



Wyciszanie miR-122 – nowa terapia wirusowego zapalenia wątroby typu C?

Agata Tyczewska¹, Kamilla Bąkowska-Żywicka²

¹ Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Vienna Biocenter Campus, Austrian Academy of Sciences, Vienna, Austria

² Innsbruck Biocenter, Division of Genomics and RNomics, Medical University, Innsbruck, Austria

miR-122 silencing a novel therapy for HCV infections?

Summary

Hepatitis C (HCV) infection is one of major epidemiological, medical and social concerns in the modern world. In Poland, around 700 000 people have HCV, worldwide the number is as high as 170-180 million. Current treatment consists of pegylated interferon-alpha and ribavirin, but is limited by the resistance of the viral strains, adverse effects, and high costs. Since HCV infection is a major cause of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma, it is necessary to develop novel antiviral compounds with improved virological response and reduced toxicity. In this article, we describe the results of recent trials to fight the HCV infection using an antagonising miR-122 oligo-LNA probe in primates.

Key words:

HCV, micro RNA-122, LNA oligonucleotides.

1. Wprowadzenie

Zakażenie wirusem HCV jest jednym z najpoważniejszych problemów epidemiologicznych, medycznych i społecznych. Według danych Państwowego Zakładu Higieny i Instytutu Hematologii i Transfuzjologii szacuje się, że w Polsce wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) zakażonych jest około 700 tys. ludzi. Dane Światowej Organizacji Zdrowia wskazują, że na całym świecie liczba ta sięga 170-180 mln. Około 80% wszystkich zakażeń HCV prowadzi do przewlekłych zapaleń wątroby typu C. Szacuje się, że po około dwudziestu latach od zakażenia u co

Adres do korespondencji

Agata Tyczewska,
Gregor Mendel Institute
of Molecular Plant
Biology,
Dr. Bohr-Gasse 3,
1030 Vienna, Austria;
e-mail:
agata.tyczewska@
gmi.oeaw.ac.at

piątego spośród tych chorych pojawią się objawy marskości wątroby, a w jeszcze późniejszym czasie (po ok. 30. latach) dochodzić może do powstawania (1-5% wśród chronicznie chorych) raka wątroby. Wirusowe zapalenie wątroby typu C (WZW typu C) jest to groźna choroba zakaźna, którą nie jest łatwo wykryć, dlatego że często przebiega bezobjawowo, bądź też występujące objawy są interpretowane jako inne choroby. Stosowane obecnie leczenie zakażeń polegające na aplikowaniu interferonu w skojarzeniu z rybawiryną zapewnia zaledwie 50-60% skuteczność. Duże nadzieje wiąże się zatem z licznymi nowymi lekami znajdującymi się w różnych fazach badań klinicznych. Działanie nowych potencjalnych leków polegać może na hamowaniu wewnątrzkomórkowych mechanizmów odpowiedzialnych za replikację wirusa. Testuje się również związki specyficzne wobec białek HCV i tego typu wirusowo-specyficzna terapia (STAT-C, ang. *Specifically Targeted Antiviral Therapy for HCV*) nakierowana jest przede wszystkim na trzy typy enzymów HCV: inhibitory proteaz, a także nukleozydowe i nienukleozydowe inhibitory polimeraz. Niezwykle obiecujące są wyniki badań nad cząsteczką skierowaną przeciw ludzkiemu mikro RNA – miR-122, który ulega wysokiej ekspresji w wątrobie (główny niekodujący RNA hepatocytów). Dzięki obecności dwóch miejsc wiązania tego mikro RNA w genomie HCV dochodzi do zwiększenia poziomu replikacji wirusa. Wyniki testów z wykorzystaniem cząsteczki komplementarnej do miR-122, przeprowadzone na szympanсах, pozwalają mieć nadzieje na skuteczną i bezpieczną walkę z wirusem HCV (1).

2. Wirus HCV

Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV, ang. *Hepatitis C Virus*) należący do rodziny *Flaviviridae* został zidentyfikowany po raz pierwszy przez Choo i wsp. (2) w 1989 r. Wirus ma budowę sferyczną i średnicę 30-60 nm. Zbudowany jest z otoczki i rdzenia, w którego skład wchodzi materiał genetyczny oraz białko rdzeniowe (3). Genom HCV stanowi jednoniciowy, liniowy RNA o polaryzacji dodatniej (4). Część kodująca stanowi 95% genomu i koduje prekursorową poliproteinę złożoną z 3010-3037 aminokwasów. Poliproteina ta jest hydrolizowana z udziałem proteaz wirusa i gospodarza, tworząc w ten sposób dojrzałe białka strukturalne (białka C, E1 i E2), niestrukturalne (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) oraz białko p7. Białko C ma silne właściwości immunogenne, dlatego też jest wykorzystywane w testach serologicznych wykrywających przeciwciała przeciwko HCV w surowicy krwi. Niekodujący region obejmujący 340 nukleotydów od końca 5' genomu wirusa jest silnie konserwatywny (ponad 85% podobieństwa między różnymi podtypami wirusa HCV, (5)), co umożliwiło wykorzystanie reakcji PCR do wykrywania materiału genetycznego wirusa w próbkach pochodzących od pacjentów.

3. Zakażenie wirusem HCV

Ze względu na ogromne zdolności mutacyjne HCV ma wiele genotypów rozpowszechnionych na całej kuli ziemskiej, przy czym wyróżnia się 6 głównych, których występowanie jest zależne od rejonów geograficznych. Identyfikacja genotypu wirusa u chorego jest bardzo ważna, ponieważ niektóre jego odmiany poddają się leczeniu łatwiej niż inne. Genotypy 1, 2 i 3 występują na całym świecie, genotyp 4 i 5 w Afryce, natomiast genotyp 6 w Azji. W Polsce u około 70% osób zakażonych HCV stwierdza się genotyp 1b (6).

Do zakażenia wirusem HCV może dochodzić podczas bezpośredniego kontaktu z zakażoną krwią nosiciela. W Polsce 70% zakażeń HCV powstaje na skutek działań medycznych (7). Pracownicy służby zdrowia są grupą najbardziej narażoną na zakażenie HCV. Najczęściej chorują chirurdzy, stomatolodzy i pielęgniarki. Do zakażenia może dojść nie tylko w trakcie operacji, ale także podczas pobytu w oddziałach niezabiegowych, w czasie badań endoskopowych i innych zabiegów. Zakażenie HCV potwierdzono także u 40–50% chorych poddawanych dializie. Dużym ryzykiem zakażenia HCV obarczone były do końca lat 80. ubiegłego wieku przetaczanie krwi i preparatów krwiopochodnych (8). Zastosowanie w transfuzjologii badań na obecność przeciwciał anti-HCV od 1992 r., a następnie od 2000 r. oznaczeń obecności RNA HCV, zmniejszyło ryzyko zakażeń tą drogą do minimum. Zakażeniu sprzyja także dożylnie stosowanie narkotyków – w Polsce około 70% narkomanów jest zakażonych HCV. Do zakażenia wirusem typu C może niekiedy dojść podczas kontaktów seksualnych, ale nie jest to droga tak powszechna, jak początkowo sądzono (9). Kobiety zakażone HCV mogą infekować noworodki w czasie porodu. Takie przypadki mają miejsce u około 5-8% noworodków urodzonych przez matki zakażone HCV (10).

Najczęściej wykonywanym badaniem diagnostycznym na obecność wirusa HCV jest oznaczanie przeciwciał anti-HCV w surowicy krwi. Jednakże w 2-5% przypadków, pomimo że w surowicy nie wykrywa się przeciwciał anti-HCV, to otrzymuje się pozytywny wynik testu na obecność w surowicy materiału genetycznego wirusa (HCV RNA). Wykrywa się go testem reakcji odwrotnej transkrypcji i reakcji łańcuchowej polimeryzacji (RT-PCR).

4. Metody walki z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C

Celem terapii zakażeń wirusem HCV jest trwały zanik RNA wirusa w surowicy. Tak jak podaje Ogólnopolskie Stowarzyszenie Pomocy Chorym z HCV „Prometeusz” przewlekłe zapalenie wątroby typu C jest chorobą uleczalną. Podstawowym sposobem leczenia na całym świecie, a co za tym idzie także i w Polsce, jest terapia skojarzona polegająca na jednoczesnym podawaniu interferonu alfa modyfikowanego glikolem polietylenowym (PEG, ang. *Polyethylene Glycol*) oraz rybawiryny (terapia

PEG INF/RIB) (11). Szacuje się obecnie, że stosując najnowocześniejsze terapie skojarzone wyleczyć można około 50-60% chorych na WZW typu C, sukces terapii zależy w dużej mierze od genotypu posiadanego wirusa. Terapia jest jednak bardzo uciążliwa dla pacjentów. Trwa zazwyczaj rok i polega na zażywaniu tabletek rybawiryny, a także na aplikowaniu interferonu za pomocą iniekcji śródskórnych, lub domięśniowych. W zależności od typu zastosowanego interferonu, zastrzyki wykonuje się raz w tygodniu, trzy razy w tygodniu, lub nawet codziennie, przez cały okres trwania kuracji. Terapia jest trudnym doświadczeniem, a możliwych i występujących niezwykle często poważnych skutków ubocznych jest wiele. W związku z tym, nadal poszukuje się nowych terapii leczenia zakażeń wirusem HCV, które przy minimalnych skutkach ubocznych skutecznie eliminowałyby wirusa HCV z organizmu zakażonego pacjenta.

5. SPC3649

Na początku roku 2010 w czasopiśmie „Science” opublikowano artykuł, w którym opisano wpływ oligonukleotydu modyfikowanego SPC3649 o usztywnionej konformacji (LNA, ang. *Locked Nucleic Acids*) na infekcje wirusem HCV u przewlekle chorych szympanów (1). Testowany oligonukleotyd LNA był komplementarny do mikro RNA-122, który jest niekodującą cząsteczką RNA ulegającą wysokiej ekspresji w wątrobie (stanowi aż 70% wszystkich mikro RNA występujących w dojrzałej wątrobie) (12). Stwierdzono, że miR-122 uczestniczy w metabolizmie cholesterolu i lipidów (13), pełni funkcje supresora nowotworów (14), a także w replikacji wirusa HCV (12). miR-122 wiąże się do dwóch blisko siebie położonych sekwencji w regionie 5' niekodującym w wirusowym genomowym RNA (tzw. 5' NCR), powodując tym samym zwiększenie poziomu wirusowego RNA (12,15). Stwierdzono, że oddziaływanie to jest niezbędne do gromadzenia się wirusowego RNA w hodowlach komórek wątrobowych, a obie sekwencje docelowe miR-122 są wymagane do regulacji poziomu wirusa (12,15,16). Na podstawie wyników wcześniejszych badań z zastosowaniem oligonukleotydu SPC3649 stwierdzono, że po dożylnym podawaniu LNA-antimiR-122 małpom (ang. *African Green Monkey*) w cytoplazmie komórek wątrobowych dochodziło do tworzenia stabilnych heterodupleksów między LNA-antimiR-122 a miR-122. Zaobserwowano ponadto obniżenie poziomów zarówno miR-122 jak i cholesterolu (17).

Lanford i wsp. (1) przez 12 tygodni podawali dożylnie SPC3649 (w dwóch dawkach: 5 lub 1 mg/kg masy ciała) szympanom przewlekle zakażonym HCV. Analizy prowadzono jeszcze przez 17 tygodni po zaprzestaniu leczenia. Grupę referencyjną stanowiły szympanse, którym zamiast SPC3649 podawano roztwór soli fizjologicznej. U szympanów, którym aplikowano wysokie dawki oligonukleotydu badacze zaobserwowali znaczące obniżenie poziomu RNA wirusa HCV już po 3 tygodniach od rozpoczęcia leczenia. Natomiast maksymalne (2,6-krotne) obniżenie poziomu RNA HCV odnotowano w dwa tygodnie po zaprzestaniu terapii.

Co istotne, po analizie sekwencji wirusa wykonanych w 4 punktach czasowych badacze nie stwierdzili nagromadzenia mutacji adaptacyjnych w rejonach genomu rozpoznawanych przez miR-122. Brak odporności wirusa na SPC3649 nadaje temu potencjalnemu leкови zwalczającemu HCV ogromny potencjał aplikacyjny. W przeciwieństwie do opisanego oligonukleotydu SPC3649, w przypadku stosowanych do tej pory czynników antywirusowych u szympanśów zainfekowanych HCV (np. w przypadku nienukleozydowego inhibitora polimerazy) obserwowano odporność na zastosowany lek w 67% klonów HCV już po dwóch dniach terapii (18).

Autorzy badań przetestowali także wpływ terapii SPC3649 na transkryptom komórek wątroby. Stwierdzili, że poziomy cząsteczek mRNA, które w rejonach nie ulegających translacji posiadały sekwencje rozpoznawane przez miR-122 były znacząco obniżone zarówno u zwierząt z grupy wysokiej, jak i niskiej dawki leku (w porównaniu z mRNA nie zawierającymi miejsc rozpoznawanych przez miR-122). Stwierdzili ponadto obniżenie poziomu ekspresji genów regulowanych przez interferon (IRG, ang. *Interferon-Regulated Genes*, np. chemokiny IP-10) wyraźnie skorelowane z obniżeniem poziomu wirerii w obu grupach badanych zwierząt. Na podstawie tych danych stwierdzili, że endogenna ścieżka odpowiedzi interferonowej w wątrobie podlega szybkiej normalizacji w odpowiedzi na inhibicję namażania wirusowego RNA. Zaobserwowana normalizacja poziomów IRG u szympanśów, które nie odpowiadają na terapię skojarzoną interferon-rybawiryna pozwala mieć nadzieję na to, że testowana przez autorów terapia SPC3649 może zostać zastosowana do obniżenia poziomu wirusa, pozwalając endogennej ścieżce interferonowej na powtórne uruchomienie odpowiedzi na obecność wirusa.

U szympanśów poddawanych terapii SPC3649 stwierdzono ponadto obniżenie poziomu cholesterolu od 29 do 44%. Wyraźne obniżenie poziomu zaobserwowano także w przypadku lipoprotein o niskiej gęstości (LDL, ang. *Low Density Lipoprotein*, od 25-54%), a także apolipoproteiny B (od 23 do 42%).

Aby oszacować możliwe efekty uboczne wykonano m.in. kompleksowe badania krwi, markerów koagulacyjnych, moczu, profile cytokin-chemokin. Nie zaobserwowano żadnych niepokojących objawów ani odstępstw od prawidłowych wyników. Jedynie wzrost aktywności aminotransferazy alaninowej (ALAT, ang. *Alanine Aminotransferase*) u zwierząt z grupy wysokiej dawki leku, który odnotowano jeszcze przed podaniem pierwszej dawki, a który wrócił do normy w początkowej fazie badania. Co niezwykle istotne, podczas terapii aktywność ALAT wracała do normy, najprawdopodobniej na skutek obniżenia poziomu wirusa, ale ponownie wzrastała po zakończeniu terapii, kiedy poziom wirerii wracał do poziomu wyjściowego. Zaobserwowano ponadto polepszenie obrazu histologicznego wątroby u szympanśów z obu testowanych grup w odpowiedzi na obniżenie wirerii i normalizację ścieżki odpowiedzi interferonowej.

Wysoka stabilność, skuteczność w obniżaniu wirerii u przewlekle chorych szympanśów, a także dobry profil farmakokinetyczny zastosowanego oligonukleotydu SPC3649 pozwalają mieć nadzieję na szybkie znalezienie skutecznej terapii

WZW typu C. Co istotne, testowana na szympanсах terapia może być, jak się wydaje, skuteczna niezależnie od genotypu wirusa, na skutek wysokiej konserwatywności miejsca oddziaływania wirusa HCV z miR-122. Wyniki przedstawionych badań demonstrowają łatwość i bezpieczeństwo stosowania oligonukleotydu LNA jako leku, który antagonizuje funkcje specyficznego mikroRNA w istotnym klinicznie modelu choroby. Testy kliniczne na ludziach będą następnym krokiem niezbędnym do potwierdzenia skuteczności tego podejścia w leczeniu WZW typu C.

Należy być jednak ostrożnym. Na potencjalnie groźne skutki długotrwałego podawania cząsteczki obniżającej poziom miR-122 zwracają uwagę Gramantieri i wsp. w liście elektronicznym opublikowanym w kwietniu 2010 r. na stronach magazynu „Science” (19). Wskazują, że patologiczne obniżenie poziomu miR-122 jest powiązane z występowaniem raka wątroby (HCC, ang. *Hepatocellular Carcinoma*) u ludzi i gryzoni (20), metastazą i złymi prognozami w leczeniu (14,21). Ostatnie wyniki badań wiążą ponadto słabą odpowiedź na leczenie interferonem u pacjentów zakażonych wirusem HCV z niskim poziomem miR-122 (22).

6. Podsumowanie

Prace nad udoskonaleniem leczenia zakażeń HCV prowadzone są wielokierunkowo i obejmują różne związki skierowane nie tylko przeciw genomowemu RNA, ale także i białkom wirusowym. Część z nich jest jeszcze na poziomie eksperymentalnym, część jest bardziej zaawansowana, ale to czas pokaże, które z nich znajdą zastosowanie w praktyce klinicznej. Standardowa terapia peginterferonem i rybawiryną nie jest skuteczna u wszystkich pacjentów, dlatego tak istotne, jak się wydaje, są wyniki badań przeprowadzone przez Lanforda i wsp. Dają one nadzieję na skuteczną walkę z wirusem HCV tym pacjentom, którzy z różnych przyczyn nie mogą być poddani terapii standardowej. Stosując SPC3649 lub terapię kombinowaną być może skutecznie uda się wyeliminować wirus HCV z organizmu osoby zakażonej. W związku z antyrakowymi właściwościami miR-122 należy mieć jednak w pamięci, zwiększone ryzyko wystąpienia raka wątroby przy długotrwałym podawaniu jego antagonistów, a co za tym idzie, szczegółowo przeanalizować mechanizm obniżenia poziomu wirusa HCV.

Literatura

1. Lanford R. E., Hildebrandt-Eriksen E. S., Petri A., Persson R., Lindow M., Munk M. E., Kauppinen S., Orum H., (2010), *Science*, 327, 198-201.
2. Choo Q. L., Kuo G., Weiner A. J., (1989), *Science*, 244, 359-362.
3. Shimizu Y. K., Igarashi H., Kanematu T., Fujiwara K., Wong D. C., Purcell R. H., Yoshikura H., (1997), *J. Virol.*, 71(8), 5769-5773.

4. Kolykhalov A. A., Mihalik K., Feinstone S. M., Rice C. M., (2000), *J. Virol.*, 74(4), 2046-2051.
5. Okamoto H., Okada S., Sugiyama Y., Kurai K., Iizuka H., Machida A., Miyakawa Y., Mayumi M., (1991), *J. Gen. Virol.*, 72 (Pt 11), 2697-2704.
6. Halota W., Pawłowska M., Bulik F., Kios M., Koitan S., Wysocki M., (1998), *Hepatologia Polska*, 5(1), 3-7.
7. Jabłońska J., (2005), *Zakażenia*, 6, http://www.zakazenia.org.pl/index.php?okno=7&id=128&art_type=12
8. Sanchez-Tapias J. M., (1999), *J. Hepatol.*, 31, 107-112.
9. Westl R., (1999), *J. Hepatol.*, 31, 92-95.
10. Zanetti A. R., Tanzi E., Newell M. L., (1999), *J. Hepatol.*, 31, 96-100.
11. Stanowisko grupy ekspertów w dziedzinie chorób zakaźnych dotyczące leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C., (2003), *Medical Science Monitor*, 9, Supplement 6.
12. Jopling C. L., Yi M., Lancaster A. M., Lemon S. M., Sarnow P., (2005), *Science*, 309, 1577-1581.
13. Esau C., Davis S., Murray S. F., Yu X. X., Pandey S. K., Pear M., Watts L., Booten S. L., Graham M., McKay R., Subramaniam A., Propp S., Lollo B. A., Freier S., Bennett C. F., Bhanot S., Monia B.P., (2006), *Cell Metab.*, 3(2), 87-98.
14. Coulouarn C., Factor V. M., Andersen J. B., Durkin M. E., Thorgeirsson S. S., (2009), *Oncogene*, 28, 3526-3536.
15. Jopling C. L., Schutz S., Sarnow P., (2008), *Cell Host. Microbe*, 4, 77-85.
16. Randall G., Panis M., Cooper J. D., Tellinghuisen T. L., Sukhodolets K. E., Pfeffer S., Landthaler M., Landgraf P., Kan S., Lindenbach B. D., Chien M., Weir D. B., Russo J. J., Ju J., Brownstein M. J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T., Rice C. M., (2007), *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 104, 12-884-12889.
17. Elmén J., Lindow M., Schütz S., Lawrence M., Petri A., Obad S., Lindholm M., Hedtjärn M., Hansen H. F., Berger U., Gullans S., Kearney P., Sarnow P., Straarup E. M., Kauppinen S., (2008), *Nature*, 452, 896-899.
18. Chen C. M., He Y., Lu L., Lim H. B., Tripathi R. L., Middleton T., Hernandez L. E., Beno D. W., Long M. A., Kati W. M., Bosse T. D., Larson D. P., Wagner R., Lanford R. E., Kohlbrenner W. E., Kempf D. J., Pilot-Matias T. J., Molla A., (2007), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 4290-4296.
19. Gramantieri L., Chieco P., Fornari F., Bolondi L., (2010) <http://sciencemag.org/cgi/eletters/327/5962/198>
20. Kutay H., Bai S., Datta J., Motiwala T., Pogribny I., Frankel W., Jacob S. T., Ghoshal K., (2006), *J. Cell. Biochem.*, 99, 671-678.
21. Budhu A., Jia H. L., Forgues M., Liu C. G., Goldstein D., Lam A., Zanetti K. A., Ye Q. H., Qin L. X., Croce C. M., Tang Z. Y., Wang X. W., (2008), *Hepatology*, 47, 897-907.
22. Sarasin-Filipowicz M., Król J., Markiewicz I., Heim M. H., Filipowicz W., (2009), *Nat. Med.*, 15, 31-33.