, NAIVI DE TRATAMENT

NATURALLY OCCURRING RESISTANCE VARIANTS TO HEPATITIS C VIRUS POLYMERASE INHIBITORS IN TREATMENT-NAÏVE PATIENTS INFECTED WITH GENOTYPE 1B

Viorica BALAN

Catedra de Medicină Internă nr. 4, Universitatea de Medicină și Farmacie "Nicolae Testemițanu"

Rezumat

ARN polimeraza ARN dependentă a virusului hepatitei C, NS5B, este esențială pentru replicarea ARN-lui viral și de aceea constituie o țintă terapeutică atractivă. Mai mulți analogi nucleosidici, inhibitori nonnucleozidici și analogi de ciclosporină au fost dezvoltati pentru a inhiba activitatea NS5B. Totuși, modificările de nucleotide în gena NS5B pot conferi rezistență la aceste antipolimeraze.

Metode: S-a investigat prevalența substituțiilor cunoscute ce conferă rezistență în polimeraza NS5B la 46 pacienți cu hepatită cronică virală C de genotipul 1b, naivi de tratament antiviral prin secvențierea genei NS5B.

Rezultate: Nici una din cele 46 secvențe analizate nu conține substituții de rezistență la analogii nucleozidici. Totuși, substituțiile ce conferă rezistență la analogii nonnucleozidici au fost comune în tulpinile examinate. Similar, substituțiile ce conferă rezistență la analogii de ciclosporină sunt de asemenea frecvente.

Concluzii: Prevalența naturală a substituțiilor ce conferă rezistență la inhibitorii NS5B este comună la pacienții infectați cu genotipul 1b VHC. Influența acestora asupra răspunsului la tratament este necesar de a fi evaluată.

Summary

Background: The hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase, NS5B, is essential for virus RNA replication, thus represents an attractive therapeutic target. Several nucleoside analogues, non-nucleoside inhibitors and cyclosporine analogues are being developed to inhibit NS5B activity. However, nucleotide changes in NS5B gene can confer resistance to these anti polymerases.

Methods: We investigated the prevalence of known substitutions conferring resistance in HCV polymerase in 46 treatment-naïve patients infected with HCV genotype 1b by sequencing of NS5B gene.

Results: None of 46 HCV NS5B sequences analyzed contained substitutions conferring resistance to nucleoside analogues. However, the substitutions which confer resistance to non-nucleoside inhibitors were common in examined strains. Similarly, the substitutions conferring resistance to cyclosporine analogues were frequent.

Conclusions: Naturally occurring substitutions conferring resistance to NS5B inhibitors are common in patients infected with hepatitis C virus genotype 1b. Their influence on treatment outcome should be assessed.

Introducere

Infecția cu virusul hepatitei C (HCV) prezintă o problemă majoră în ceea ce privește sănătatea publică pe plan mondial. Ultimele date indică o prevalență de aproximativ 2,2-3,0%, ceea ce reprezintă 130-170 milioane de persoane [1]. Actualmente tratamentul standard al infecției VHC este asocierea dintre Interferonul alfa pegilat și Ribavirină, rata răspunsului virologic susținut fiind de aproximativ 45% pentru pacienții infectați cu genotipul 1 [2, 3].

ARN-polimeraza ARN dependentă a virusului C, NS5B este esențială pentru replicarea ARN-ului viral și de aceea este o țintă atractivă pentru tratament. Rolul principal al ARN-polimerazei este asamblarea complexului de replicare la membrana reticulului endoplasmatic a celulei gazdei și amplificarea materialului genetic al virusului. NS5B interacționează de asemenea cu ciclofilina B, stimulând activitatea ARN dependentă.

Inhibitorii specifici de VHC reprezintă o avansare majoră în tratamentul hepatitei virale C (Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV (STAT-C)). Actualmente, principalele ținte sunt proteinele NS3/4A care posedă activitate protează și helicăză și proteina NS5B care posedă activitate polimerază [4].

Inhibitorii de polimerază pot fi clasificați în două grupe: inhibitori nucleozidici sau nucleotidici (NI) care acționează la nivelul situsului catalitic al enzimei și inhibitori nonnucleozidici (NNI) care sunt inhibitori alosterici. Analogii de nucleozide sunt transformați în nucleotide de către celule, apoi sunt încorporați în ARN-ul viral în curs de sinteză blocând sinteza de ARN (sunt terminatori de lanț). Inhibitorii nonnucleozidici sunt inhibitori alosterici ai proteinei NS5B care împiedică modificarea conformării enzimei necesară pentru sinteza ARN-ului. Inhibitorii nonnucleozidici (NNI) pot interacționa la nivelul a patru locusuri alosterice de la A la D ale

polimerazei. Locusul A este țintă pentru NNI-1 (benzimidazol și indoli) [5, 6], locusul B este țintă pentru NNI-2 (thiophene carboxilic acid, dihidropiranone și pyranoindoli) [7, 8], locusul C este țintă pentru NNI-3 (benzotiazidine, prolin sulfonamide, derivați de acid acrilic) [9, 10] și locusul D este țintă pentru NNI-4 (benzofurani) [11]. Ciclosporina A blochează replicarea VHC suprimând rolul ciclofilinei B asupra polimerazei NS5B. Au fost dezvoltate analogi nonimunosupresivi ai ciclosporinei ce inhibă replicarea VHC [12, 13].

Problema majoră a tratamentului antiviral ce vizează proteinele virale este selecția mutațiilor rezistente. În acest articol s-a investigat prevalența naturală a mutațiilor dominante ce conferă rezistență la inhibitorii de polimerază prin analiza polimorfismului NS5B a 46 tulpini de VHC de la pacienți infectați cu genotipul 1b, naivi de tratament antiviral.

Material și metode

46 tulpini de VHC, genotipul 1b au fost obținute din eșantioanele de ser colectate de la pacienți cu hepatită cronică virală C naivi de tratament antiviral. Determinarea încărcăturii virale s-a efectuat prin tehnica Abbott Real Time HCV, care este o tehnică de cuantificare a ARN-VHC utilizând tehnologia de PCR în timp real cu sondă fluorogenică.

Amplificarea și secvențierea genei NS5B

ARN-ul viral a fost extras cu ajutorul chitului QIAmp[®] Viral RNA Mini kit (Qiagen[®]) din 200 μl de ser colectat de la pacienți VHC pozitivi, incluși în studiu conform recomandărilor fabricantului. Amplificarea țintei (regiunea NS5B) a fost realizată prin RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reactions) cu ajutorul chitului SuperScript[®] III One-Step RT-PCR System cu Platinum[®] Taq High Fidelity DNA Polymerase (Invitrogen) și PCR-nested utilizând Expand High Fidelity^{PLUS} PCR System (Roche). Toate reacțiile de PCR au fost realizate în termociclorul GeneAmp[®] PCR System 9600 (Perkin-Elmer).

ARN-ul genotipului 1 a fost amplificat prin RT-PCR cu primerii specifici de genotip 1: sens MD-G1-S (5'-ACG-GARGAYGTCGTSTGCTGCTC-3') și anti-sens LP1-1ab-AS (5'-CGGTTGGGGAGSAGGTARATGCCTACCCCTRC-3'). Metoda de RT-PCR a fost realizată utilizând următorul program: 1 ciclu de retrotranscripție la 50°C timp de 30 min, 1 ciclu de denaturare inițială la 94°C timp de 2 min, urmat de 50 cicluri de amplificare ce cuprind 15 sec de denaturare la 94°C, 30 sec de hibridizare la 58°C și 2 min de elongație la 68°C. Controlul amplificării prin RT-PCR a regiunii NS5B a fost analizat prin electroforeză în gel de agaroză BET 2% timp de 30 min la 135 V. Mărimea produselor amplificate era de 1793 bp. Al doilea PCR hemi-nested a fost realizat doar dacă produsele de la prima amplificare n-au fost amplificate sau prezentau benzi parazite. Două PCR hemi-nested overlapping au fost realizate: primul PCR hemi-nested (debutul NS5B) grație primerilor: sens MD-G1-S și antisens ENO2-AS (5'-GGCG-GAATT CCTGGTCATAGCCTCCGTGAA-3') și al doilea PCR hemi-nested (sfârșitul NS5B) cu ajutorul primerilor: sens SO-G1-S (5'-TATGAYACCCGCTGT TTTGACTC-3') și anti-sens LP1-1ab-AS. Programul de amplificare: 1 ciclu de denaturare la 94°C timp de 2 min, urmat de 40 cicluri de amplificare ce cuprind 30 sec de denaturare la 94°C, 30 sec de hibridizare la 55°C și 1 min 15 sec de elongație la 72°C. Mărimea produselor amplificate după migrarea în gel de agaroză BET 2% era pentru MD-7580-G1-S/ENO2-AS de 1040 bp și pentru SO-G1-S/LP1-

1ab-AS de 1120 bp.

Analiza secvențelor de nucleotide

Produșii amplificați prin PCR au fost purificați cu ajutorul chitului NucleoSpin[®] Extract II (Macherey Nagel) în conformitate cu recomandările fabricantului. Produșii purificați au fost cuantificați în NanoDrop[™] (Thermo Fisher Scientific). Produșii de PCR purificați au fost secvențiați prin metoda lui Sanger, care se bazează pe utilizarea nucleotidelor particulare numite didezoxinucleotide (ddNTP), care blochează sinteza de ADN de către ADN polimeraze după încorporarea lor. Reacția de PCR de secvență a fost realizată cu aceiași primeri care au servit pentru a obține produșii de amplificare și doi primeri suplimentari: sens ENO2-G1-S (5'-TTCACGGAGGCTAT-GACYAGGTA CTCHGC-3') și anti-sens MD-G1-AS (5'-CG-GACGTCYTTTGCCCCATAGC AAA-3'), cu ajutorul chitului BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems).

Migrarea secvențelor a fost realizată în aparatul ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) prin electroforeză capilară. Secvențele obținute au fost aliniat cu ajutorul programului SeqScape[®] v2.5 (Applied Biosystems) și analizate pentru prezența mutațiilor rezistente cunoscute în polimeraza NS5B.

Genotipul virusului C a fost determinat prin analiza filogenetică a secvențelor obținute de NS5B cu genomurile de referință din baza de date pentru virusul hepatitei C: HCV blast, Los Alamos (SUA) și Oxford HCV Automated Sequencing tool (version 2.0).

Rezultate

În gena NS5B s-au identificat substituțiile ce conferă rezistență la inhibitorii de polimerază (tab. 1).

Inhibitorii de nucleozide. Nici una din variantele S96T, S96T/N142T cu sensibilitate diminuată la analogul nucleozidic R1479 [14] sau varianta S282T cu sensibilitate diminuată la analogul nucleozidic PSI-6130 [15] n-a fost identificată la cele 46 tulpini.

Inhibitorii nonnucleozidici. Derivații de benzimidazol se atașează la locusul A al polimerazei [16]. Substituțiile ce conferă rezistență la compușii acestui grup au fost identificate în trei poziții (P495S/L/A/T; P496S/A și V499A), dar gradul de rezistență a mutațiilor variază, astfel substituția prolinei 495 provoacă rezistență majoră, substituția prolinei 496 conferă rezistență medie, pe când V499A cauzează doar modificări minore în activitate [17]. Nici un polimorfism în pozițiile 495 și 496 n-a fost atestat la cele 46 tulpini de VHC. Totuși, varianta V499A a fost găsită la 7 tulpini (15%). BILB1941, un NNI-1, a fost evaluat recent. Mutațiile I424V, V494I/A, P496A au fost asociate *in vitro* cu sensibilitate diminuată la acest compus, cauzând o rezistență minoră pentru activitatea lui BILB 1941. Varianta I424V s-a observat la 4 tulpini, iar V494A a fost identificată doar la o tulpină.

Derivatele de acid tiofen-2-carboxilic, piranoindoli și dehidropirone (NNI-2) se leagă la locusul B al polimerazei. *In vitro*, substituțiile L419M/I, M423T și I482L conferă rezistență majoră la derivatele de tiofene, pe când M423I conferă rezistență minoră [18]. O singură substituție (L419M sau M423V) conferă o rezistență de 8-10 ori mai mare, pe când o combinație de substituții (T19P, M71V, A338V, M423V, A442T) a arătat o rezistență de 17 ori mai mare la piranoindoli [19]. Au fost identificate mutațiile asociate cu rezistența la tratamentul cu AG-021541, derivat de dihidropirone, așa ca M423T/V/I, M426T,

Tabela 1.

Prezența substituițiilor descrise în literatură, ce conferă rezistență la antipolimeraze și identificate la 46 pacienți infectați cu virusul hepatitei C, genotipul 1b și secvența de referință a genei NS5B. Substituțiile ce conferă rezistență majoră sunt reprezentate în format bold.

Poziția	19	71	95	96	142	282	316	338	365	368	411	414	419	422	424	423	426	432	442	448	482	494	495	496	499	538	554	555	556	559
AF207764-1b	Q	V	H	S	N	S	C	A	S	S	N	M	L	R	I	M	M	I	A	Y	I	V	P	P	V	P	G	Y	S	D
1	S	M	V	A
2	S	M	V	G	.
3	S	M	N	V
4	S	M	V
5	S	M	N	A
6	.	M	V	T
7	S	M	N	G	.	
8	S	M	N	V
9	S	M
10	.	I	V	A	.	.	G	.	.
11	S	M	V
12	S	M	V	L	A
13
14	T	M	V
15	S	M	V
16	S	M	V
17	S	M	N	V	V	.	T
18	S	M	V	L
19	N	M	V
20	S	M
21	.	M	V
22	S	M	V
23	S	M	N	V	G	H	.
24	A	N
25	S	M	V
26	S	M	V
27	S	M	V	L	.	T
28	S	M	V	V
29	S	M	V	V	G	.
30	S	M	V	C
31	S	M	N	A
32	S	M	V	L
33	S	M	V	T
34	S	M	V
35	S	M	N	V
36	S	M	V	A
37	S	V	T
38	S	M	V	T
39	S	M	V
40	S	M	V	K	V	.	T
41	S	M	V
42	S	M	V
43	S	M	V	A
44	S	M	V
45	S	M	V
46	S	M	V	A

I482S/T și V494A. Aceste variante conferă diferite nivele de rezistență la AG-021541 [20]. Substituțiile din M în T, V sau I la aminoacidul 423 al polimerazei conferă o rezistență de 31 ori mai mare la AG-021541, pe când substituțiile altor aminoacizi (M426T, I482T sau V494A) cauzează rezistență minoră, de ordinul a 4,5-7 ori [20]. Trei tulpini (6,5%) au prezentat substituții asociate cu sensibilitate diminuată la NNI-2. Două au prezentat mutația M426T și una V494A. Toate 46 tulpini au fost înalt polimorfe la nivelul aminoacizilor T19, M71, A338, M423, A442, mai cu seamă în poziția 19 și 71, dar combinarea celor 5 mutații n-a fost identificată la nici o tulpină.

Derivații de benzotiazidine se leagă la locusul C al polimerazei. O singură substituție în polimeraza NS5B (H95Q, N411S, M414L/T/Q, S556G sau Y448H) rezultă în susceptibilitate di-

minuată la derivatul de benzotiazidină, A-782759 [21]. Pentru alt derivat de benzotiazidine, A-837093, substituțiile G554D și S368A conferă rezistență majoră la tratament [22]. Substituțiile de aminoacizi Y448H, Y555C sau D559G sunt de 100-200 ori mai rezistente la A-837093. Doar o singură mutație S556G a fost pusă în evidență la 5 tulpini (11%).

Derivații de benzofurani se atașează la locusul D al polimerazei. Variantele cu substituțiile C316Y/N/F sau S365T/S/A/L au arătat o afinitate diminuată pentru tratamentul cu HCV-796. Varianta C316N a fost identificată la 8 tulpini (17%) din cele examinate, iar polimorfismul rezidului 365 n-a fost pus în evidență la nici o tulpină.

Analogii de ciclosporină. Mai mulți analogi nonimunosupresivi de ciclosporină au fost dezvoltati pentru a inhiba

replicarea VHC [13]. Sensibilitatea lui VHC la această moleculă depinde de polimorfismul NS5A și NS5B [23]. În sistemul replicon, substituția I432V poate conferi rezistență la ciclosporina A. Similar, substituția I432V poate avea un impact asupra analogului de ciclosporină, SCY-635 [23]. Această mutație n-a fost identificată la tulpinile examinate. Alți analogi de ciclosporină, așa ca NIM811 și DEBIO-025 au activitate potentă anti-VHC [13, 24]. Polimeraza NS5B cu substituția P538T, care n-a fost identificată la nici o tulpină examinată, și variația S556G, care a fost prezentă la 8 tulpini (17%), prezintă sensibilitate diminuată la aceste molecule [25].

Discuții

S-a raportat prevalența naturală a variantelor cu sensibilitate diminuată la inhibitorii de polimerază la tulpinile de genotipul 1b VHC. Deși substituțiile ce conferă rezistență la inhibitorii nucleozidici sunt foarte rare, cele asociate cu rezistență la inhibitorii nonnucleozidici și analogii de ciclosporină sunt comune. Studiile anterioare au evaluat prevalența mutațiilor ce apar natural la inhibitorii nucleozidici și nonnucleozidici la un larg număr de tulpini de genotipul 1 [26, 27]. Ca și în studiul actual, nici o substituție ce conferă rezistență la analogii nucleozidici n-a fost identificată. Le Pogam și colab. au raportat o frecvență înaltă de substituții (21%) implicate în rezistența la inhibitorii nonnucleozidici la 91 eșantioane clinice de genotipul 1 VHC.

Rezultatele noastre concordă cu studiile *in vitro* ce au evaluat eficiența inhibitorilor nucleosidici și nonnucleosidici asupra polimerazei VHC de diferite genotipuri [28, 29]. S-a sugerat că derivații de benzotiazidine au sensibilitate diminuată în prezența variantei S556G, care a fost depistată la 5 tulpini în

studiul nostru. Pauwels și colab., precum și Herlihy și colab. au demonstrat că compușii de benzimidazol pot inhiba toate genotipurile cu excepția genotipului 2. Noi am identificat varianta V499A la 15% din tulpinile examinate, care este asociată cu sensibilitate diminuată la benzimidazoli. Aceasta este o mutație cu rezistență minoră, dar sunt necesare studii *in vivo* pentru evaluarea reală a impactului acestei mutații. Le Pogam și colab. au demonstrat ca substituția C316N conferă o rezistență de 30 ori mai mare la derivații de benzofurani, care a fost pusă în evidență la 17% din tulpinile examinate

S-a identificat de asemenea substituția S556G ce conferă rezistență la analogii nonimunosupresivi ai ciclosporinei, așa ca NIM811 și DEBIO-025.

Agenții direcți anti-VHC, așa ca inhibitorii de protează NS3 și de polimerază NS5B cuplați cu terapia curentă peginterferon-alfa și ribavirină, pot constitui tratamentul de viitor al hepatitei cronice virale C. Moleculele noi ce vizează proteinele VHC ar putea ameliora rata răspunsului la interferon și ribavirină. Pentru aceasta este necesar de a cunoaște frecvența variantelor cu substituții ce conferă rezistență la pacienții **naivi de tratament** și impactul lor asupra tratamentului *in vivo*.

Concluzii

Acest studiu a arătat că analogii nucleozidici pot fi activi la toate tulpinile de VHC examinate. Totuși, inhibitorii non-nucleosidici pot avea activitate limitată asupra unor tulpini de genotipul 1 din cauza prezenței substituțiilor ce conferă rezistență. Substituțiile ce conferă rezistență la analogii ciclosporinei sunt de asemenea prevalente. Astfel, screening-ul polimerazei NS5B ar putea fi util, mai cu seamă la pacienții cu hepatită cronică virală C nonrespondenți anterior la tratamentul combinat peg-interferon și ribavirină.

Bibliografie

1. LEVANCHY D. The global burden of hepatitis C. *Liver International* 2009; 29(S1): 74–81
2. MANNS M. P., MCHUTCHISON J. G., GORDON S. C. et al. Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 2001; 358: 958-965.
3. FRIED M. W., SHIFFMAN M. L., REDDY K. R. et al. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*. 2002; 347: 975-982.
4. DE FRANCESCO R., TOMEI L., ALTAMURA S. et al. Approaching a new era for hepatitis C virus therapy: inhibitors of the NS3-4A serine protease and the NS5B RNA-dependent RNA polymerase. *Antiviral Res.* 2003; 58: 1–16.
5. TOMEI L., ALTAMURA S., BARTHOLOMEW L. et al. Mechanism of action and antiviral activity of benzimidazole-based allosteric inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol.* 2003; 77: 13225-13231.
6. HARPER S., PACINI B., AVOLIO S. et al. Development and preliminary optimization of indole-N-acetamide inhibitors of hepatitis C virus NS5B polymerase. *J Med Chem.* 2005; 48: 1314-1317.
7. CHAN L., PEREIRA O., REDDY T. J. et al. Discovery of thiophene-2-carboxylic acids as potent inhibitors of HCV NS5B polymerase and HCV subgenomic RNA replication. Part 2: tertiary amides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2004; 14: 797-800.
8. GOPALSAMY A., LIM K., CISZEWSKI G. et al. Discovery of pyrano[3,4-b]indoles as potent and selective HCV NS5B polymerase inhibitors. *J Med Chem.* 2004; 47: 6603-6608
9. DHANAK D., DUFFY K. J., JOHNSTON V. et al. Identification and biological characterization of heterocyclic inhibitors of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 38322-38327.
10. PFEFFERKORN J. A., NUGENT R., GROSS R. J. et al. Inhibitors of HCV NS5B polymerase. Part 2: Evaluation of the northern region of (2Z)-2-benzoylamino-3-(4-phenoxy-phenyl)-acrylic acid. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 15: 2812-2818.
11. GOPALSAMY A., APLASCA A., CISZEWSKI G. et al. Design and synthesis of 3,4-dihydro-1H-[1]-benzothieno[2,3-c]pyran and 3,4-dihydro-1H-pyrano[3,4-b]benzofuran derivatives as non-nucleoside inhibitors of HCV NS5B RNA dependent RNA polymerase. *Bioorg Med Chem Lett.* 2006; 16: 457-460
12. PEEL M., HARRIS R., HUANG Z. et al. The Discovery of Novel, Non-immunosuppressive Cyclosporin Ethers, and Thioethers with Potent HCV Activity 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, San Francisco 2008, CA, USA: Abs 1915.
13. PAESHUYSE J., KAUL A., DE CLERCQ E. et al. The non-immunosuppressive cyclosporin DEBIO-025 is a potent inhibitor of hepatitis C virus replication *in vitro*. *Hepatology* 2006; 43:761-770.
14. SMITH D.B., MARTIN J.A., KLUMPP K. et al. Design, synthesis, and antiviral properties of 4'-substituted ribonucleosides as inhibitors of hepatitis C virus replication: the discovery of 25 R1479. *Bioorg Med Chem Lett.* 2007; 17: 2570-2576.
15. MURAKAMI E., BAO H., RAMESH M. et al. Mechanism of activation of beta-D-2'-deoxy-2'-fluoro-2'-c-methylcytidine and inhibition of hepatitis C virus NS5B RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51: 503-509

16. PAWLITSKY J. M., CHEVALIEZ S. AND MCHUTCHISON J. G. The hepatitis C virus life cycle as a target for new antiviral therapies. *Gastroenterology* 2007; 132:1979-1998.
 17. KUKOLJ G., MCGIBBON G. A., MCKERCHER G. et al. Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J Biol Chem* 2005; 280: 39260-39267.
 18. LE POGAM S., KANG H., HARRIS S. F. et al. Selection and characterization of replicon variants dually resistant to thumb- and palm-binding nonnucleoside polymerase inhibitors of the hepatitis C virus. *J Virol.* 2006; 80: 6146-6154.
 19. HOWE A. Y., CHENG H., THOMPSON I. et al. Molecular mechanism of a thumb domain hepatitis C virus nonnucleoside RNA-dependent RNA polymerase inhibitor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 4103-4113.
 20. SHI S. T., HERLIHY K. J., GRAHAM J. P. et al. In vitro resistance study of AG-021541, a novel nonnucleoside inhibitor of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 675-683.
 21. MO H., LU L., PILOT-MATIAS T. et al. Mutations conferring resistance to a hepatitis C virus (HCV) RNA-dependent RNA polymerase inhibitor alone or in combination with an HCV serine protease inhibitor in vitro. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 4305-4314.
 22. LU L., DEKHTYAR T., MASSE S. et al. Identification and characterization of mutations conferring resistance to an HCV RNA-dependent RNA polymerase inhibitor in vitro. *Antiviral Res.* 2007; 76: 93-97.
 23. HOPKINS S., SCORNEAUX B., HUANG Z. et al. The genetic and biochemical basis for resistance to SCY-635. 59th Annual Meeting of the American Association for the Study of the Liver Diseases, San Francisco, CA 2008, USA: Abs. 1814.
 24. MA S., BOERNER J. E., TIONGYIP C. et al. NIM811, a cyclophilin inhibitor, exhibits potent in vitro activity against hepatitis C virus alone or in combination with alpha interferon. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50: 2976-2982.
 25. FERNANDES F., POOLE D. S., HOOVER S. et al. Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B. *Hepatology* 2007; 46: 1026-1033.
 26. KUNTZEN T., TIMM J., BERICAL A. et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naive patients. *Hepatology* 2008; 48: 1769-1778.
 27. LE POGAM S., SESHADRI A., KOSAKA A. et al. Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61: 1205-1216.
 28. HERLIHY KJ, GRAHAM JP, KUMPF R. et al. Development of intergenotypic chimeric replicons to determine the broad-spectrum antiviral activities of hepatitis C virus polymerase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 3523-3531.
 29. PAUWELS F., MOSTMANS W., QUIRYNEN L. M. et al. Binding-site identification and genotypic profiling of hepatitis C virus polymerase inhibitors. *J Virol.* 2007; 81: 6909-6919.
-