

درمان عفونت هپاتیت HCV با آماج گرفتن MicroRNA

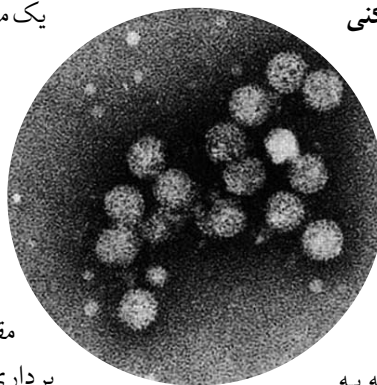
Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA

Harry L.A. Janssen, M.D., Ph.D., Hendrik W. Reesink, M.D., Ph.D., Eric J. Lawitz, M.D., Stefan Zeuzem, M.D., Maribel Rodriguez-Torres, M.D., Keyur Patel, M.D., Adriaan J. van der Meer, M.D., Amy K. Patick, Ph.D., Alice Chen, B.A., Yi Zhou, Ph.D., Robert Persson, Ph.D., Barney D. King, M.D., Sakari Kauppinen, Ph.D., Arthur A. Levin, Ph.D., and Michael R. Hodges, M.D.
N Engl J Med 2013; 368:1685-1694 May 2, 2013 DOI: 10.1056/NEJMoa1209026

به شکل گیری یک کمپلکس HCV-۱۲۲-miR می انجامد، از ژنوم HCV در برابر تجزیه نوکلئوتیک یا از واکنش های ایمنی ذاتی محافظت می کند. یک سوم جایگاه های پیوند miR-۱۲۲ در بخش غیر قابل رونویسی ۳' ژنوم HCV، هیچگونه پیوند کنشگری نشان نداد. جایگاه های پیوند miR-۱۲۲ برابر ژنوتیپ ها و زیر شاخه ای HCV پایش. ۱۲۲-miR می تواند به عنوان یک میزبان هدف برای درمان ویروس به شمار آید.

Miravirsin یک نوکلئیک اسید ۱۵ نوکلئوتیدی، یک الیگونوکلئوتید تغییر یافته متمم، با یک تمایل بالا و بسیار اختصاصی برای ناحیه ۵' از miR-۱۲۲ بالغ است. تصویر ۱ (جایگاه یسن عمل Miravirsin)

به کارگیری میراوسین (Miravirsin) در شامپانزه های آلوده به HCV باعث سرکوبی دیرپای و بادوام بدون اثری از مقاومت موتاسیون هادر جایگاه های اتصال از ناحیه غیر نسخه برداری از ژنوم HCV در ناحیه ۵' شده است. در این نوشته ها فعالیت و ایمنی Miravirsin با عفونت مزمن HCV گزارش کنیم.



نزدیک به صد و هفتاد میلیون انسان در سراسر جهان بطور مزمن با ویروس هپاتیت C آلوده شده اند. آلودگی مزمن HCV زمینه ساز بزرگ بیماری سیروز کبدی و کارسینوما هیپاتوسلولار است که ناچار به پیوند کبد در شمار فراوانی از کشورهای غربی شده است. ریشه کنی

HCV به کاهش شیوع بیماری های کبدی و مرگ و میر ناشی از آن می انجامد.

گرچه چندی است که کار مهارکننده های پروتاز برای تیمار آلودگی ژنوتیپ ۱ HCV مزمن به اثبات رسیده است، لیکن رژیم های درمانی تازه، وابسته به دریافت اینترفرون و ریباویرین Plyglated برای ۲۴ تا ۴۸ هفته ای باقیمانده است. بنابراین، درمان ضد HCV همراه با اثرات جانبی اساسی همراه

است. از آن جمله خطر میانکنش دارو با سیتوکروم P-۴۵۰، مقاومت دارویی، واکنش های ناشناخته تحلیل شده و کاهش تاثیرپذیری در مقابل ژنوتیپ ها و MicroRNA های کوچک و درونی هستند، noncoding RNA که بیان ژن ها را به وسیله اتصال به جایگاه های مکمل بر روی مناطق رونویسی نشده از ملکول mRNA هدایت می کنند به سرکوب رونویسی یا دانیلاسیون mRNA منجر خواهد شد.

۱۲۲-microRNA (miR-۱۲۲)، یک miRNA است که نمود فراوانی دارد و برای تکثیر و پایداری RNA ویروس HCV بسیار ضروری است.

Mir-۱۲۲ به ۲ جایگاه بسیار نزدیک به (S1, S2) در بخش محافظت شده غیر قابل نسخه برداری از ژنوم HCV متصل شده است. (۱۴-۱۲) این پدیده که

روش ها

بررسی جمعیت ها

بیماری هایی که تحت درمان قبلی برای عفونت ژنوتیپ ۱ HCV مزمن قرار نگرفته بودند، در هفت جایگاه بین المللی ثبت نام کردند. بیماران واجد شرایط ۶۵-۱۸ ساله بودند و می بایست دارای بیماری کبدی جبرانی با یک سطح RNA هپاتیت C بیش از ۷۵۰۰ IU/ml می داشتند. بیمارهایی با موارد دیگر بیماری کبدی مزمن، سیروز یا بیماری کبدی ناجبرانی (decompensated) مستثنی هستند. بیماران همچنین باید دارای آنتی بادی ها و آنتی ژن های سطحی HBV با ویروس نقص ایمنی انسانی می بودند. همچنین دارای آلانین آمینوترانسفرازهای کمتر از سه برابر از حد نرمال باشند.

Miravirsin در یک غلظت ۱۵۰ mg/ml، به صورت زیر پوستی در دوزهای ۵ هفته ای بیش از ۲۹ روز تجویز شده بود.

تزریقات دارونما محتوی سالیین نرمال (۹/۰٪) و برابر حجم miravirsin تجویز شده بود. پس از پایان دوره، بیماران برای معاینه مجدد تا هفته هشتم هر دو هفته یکبار، تا هفته چهاردهم و برای یک ویزیت نهایی در هفته هجدهم بازگشت داده شدند.

در نظر محققان بیماران اجازه داشتند تا درمان باریاویرین و اینترفرون در مطالعه ی هفته هفتم (برای بیماران دریافت کننده ۳ mg/kg miraviren) یا هفته دهم (برای دریافت کنندگان ۵ mg/kg یا ۷ mg/kg) شروع کنند.

کارایی، ایمنی و فارماکنتیک ها

برای هر بیمار، سطوح RNA پلاسما را با استفاده از real time HCV Abbott در یک سطح پایین تر از ۱۲ IU/ML اندازه گیری شد. نمونه های با سطوح HCVRNA زیر پایین ترین حد تعیین شده برای ردیابی سطوح غیر قابل ردیابی در نظر گرفته شد. ژنوتیپ HCV RNA به وسیله یک PCR که با استفاده از توالی نوکلئوتیدی ناحیه ۱ تغییر پذیر پروتئین ۲ از HCV توسعه یافته بود، ارزیابی شد.

ارزیابی موتاسیون های مقاوم در همه بیماران در ابتدا و در هفته پنجم در زمان اتصال ویروس در زمانی که سطح HCVRNA، ۱۰۰۰ IU/ml بود و زمانی که اینترفرون و ریبواویرین pegylated شروع نشده بودند انجام شد. آنالیز توالی و تقویت جایگاه های اتصال miR-۱۲۲ بین نواحی های غیر قابل نسخه برداری ۳' و ۵' بوسیله PCR نسخه برداری معکوس با استفاده از جایگاه خاص انجام شده بود. در این مطالعه همه ی آزمایشات فیزیکی و هماتولوژی و بیوشیمی سرم انجام شده است.

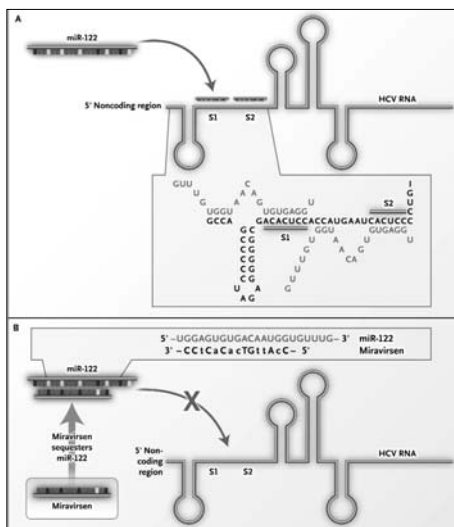
آنالیز آماری

آنالیزهای ابتدایی شامل همه ی بیمارانی شد که به صورت راندوم آزمایش شده بودند، و کسانی که دست کم یک روز از داروی مورد بررسی را دریافت کرده بودند، میزان سطوح HCVRNA کاهش یافته، با استفاده از اندازه گیری HCVRNA در سراسر دوره ی بررسی و یا تاراه اندازی درمان با اینترفرون و دیباویرین Pegylated مقایسه شد. میزان کاهش در HCVRNA در Miraviren به صورت مجزا از درمان با اینترفرون و ریبافیرین بررسی شد. همه ی سمیت های بالقوه در طول یا بعد از اجرا Miraviren مربوط به عوارض جانبی و ویژگی های ایمنی بروی همه ی اطلاعات جمع آوری شده، بدون در نظر گرفتن اینکه آیا بیماران ریبواویرین و اینترفرون Pegylated دریافت نموده اند یا نه، از روز آغاز تا هفته هجدهم، گزارش شده است. برای هر بیمار تغییر ماکزیمم در میزان HCVRNA نقطه شروع تعیین شد. همچنین ۲ نمونه t-test به منظور ارزیابی گروه های Miraviren با دارو نما مقایسه شد. میزان AP از ۰/۰۵ به عنوان شاهد آماری در نظر گرفته شد. ارتباط بین دریافت میزان دوز دارو و تغییر در HCVRNA با استفاده از یک تست خطی در ۴ گروه مورد بررسی قرار داده شد. همه ی آنالیزها با استفاده از نرم افزار SAS ورژن ۹/۲ صورت گرفت.

نتایج

بیماران

جمعیتی از ۳۶ بیمار با آلودگی ژنوتیپ HCV مزمن پذیرش شده بودند. با ۹



شکل ۱

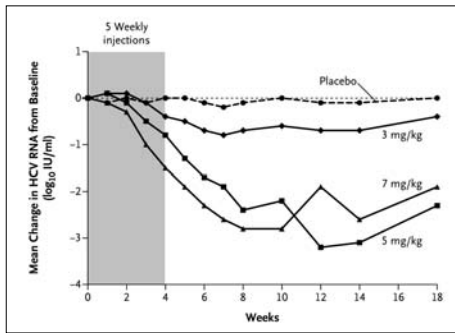
بیمار در هر گروه Miraviren (۳ mg/kg، ۵ mg/kg، ۷ mg/kg)، و در گروه دارونما (تصویر ۲) ویژگی های آغازی در هر چهار گروه مشابه بودند.

کارایی

کاهش در سطوح HCVRNA وابسته به دوز و از طرف دیگر با دوره ی اجرا Miraviren تقویت شد. (تصویر ۲ تغییر خط آغاز در سطوح HCVRNA). در گروه های Miraviren، میانگین حداکثر کاهش در سطوح (Log ۱۰ IU/ml) از HCVRNA از نقطه ی آغازی ۱.۲ (P=0.01) برای بیمارانی که ۳ mg/kg، P=0.003 برای کسانی که ۵ mg/kg و برای کسانی که ۷ mg/kg دریافت کرده بودند نشان داده شد. یک کاهش در سطح HCVRNA حداقل ۱۰ Log IU/ml در یک بیمار در گروه دریافت کننده ۳ mg/kg Miraviren و در ۶ بیمار (۶۷٪) در گروه دریافت کننده ۵ mg یا ۷ mg از Miraviren اتفاق افتاد.

تصویر ۳: ارتباط بین ویژگی های فارماکنتیک را نشان داده است. تصویر ۳ سطوح HCVRNA برای بیماران مشخص. بنابراین گروه مورد مطالعه، کاهش هایی در سطوح HCVRNA در بیماران در طول اجرا Miraviren و بعد از راه اندازی دیباویرین و اینترفرون Pegylated نشان داده شده است.

در ۵ بیمار، با استفاده از Miraviren به تنهایی



شکل ۲)◀

منجر به HCVRNA غیر قابل ردیابی شد. (از این بیماران، یکی که ۵mg/kg، Miraversen را دریافت کرده بود در هفته ۱۴، HCVRNA غیر قابل شناسایی داشت اما متعاقباً میزان HCVRNA برابر ۳۱۸۰ IU/ml در هفته ۱۸ داشت. ۴ بیمار دیگر، آنهایی که ۷mg/kg، Miraversen دریافت کرده بودند یک HCVRNA غیر قابل ردیابی در هفته پنجم در یک بیمار، هفته ششم (در یک بیمار) و در هفته چهاردهم (در ۲ بیمار) داشتند. در ۲ بیمار با HCVRNA غیر قابل شناسایی در هفته پنجم و ششم سطوح HCVRNA بالاتر از ۱۰ هفته غیر قابل شناسایی باقی ماند.

سپس در یک بیمار سطح HCVRNA قابل شناسایی از ۶۲۳۰ IU/ml در هفته دوازدهم را داشت، و سایرین در مان باربایورین و اینترفرون در هفته دهم را شروع کرده و در پایان مطالعه بدون HCVRNA قابل شناسایی باقی ماندند. یکی از دو بیمار با سطح RNAHCV غیر قابل شناسایی در سراسر مطالعه باقی ماند و دیگری یک سطح پایین از RNAHCV، ۸۰ IU/ml، در هفته هجدهم را داشت. برگشت ویروسی که به صورت یک افزایش متجاوز از ۱۰ Log در سطح RNAHCV تعریف شده، بعد از قطع دارو در بیمارانی که ۳ mg/kg در هفته هجدهم دریافت کرده بودند و همین طور در ۵ بیمار که ۵ mg از دارو را دریافت کرده بودند (۳ بیمار در هفته دهم و یکی در هفته چهاردهم و یکی در هفته هجدهم و در بیمارانی با دریافتی ۷ mg در هفته های دوازده و چهارده و هجده) اتفاق افتاد، هیچگونه موثاسیون مقاومتی در جایگاه های ۱۲۲-Mir از ژنوم HCV در هیچ یک از ۳۶ بیمار مشاهده نشد. همچنین هیچگونه ارتباط آشکاری بین کاهش میزان RNAHCV و فاکتور هایی که قبلاً با کاهش هایی از این قبیل همراه شده بودند شامل ژنوتیپ (IP-۱۰) ۱۱۲۸B، سطوح پروتئین ۱۰ القاء کننده اینترفرون، حضور ژنوتیپ های a1 یا a1 یا سایر ویژگی های ابتدایی مشاهده نشد.

ایمنی

از ۱۱۲ اتفاق ناموافق برای بیمارانی که Miraversen را دریافت کرده بودند، ۹۳ تا از آنها درجه یک، ۱۷ تا از آنها درجه دو و دو تا از آنها درجه سه بودند. از ۳۱ اتفاق ناموافق که برای بیماران با دارو نامثبت شده بود، ۲۳ تا درجه یک، ۷ تا از آنها درجه دو و یک عدد از آنها درجه سه بودند.

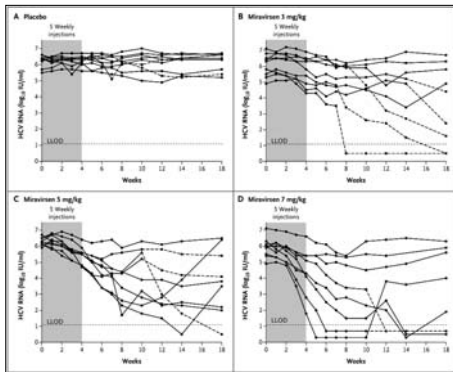
در طول ۱۸ هفته دوره مطالعه، ۵ بیمار در گروه Miraversen، ۲ دریافت کننده ۳ mg و ۱ دریافت کننده ۵ mg و ۲ دریافت کننده ۷ mg و ۲ بیمار در گروه دارو ناما دارای اتفاقات و عوارض ناموافق با شدت ملایم داشتند. این عوارض شامل سردرد، گوش درد بیرونی، جراحی استخوان لگنی بعد از افتادن، سنکوپ و نشانه های شبه آنفولانزا و سردرد و دمل در بیماران تیمار شده با دارو ناما بودند.

شدیدترین عارضه در طول بررسی از دست دادن هوشیاری در یک بیمار در هفته نهم بعد از آخرین دوز ۷ mg از Miraversen که بعد از افتادن و داشتن جراحی در لگن خاصره اتفاق افتاد. این حادثه شدید به عنوان یک حادثه

ناموافق انتخاب شده بود و بیمار برای یک شب در بیمارستان برای مشاهدات بیشتر بستری شد. واکنش های جایگاه تزریق شامل یک التهاب پوستی، خارش، پینه خوردگی پایا و احساس سوختگی از عوارض دارو های الیگونیوکلئوتیدی هستند که در دو بیمار در طول بررسی ما گزارش شد، هر دو این گروه ها دریافت کننده ۷ mg بودند. جایگاه های تزریق با یک تیمار معمولی بهبود یافتند و همچنین هیچگونه واکنش آلرژیک و هیچ گونه مرگی گزارش نشد. تعدادی از بیماران دریافت کننده Miraversen ویژگی های ایمنوبیوشیمی نشان دادند که یک کاهش در میزان آلانین آمینو ترانسفراز، آسپاراتات آمینو ترانسفراز و GGT بوده همچنین در هر سه گروه مستقل از دوز دارو، افزایش در میزان کراتینین سرم و آلکالن فسفاتاز مشاهده شد. هیچکدام از این افزایش ها از ضوابط مربوط به Terminology Criteria (Common toxicity) برای عوارض ناگوار تخطی نکرد همچنین هیچ تغییری در میزان هموگلوبین یا مقدار سلول های سفید در طول دریافت Miraversen مشاهده نشد. همچنین هیچ تغییری در زمان پروترومبین یا زمان خاص فعالیت پروترومبین مشاهده نشد. بنابراین انتظار یک کاهش در سطح کلسترول سرم دیده شد، اما هیچ تغییری در نسبت LDL کلسترول به HDL مشاهده نشد.

بحث

در این بررسی، تزریق های پنج هفته ای از Miraversen یک کاهش طولانی مدت و وابسته به دوز RNAHCV را در بیماران آلوده با ژنوتیپ نوع ۱



شکل ۳

مدت ۴ هفته برای یک واکنش ویروسی در بیماران است. البته هنوز مشخص نیست که آیا رژیم های طولانی از Miravarsen می تواند یک واکنش اساسی ویروسی را موجب شود. اخیراً مطالعاتی بر روی رژیم های ۱۲ هفته ای در حال انجام است. یک واکنش ویروسی اساسی در چندین بیمار تیمار شده با یک رژیم اینترفرون به تنهایی که با عوامل فعال کننده آنتی ویروس ترکیب شده اند، انجام شده بود.

همچنین ممکن است که Miravarsen بتواند به عنوان یک عامل Host-targety به منظور افزایش تاثیر آنتی ویروس از بعضی رژیم های ترکیبی با استفاده از فراهم آوردن یک حمل کننده ی مدام استفاده شود. به دلیل کاربرد گسترده از درمان با antisense HCV، استراتژی که اینجاست تصیف شد ممکن است مربوط به بیمارانی با دیگر عفونت های HCV مزمن باشد. در زمینه هماتولوژی مهار miR-122 با یک بهبود STEATOSIS در یک مدل موش با رژیم چاقی پیشنهاد کننده نقش آنتاگونیسم miR-122 در تیمار بیماری کبد الکلی چرب است. در زمینه دیگر، درمان های خاموش از miRNA ها در مطالعات پیش تکنیکی از سرطان و کاردیواسکولار و بی نظمی های اتوایمیون نتایجی را آشکار کرده است که گواه تحقیقات کلینیکی است.

به طور کل، دریافت Miravarsen در ۵ هفته با تزریق های زیرپوستی در بیش از ۲۹ روز در بیماران با عفونت HCV مزمن منجر به واکنش های ویروسی مهمی شده است. با این پژوهش تاثیرات درمانی miRNA-noncoding میزان نشان داده شد ▶

HCV مزمن را ارائه داد. در بعضی بیماران میزان RNAHCV غیر قابل شناسایی بدست آمد. هیچ شاهدهی از مقاومت ویروسی مشاهده نشد. بیماران دریافت کننده Miravarsin باعث کاهش در میزان آمینوترانسفرازها شدند که این در تضاد با افزایش میزان گزارش شده در بیمارانی است که دریافت کننده ترکیبات آنتی سنس phosphorothioate در مطالعات قبلی بودند. یک کاهش تدریجی و طولانی غیر وابسته به دوز در سطح کلسترول در توافق با تاثیرات Mir-122 مشاهده شده بود.

تلفیق سازی mRNA های هدف miR-122 تنظیم شده است و نسبتاً کوچک بوده و می توانست ویژگی های جانبی خوبی را در آن توضیح دهد. در مقایسه، تاثیرات توالی miR-122 تغییرات بسیار چشمگیری را در سطوح RNAHCV نتیجه داد. بیان چندین ژن میزبان miR-122 دلالت بر توسعه کارسینوما هپاتوسلولار دارد که پیشنهاد کننده تاثیرات سرکوب گری تو موربوسه miR-122 است. اگرچه یک ارتباط مستقیم بین فقدان تقویت عملکرد miR-122 و بقایای کارسینوما ی هپاتوسلولار تعیین شده است. تنظیم پایین miR-122 در کارسینوما هپتوسلولار که با سطح پایین miR-122 مرتبط است یک پیش بینی برای ابتلا به بیماری است. با این وجود Vomlolt گزارش کرده است که تنظیم بالا از miR-122 در کارسینوما هپاتوسلولار HCV القا شده نشان داد که miR-122 در کارسینوما هپاتوسلولار کارسینوما هپاتوسلولار HCV-Driven می تواند متفاوت از کارسینوما هپاتوسلولار بدون HCV باشد.

در این بررسی هیچ ارتباط روشنی بین پاسخ ویروسی بین Miravarsen و سطوح آغازی IP-10 ژنوتیپ 1A یا سایر میزبانان و فاکتورهای ارزیابی ویروسی نیافتیم. نتایج ما مربوط به در نظر گرفتن Miravarsen به عنوان یک درمان بالقوه برای آلودگی HCV است. اول اینکه، جایگاه های اتصال miR-122، miR HCV خیلی محافظت شده هستند که اجازه استفاده از Miravarsen در همه ی ژنوتیپ های HCV را می دهد و دوم اینکه، ما هیچگونه شاهدهی از موتاسیون در انسان های تیمار شده با Miravarsen نداشتیم که نشان دهنده ی یک انتقال یا مقاومت ژنتیکی بالا است و سوم اینکه ویژگی های فارماکوننتیک Miravarsen با یک افزایش تدریجی در سطح انباشتگی هپاتیت و یک نیمه عمر طولانی در پاکسازی بافتی همراه است.

برخلاف مهار کننده های پروتئاز ثابت شده اخیر، Miravarsen یک سوبسترا برای سیتوکروم P-50 نیست و بنابراین انتظار نمی رود که واکنش های دارو-داروی مهمی داشته باشد.

بیمار دریافت کننده ی کوتاه مدت Miravarsen سطوح غیر قابل ردیابی HCV RNA را داشتند که نشان دهنده ی بالقوه ی مونوتراپی Miravarsen برای عفونت مزمن HCV است.

با این وجود، چهار بیمار از این پنج بیمار دارای یک واکنش ویروسی در انتهای بررسی بودند که نشان دهنده ی ناکافی بودن میزان Miravarsen در