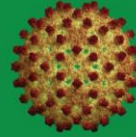


HBV İnfeksiyonunda “cccDNA Oluşumu” ve Tedaviyle Regülasyonu

Prof. Dr. Necla TÜLEK

Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi

 **UVHS** VII. ULUSAL VİRAL
HEPATİT SIMPOZYUMU
22-24 MAYIS 2015 / SHERATON ADANA HOTEL, ADANA

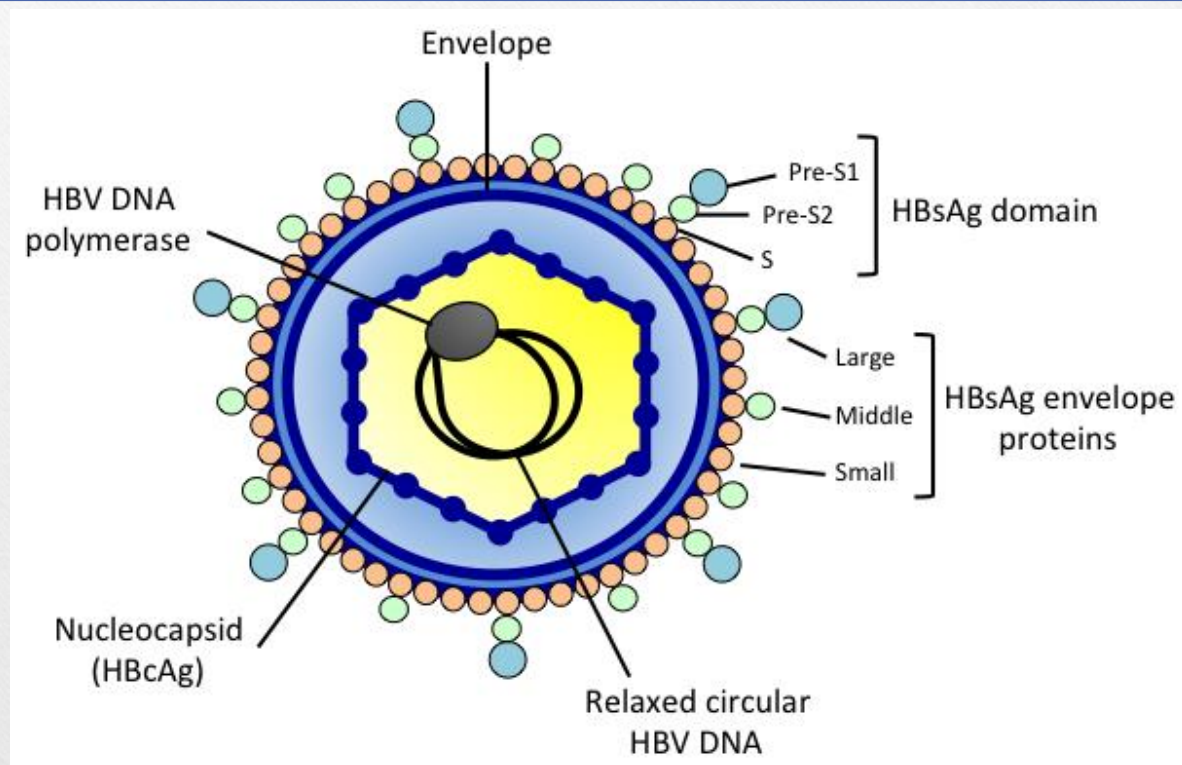


Sunum İçerięi

- Hepatit B virüsünün yapısı ve yaşam döngüsü
- cccDNA oluşumu ve düzenlenmesi
- cccDNA'nın klinik önemi
- Mevcut tedavilerin cccDNA'ya etkisi
- cccDNA regülasyonu için yeni stratejiler

-
- **Hepatit B infeksiyonunda kür sağlanabilir mi?**

Hepatit B Virüsü



Hepatitis B Virus genome organization

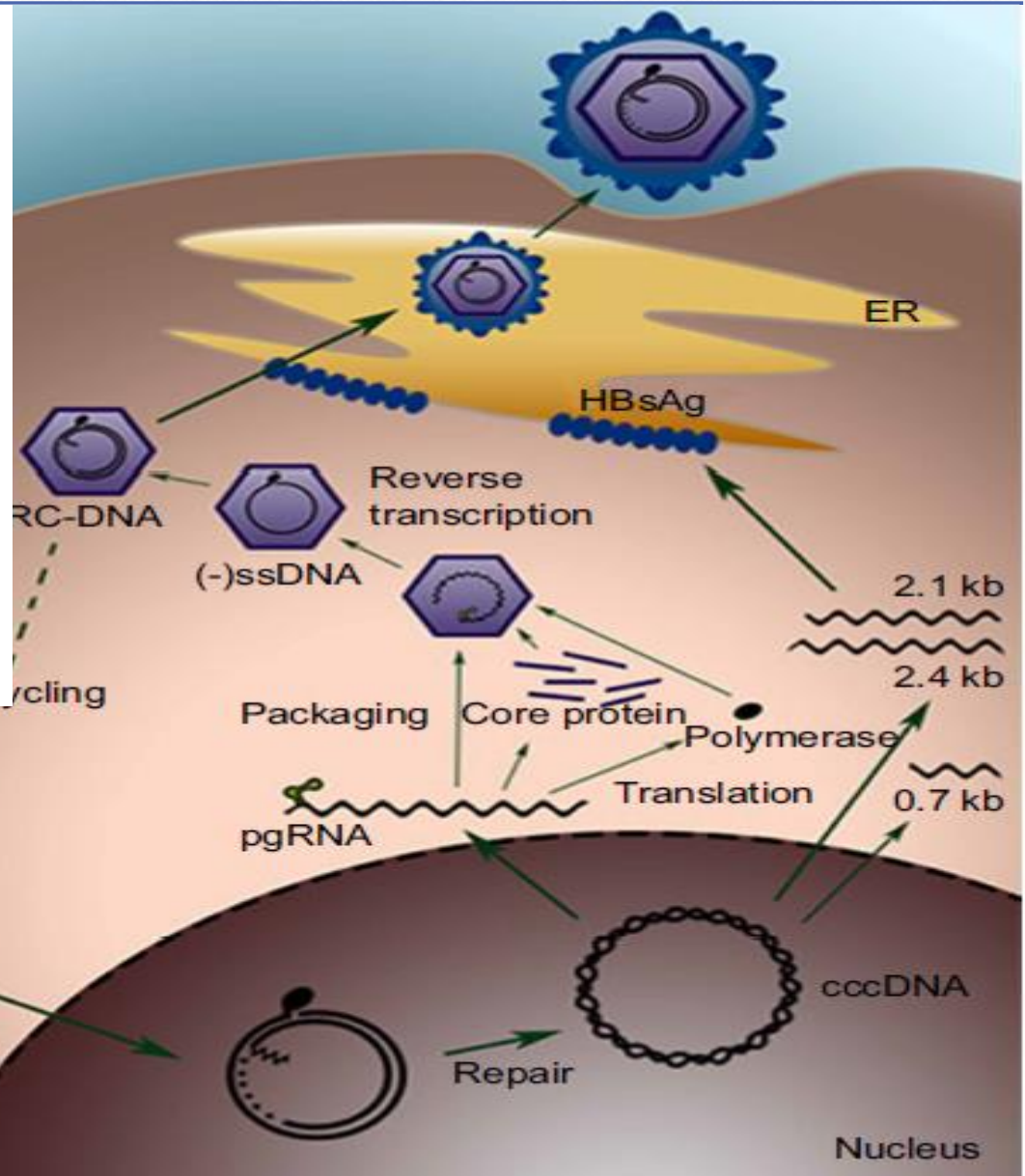
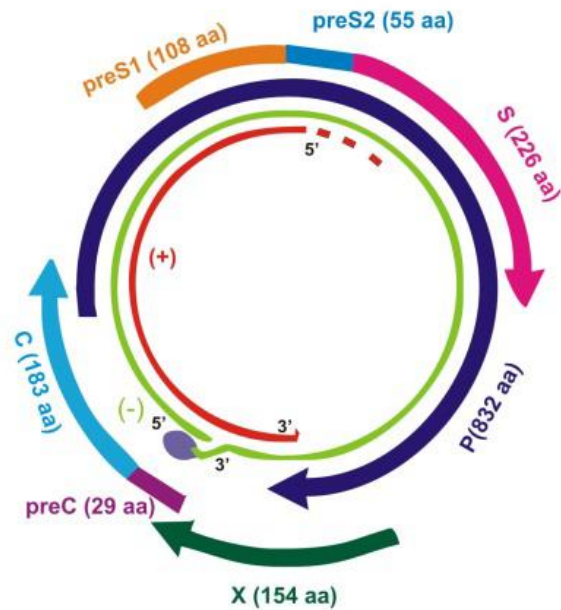
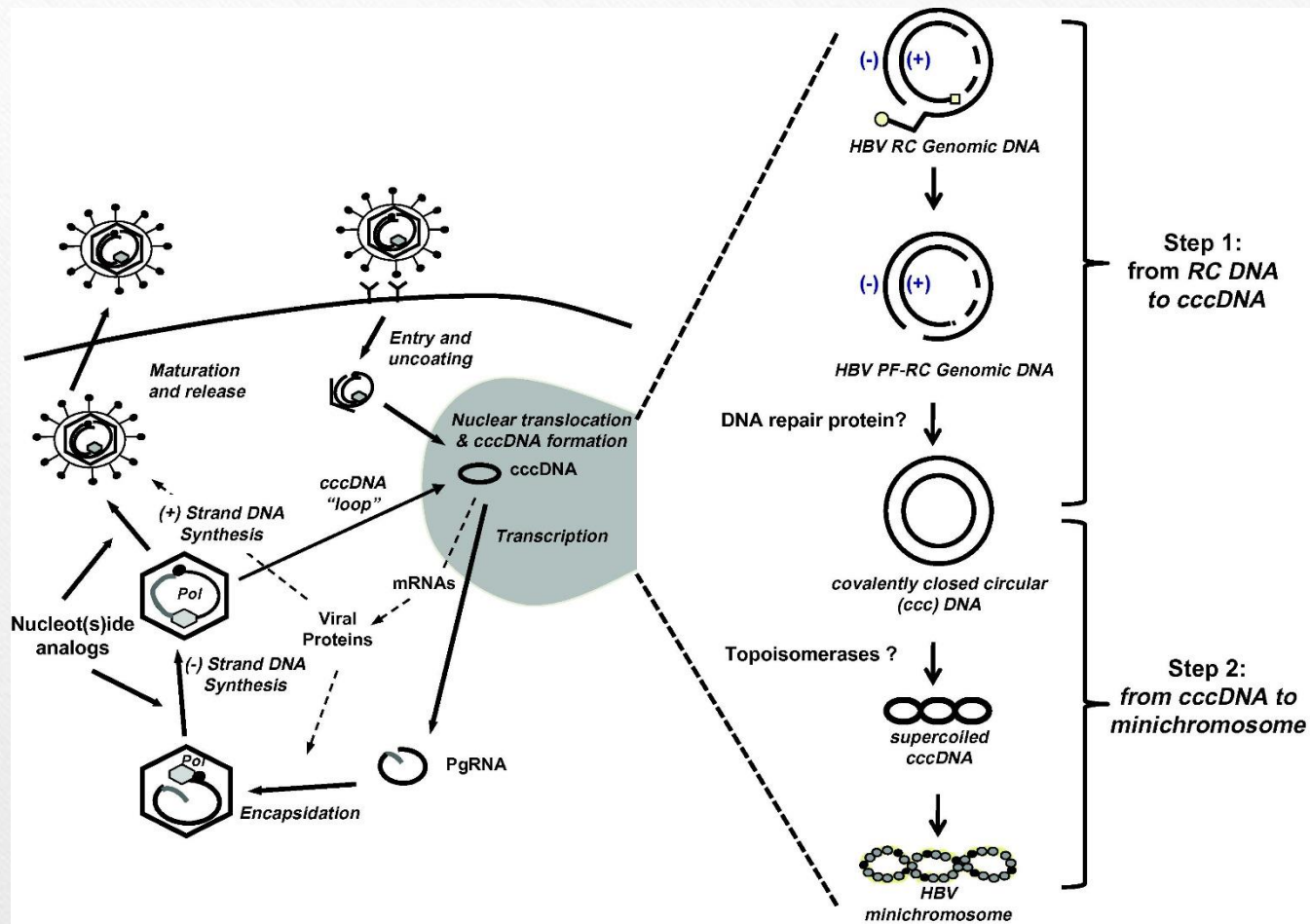
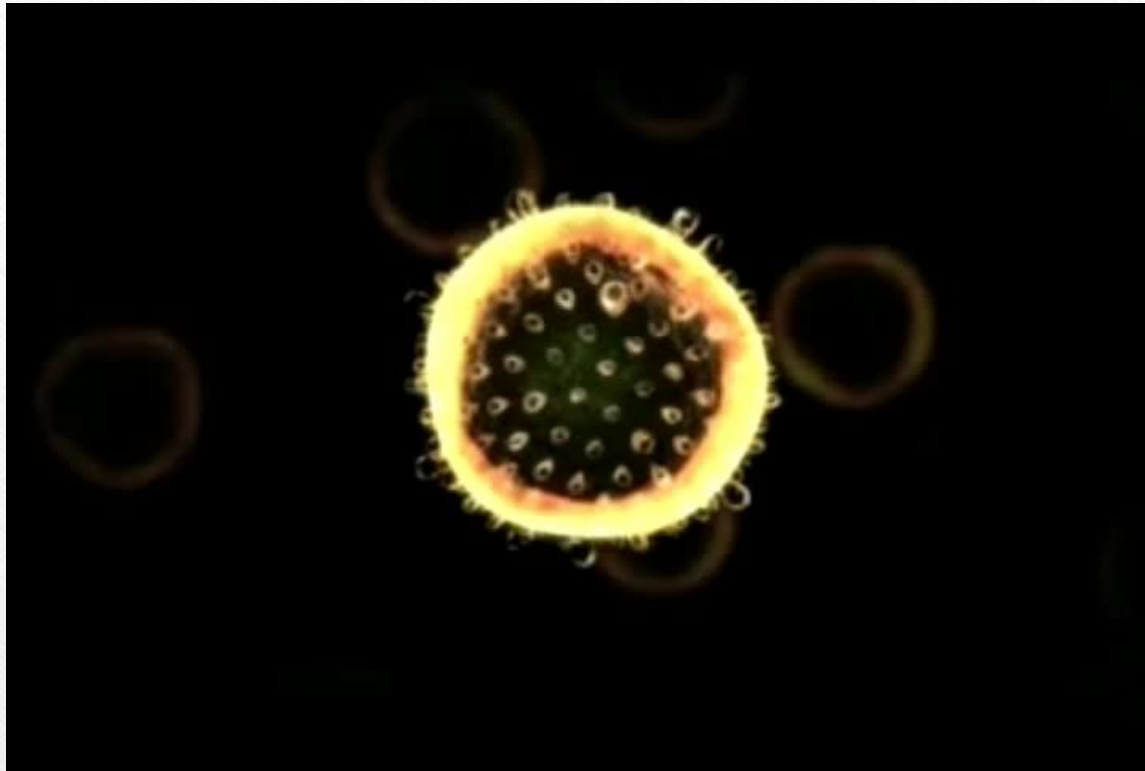
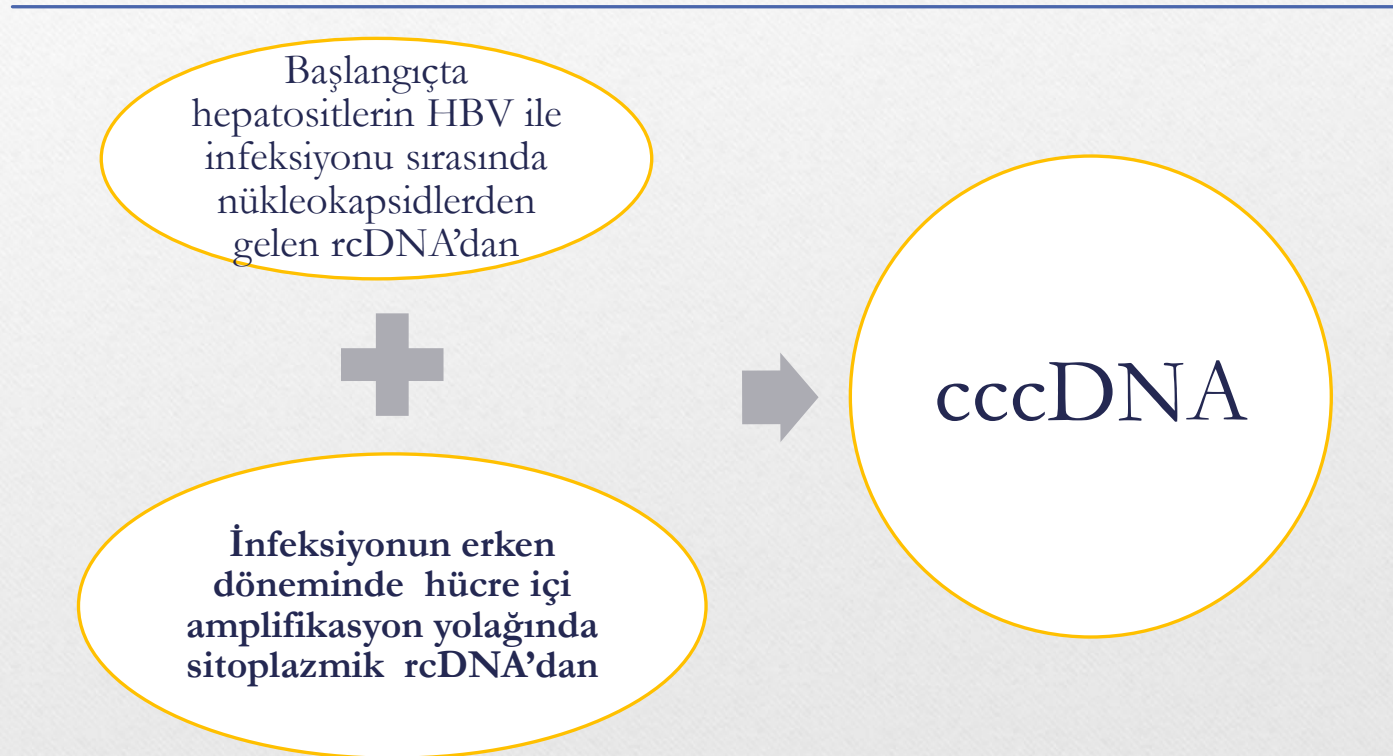


Fig. 1





cccDNA Havuzu



cccDNA

- cccDNA hepatosit nükleusunda stabil bir mini kromozom (epizom) halinde bulunur.
- Histon, histon olmayan viral ve hücresel proteinler tarafından organize edilir.
 - Epigenetik regülasyon
- Her bir hepatositte 5- 50 kopya cccDNA havuzu var.
Bu havuzun büyüklüğü viral replikasyon hızını ve serumdaki HBV DNA seviyesini belirler.

HBV İnfeksiyonlarında cccDNA Varlığı

- HBeAg(+) kişilerde 25-50 kopya/hücre
- HBeAg(-) kişilerde daha az
- **Bir kez HBV, Yaşam Boyu İnfekte?**
- HBsAg negatifleşen, serokonversiyon gelişen kişilerde
- Akut hepatit B infeksiyonlarından sonra
- *Occult* HBV infeksiyonlarında
 - **İmmunsupresif tedavi sonrası alevlenme**
 - **Kan transfüzyonu , ortopedik karaciğer transplantasyonu ile HBV geçişi**

Brechot C, et al Hepatology 2001; 34: 194–203.

Chu CM, Liaw YF. Antivir Ther 2010; 15: 133–143.

Raimondo G, et al. Pathol Biol (Paris) 2010; 58: 254–257

Li W, et al. 2014 PLoS ONE 9(2): e89046HC

Yang and JH Kao. 2014 Emerg Microbes Infection, 3, e64.

cccDNA Yarılanma Ömrü

cccDNA ölçümü karaciğer biyopsisi yapılarak, PCR ile
Doku kültürleri yeterli bilgi vermiyor

- Koşullara göre değişken
- Ördek HBV'de 33-50 gün
- Woodchuck HBV'de 35-57 gün

Zhu Y, et al. J Virol 2001; 75: 311–322.
Addison WR, et al. J Virol 2002; 76: 6356–6363

Hepatit B İnfeksiyonunda Kür

- Tüm hücre dışı virionların eliminasyonu
- +
- Her bir infekte hücrenin kürü ya da ölümü

Serumda HBV DNA'nın olmaması viral baskılanma anlamına gelmez !!!.

Kronik Hepatit B'de Kür Nasıl Olabilir?

Viral
replikasyonun
durdurulması

HBV gen
ekspresyonunun
baskılanması

İmmün gözetim

Fonksiyonel Kür

- Viral replikasyonun baskılanması
- Konak immün yanıtının HBV infeksiyonunu kontrol edecek kadar restorasyonu

Kronik Hepatit B Tedavisinde Kullanılan Ajanlar

İmmünomodulator ajanlar

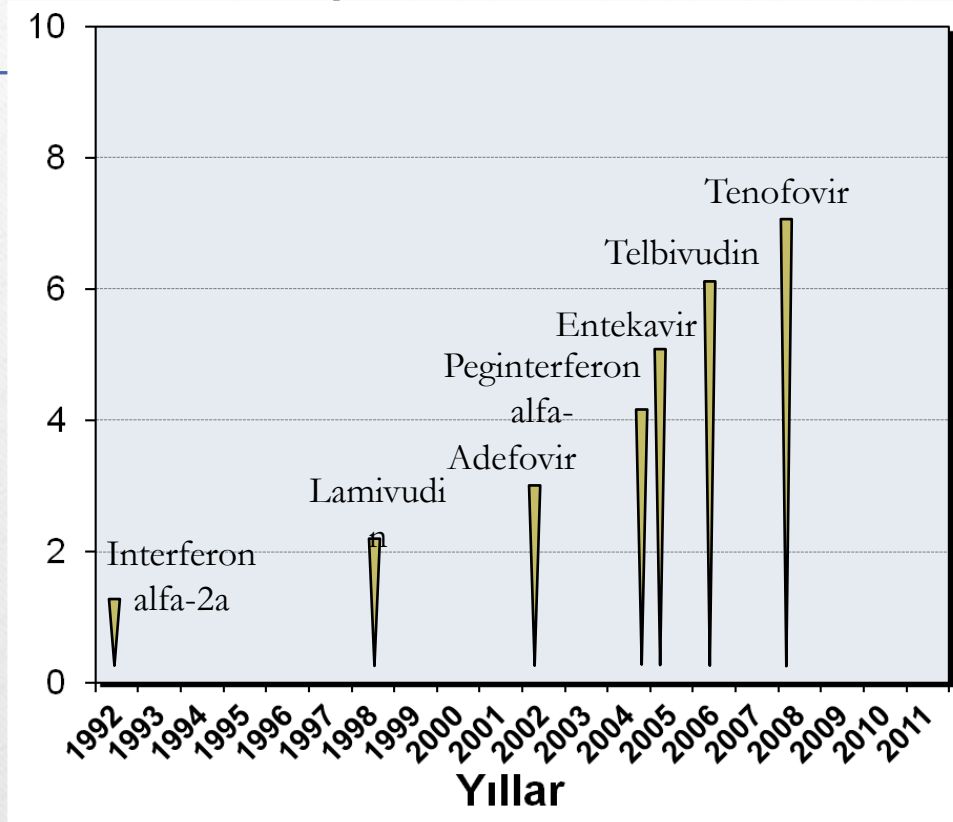
- Standart interferon- α
- Pegile interferon- α
- Thymosin $\alpha 1$

Nükleozid analogları

- Lamivudin
- Telbivudin
- Entekavir
- Clevudine
- Emtricitabine

Nükleotid analogları

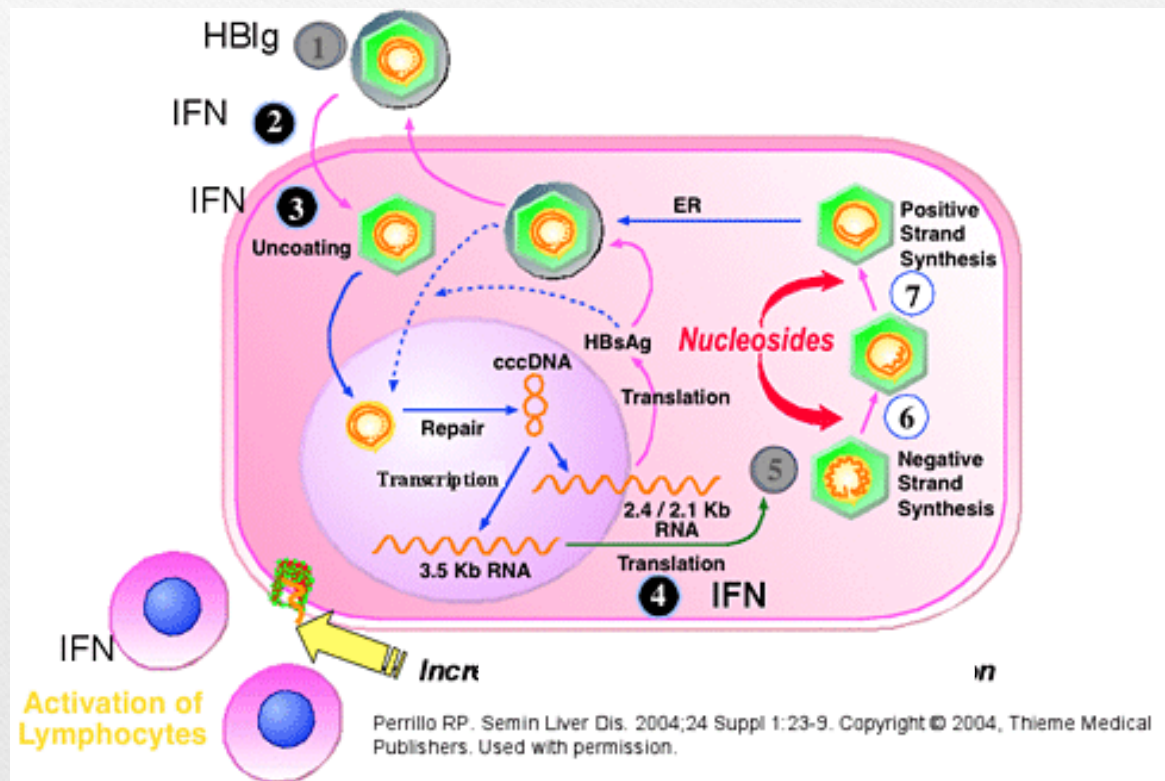
- Adefovir dipivoksil
- Tenofovir disoproksil fumarat



Kronik Hepatit B İnfeksiyonunda Tedavi Hedefleri

- Viral Replikasyonun baskılanması
 - Serum HBV DNA' nın tespit edilemez düzeye inmesi
 - HBeAg  anti-HBe serokonversiyonu
 - HBsAg  anti-HBs serokonversiyonu
- Karaciğer hastalığının remisyonu
 - Serum ALT düzeylerinin normalleşmesi
 - Karaciğerde nekroinflamasyonun azalması
- Klinik düzelme
 - Siroz, karaciğer yetmezliği ve hepatoselüler Ca. gelişmesi riskinde azalma
 - Yaşam süresinin artması

Kronik Hepatit B Tedavisindeki Ajanların Etki Mekanizmaları



HBeAg-pozitif Kronik Hepatit B 'de Tedavi Sonuçları (1 Yıllık)

Table 2. Results of main studies for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B at 6 months following 12 months (48 or 52 weeks) of pegylated interferon alpha (PEG-IFN) and at 12 months (48 or 52 weeks) of nucleos(t)ide analogue therapy.

	PEG-IFN		Nucleoside analogues			Nucleotide analogues	
	PEG-IFN-2a	PEG-IFN-2b	Lamivudine	Telbivudine	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
Dose*	180 µg	100 µg	100 mg	600 mg	0.5 mg	10 mg	245 mg
[Ref.]	[63]	[64]	[63, 65-68]	[68]	[67]	[69, 70]	[70]
Anti-HBe seroconversion (%)	32	29	16-18	22	21	12-18	21
HBV DNA <60-80 IU/ml (%)	14	7	36-44	60	67	13-21	76
ALT normalisation# (%)	41	32	41-72	77	68	48-54	68
HBsAg loss (%)	3	7	0-1	0.5	2	0	3

*PEG-IFN were given as percutaneous injections once weekly and nucleos(t)ide analogues as oral tablets once daily.

#The definition of ALT normalisation varied among different trials (i.e. decrease of ALT to ≤ 1.25 -times the upper limit of normal (ULN) in the entecavir or ≤ 1.3 -times the ULN in the telbivudine trial).

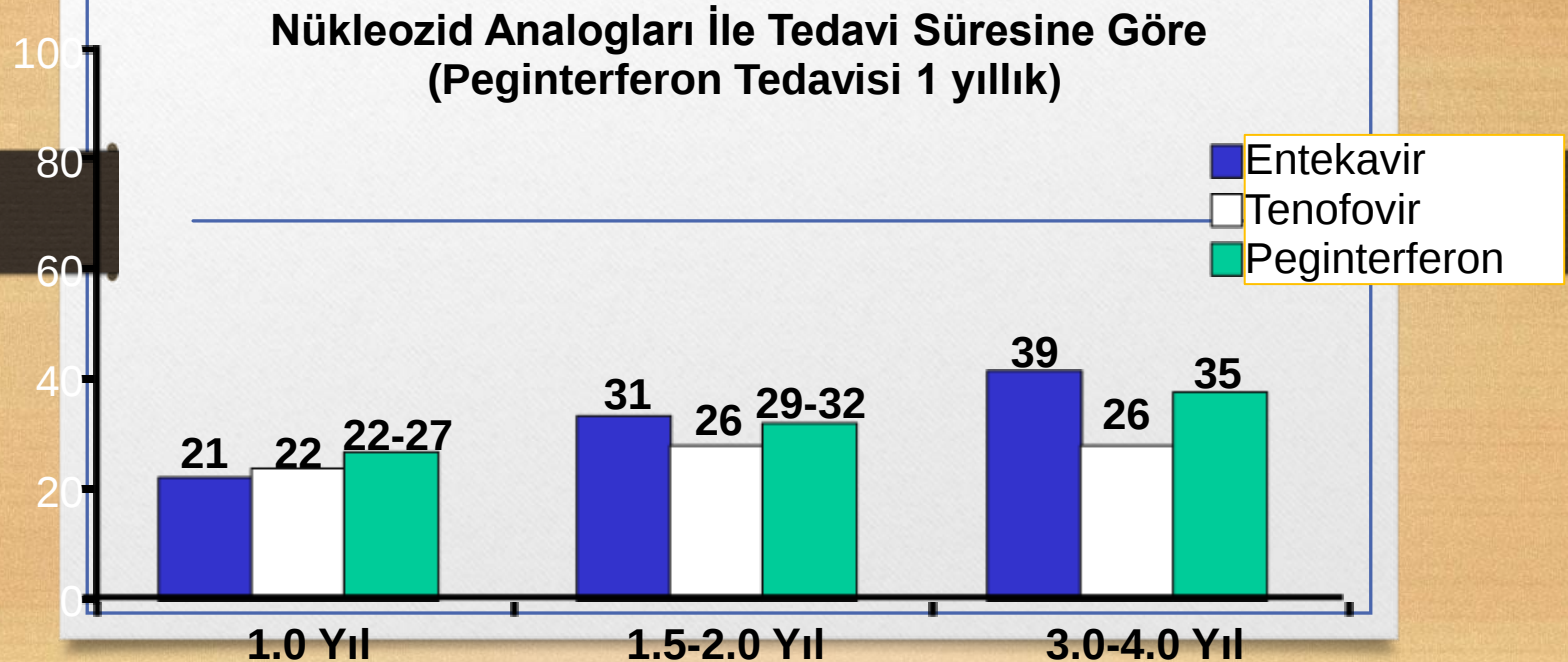
HBeAg-negatif Kronik Hepatit B 'de Tedavi Sonuçları (1 Yıllık)

Table 3. Results of main studies for the treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B at 6 months following 12 months (48 weeks) of pegylated interferon alpha (PEG-IFN) and at 12 months (48 or 52 weeks) of nucleos(t)ide analogue therapy.

	PEG-IFN	Nucleoside analogues			Nucleotide analogues	
	PEG-IFN-2a	Lamivudine	Telbivudine	Entecavir	Adefovir	Tenofovir
Dose*	180 µg	100 mg	600 mg	0.5 mg	10 mg	245 mg
[Ref.]	[91]	[68, 90-92]	[68]	[92]	[70, 93]	[70]
HBV DNA <60-80 IU/ml (%)	19	72-73	88	90	51-63	93
ALT normalisation# (%)	59	71-79	74	78	72-77	76
HBsAg loss (%)	4	0	0	0	0	0

HBeAg Serokonversiyon Hızı

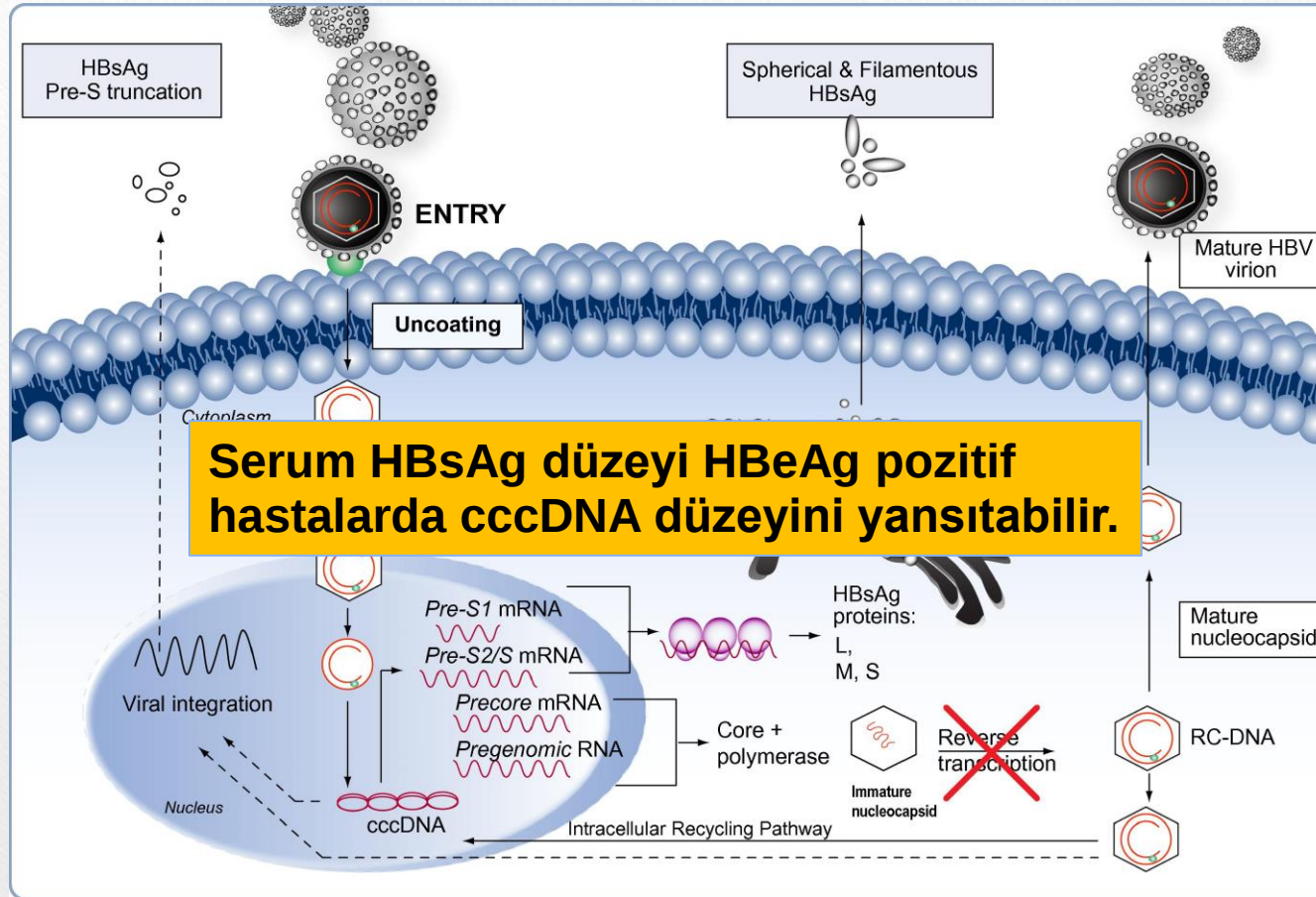
HBeAg Serokonversion (%)



*With sustained undetectable HBV DNA.

Chang TT, et al. J Viral Hepat. 2009;16:784-789. Chang TT, et al. AASLD 2006. Abstract 109. Lau GK, et al. N Engl J Med. 2005;352:2682-2695. Marcellin P, et al. N Engl J Med. 2008;359:2442-2455. Buster EH, et al. Gastroenterology. 2008;135:459-467. Heathcote J, et al. AASLD 2008. Abstract 158. Heathcote J, et al. AASLD 2009. Abstract 483. Janssen HL, et al. Lancet. 2005;365:123-129. CCO Hepatitis

HBV Replikasyon Döngüsünde HBsAg Üretimi



Reduction of Hepatitis B Surface Antigen and Covalently Closed Circular DNA by Nucleos(t)ide Analogues of Different Potency

DANNY KA-HO WONG,^{*,‡} WAI-KAY SETO,^{*} JAMES FUNG,^{*,‡} PHILIP IP,[§] FUNG-YU HUANG,^{*} CHING-LUNG LAI,^{*,‡} and MAN-FUNG YUEN^{*,‡}

^{}Department of Medicine, [‡]State Key Laboratory for Liver Research, and [§]Department of Pathology, University of Hong Kong, Queen Mary Hospital, Hong Kong SAR, China*

METHODS:

We recruited 124 patients who were treated with 1 of the 5 nucleos(t)ide analogues (lamivudine, adefovir, entecavir, telbivudine, or clevudine). All patients had undergone liver biopsy when treatment began (baseline) and 1 year later. The cccDNA and HBsAg levels were measured by real-time polymerase chain reaction and the Elecsys II HBsAg Assay, respectively.

RESULTS:

After 1 year of treatment, HBV in 7 patients had become resistant to the nucleos(t)ide analogue. The remaining 117 patients had an average reduction of approximately 0.2 log₁₀ IU/mL in HBsAg, 5 log₁₀ IU/mL in serum level of HBV DNA, 2 log₁₀ copies/cell in intrahepatic total HBV DNA, and 1 log₁₀ copies/cell in cccDNA. Although 88 of 117 patients (75%) had undetectable serum levels of HBV DNA (<12 IU/mL), all had detectable levels of HBsAg, and only 5 (4%) had undetectable levels of cccDNA. On treatment with nucleos(t)ide analogues, patients with greater reductions in levels of cccDNA had greater reductions in HBsAg, but these reductions did not reach statistically significant correlations.

CONCLUSIONS:

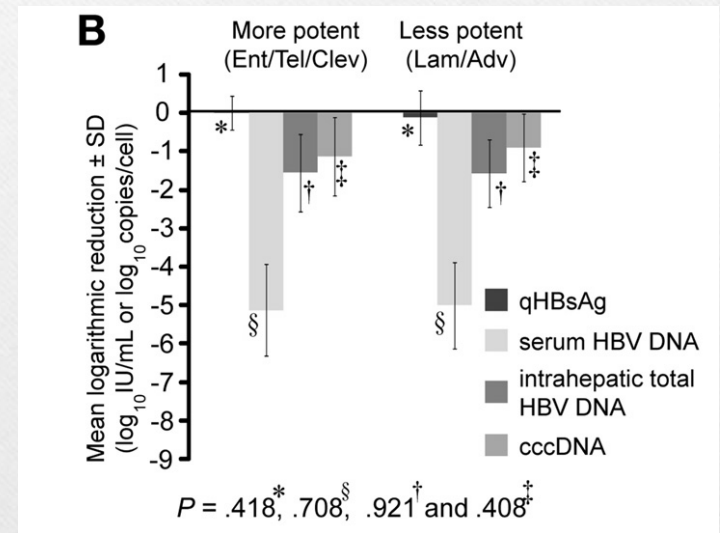
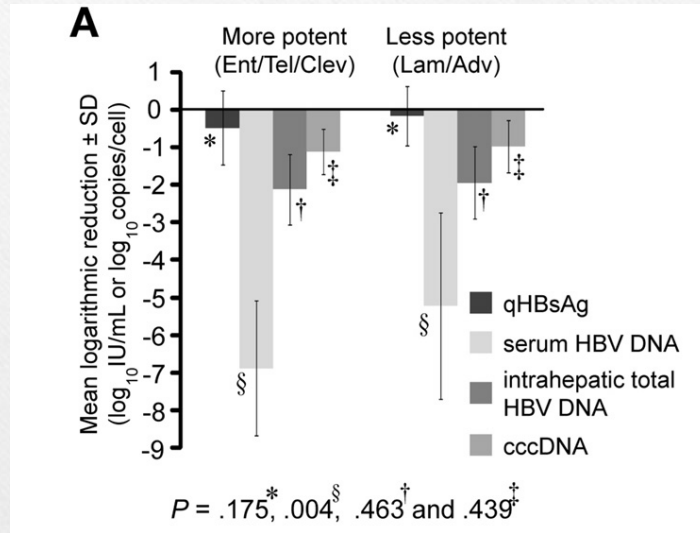
Although nucleos(t)ide analogues potentially reduced serum levels of HBV DNA, the reduction of HBsAg and cccDNA was small. In short-term therapy, the magnitude of HBsAg reduction does not correlate with that of cccDNA reduction.

cccDNA'da median logaritmik azalma; 0.93 log₁₀ kopya/hücre

Nükleozid Analoglarının Potenslerine Göre Etkileri

- HBeAg Pozitif

- HBeAg Negatif



qHBsAg ve cccDNA'nın logaritmik azalması arasında korelasyon bulunmamış.
Uzun süreli tedavideki etkinliği değerlendirmeye gerek var.

-
- Nükleoz(t)id analoglarının doğrudan cccDNA'ya etkisi yok
 - Uzun süreli etki tam bilinmiyor.
 - HBV DNA'yı baskılayarak immün yanıtın kısmen onarılmasını sağlayabilir, böylece viral klirens??

Mevcut Durumda Niçin Fonksiyonel Kür Sağlanamıyor?

- HBV cccDNA'nın intrinsik stabilitesi
- Viral replikasyonun yeterince baskılanamaması
- Konak hücreleri turnover'ı
- HBV rezervuarları, ekstrahepatik infeksiyon
- Antiviral immün yanıtta bozukluk

İnterferonların cccDNA Üzerine Etkisi

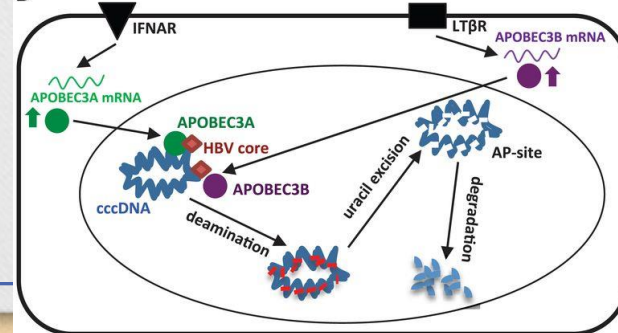
- İnterferon- α ve lenfotoksin- β reseptör aktivasyonu APOBEC3A ve APOBEC3B sitidin deaminazları düzenlemektedir.
- Bu etki HBV-infekte hücrelerde eksprese olan kor protein varlığı ile yönlendirilmektedir. Sitidin deaminasyonu, apurinic/aprimidinic bölge formasyonu olur ve sonuçta cccDNA yıkılır, genomik DNA ise etkilenmemektedir.
- Nükleer deaminazların ör. lenfotoksin- β reseptör aktivasyonu ile indüklenmesi veya konak intrinsik antiviral yolların güçlendirilmesi ve belki de antivirallerle kombinasyonu yeni bir tedavi seçeneği olmaktadır

Julie Lucifora et al. Science 2014;343:1221-1228

Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA

Julie Lucifora,^{1,2*} Yuchen Xia,^{1*} Florian Reisinger,¹ Ke Zhang,¹ Daniela Stadler,¹ Xiaoming Cheng,¹ Martin F. Sprinzl,^{1,3} Herwig Koppensteiner,¹ Zuzanna Makowska,⁴ Tassilo Volz,⁵ Caroline Remouchamps,⁶ Wen-Min Chou,¹ Wolfgang E. Thasler,⁷ Norbert Hüser,⁸ David Durantel,⁹ T. Jake Liang,¹⁰ Carsten Münk,¹¹ Markus H. Heim,⁴ Jeffrey L. Browning,¹² Emmanuel Dejudin,⁶ Maura Dandri,^{2,5} Michael Schindler,¹ Mathias Heikenwalder,^{1††} Ulrike Protzer^{1,2††}

Current antiviral agents can control but not eliminate hepatitis B virus (HBV), because HBV establishes a stable nuclear covalently closed circular DNA (cccDNA). Interferon- α treatment can clear HBV but is limited by systemic side effects. We describe how interferon- α can induce specific degradation of the nuclear viral DNA without hepatotoxicity and propose lymphotoxin- β receptor activation as a therapeutic alternative. Interferon- α and lymphotoxin- β receptor activation up-regulated APOBEC3A and APOBEC3B cytidine deaminases, respectively, in HBV-infected cells, primary hepatocytes, and human liver needle biopsies. HBV core protein mediated the interaction with nuclear cccDNA, resulting in cytidine deamination, apurinic/aprimidinic site formation, and finally cccDNA degradation that prevented HBV reactivation. Genomic DNA was not affected. Thus, inducing nuclear deaminases—for example, by lymphotoxin- β receptor activation—allows the development of new therapeutics that, in combination with existing antivirals, may cure hepatitis B.



İnterferonla Kombinasyon Tedavileri

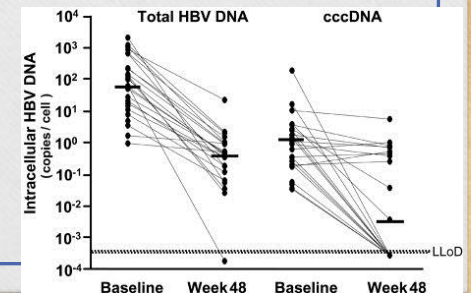
- Pegile interferon-alfa ve adefovir kombinasyon tedavisi
cccDNA 'da 2,4 log azalma ve HBsAg düzeyinde azalmaya yol açmış
- Pegile interferon-alfa ve entekavir kombinasyon tedavisi,
cccDNA düzeyinde 1,4 log azalmaya yol açmış
- Giriş inhibitörleri, RNaz H aktivitesi ve nükleokapsid oluşumunu engelleyici ajanlarla birlikte kombinasyon

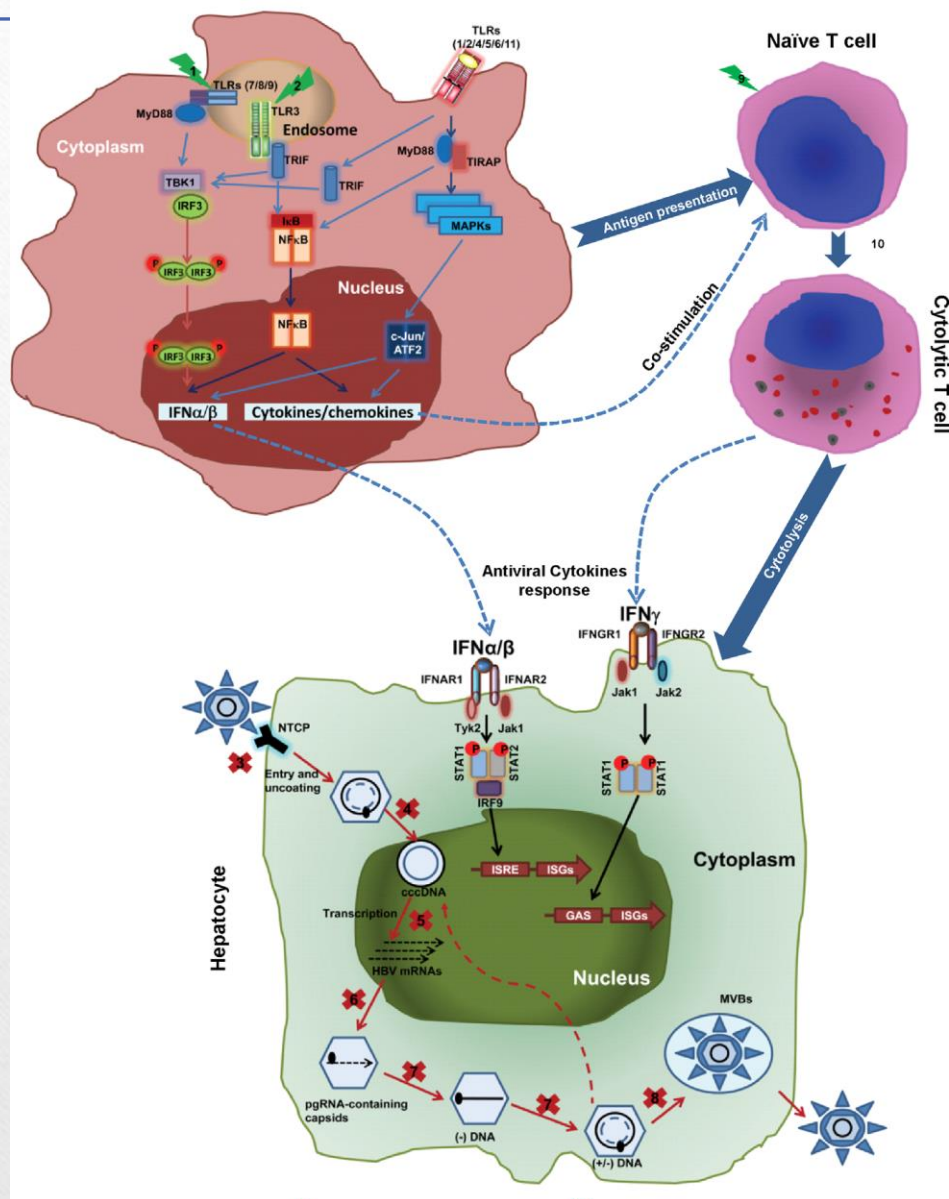
HBV replikasyonunu ve cccDNA yapımını daha potent engelleyecek

Hepatology

Volume 44, Issue 3, pages 675-684, 29 AUG 2006 DOI: 10.1002/hep.21282

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/hep.21282/full#fig2>



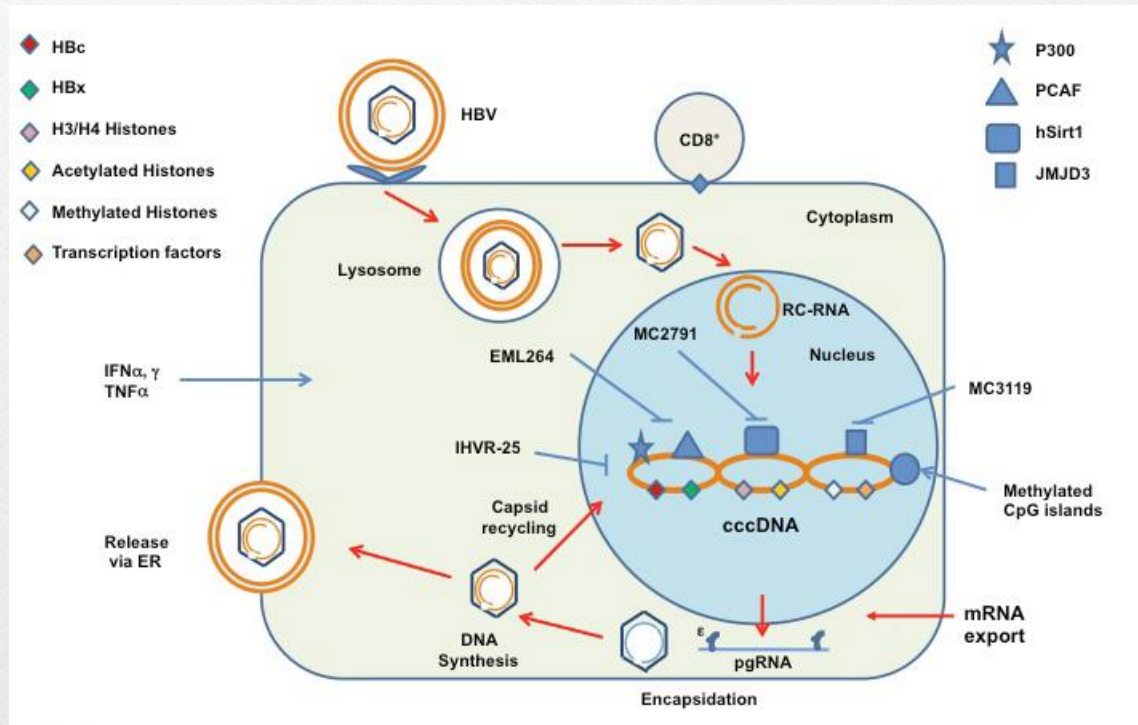


HBV cccDNA'nın Eliminasyonu veya Fonksiyonel Baskılanması

- **İnfekte hücrelerden nonsitolitik eliminasyonu**
- **Kopyalanmasının engellenmesi**
- DNA sekans-spesifik endonükleaz veya çinko-finger proteinler; kültüre hepatoma hücrelerinde başarılı
- Bu antiviralleri eksprese eden gen tedavisi

Hoeksema KA, Tyrrell DL. Methods Mol Biol 2010;649:97–116. 94.
Chen JL, et al. Mol Ther 2014;22:303–11.

cccDNA Kontrolu İçin Yeni Stratejiler



Karayiannis BBV, Ekim 2014.

-
- Katılımınız için teşekkür ederim.