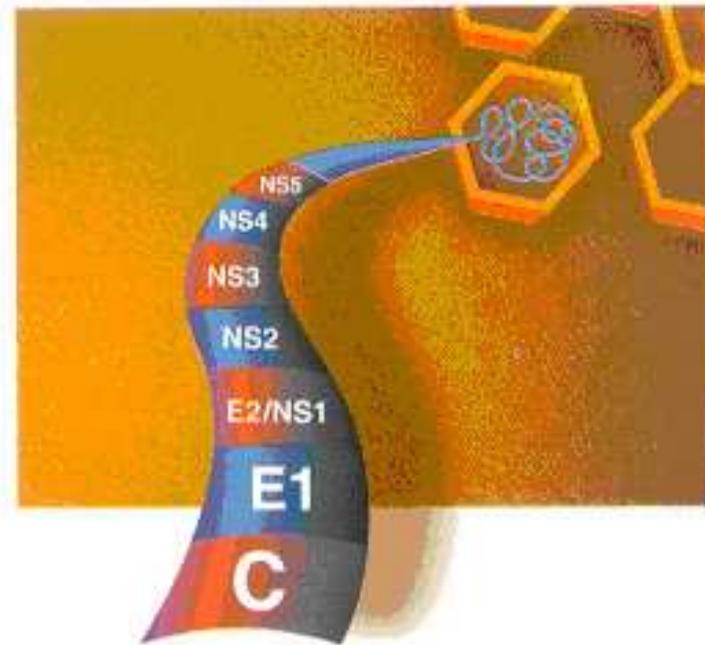
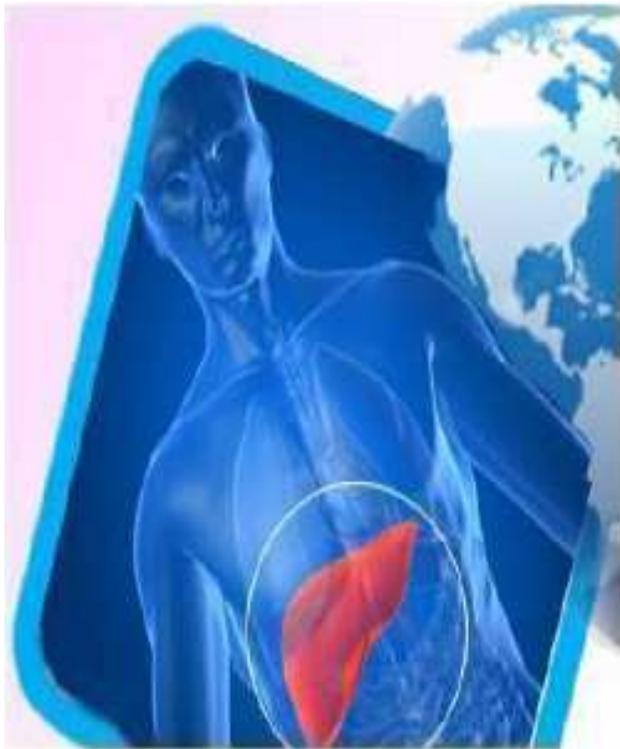


# I predittori di risposta pretrattamento

*Lucia Collini*

## Il Virus dell'Epatite C



*14 ottobre 2011*  
*Trento*

# Fattori pre-trattamento

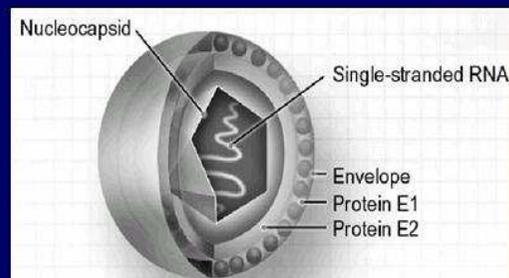
*OSPITE*

*VIRUS*

## Predictors of Virologic Response

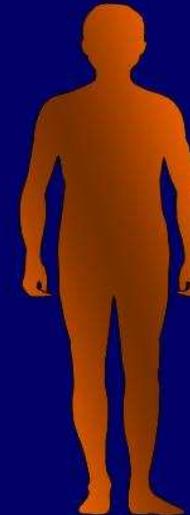
### Viral Factors

- Genotype
- Viral Load



### Host Factors

- Age
- Cirrhosis
- Race
- Gender
- Weight
- Hepatic Fe Overload
- Coinfection (HIV, HBV)
- Steatosis
- Hyperinsulinemia



# Fattori pre-trattamento

OSPITE



Sesso



Età

Consumo di alcool



Obesità

Insulinemia basale

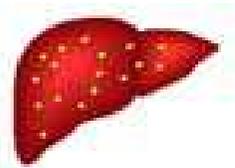


# Fattori pre-trattamento

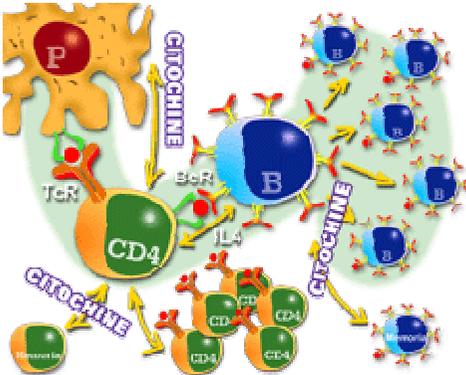
Sovraccarico marziale



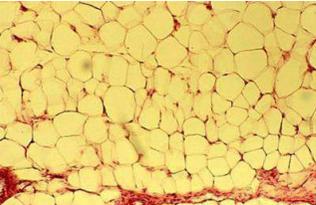
Fibrosi



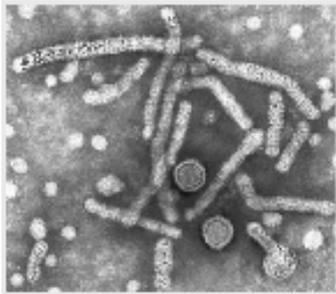
Immunocompetenza



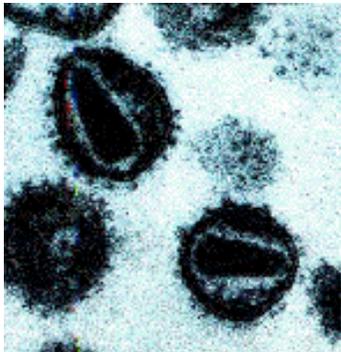
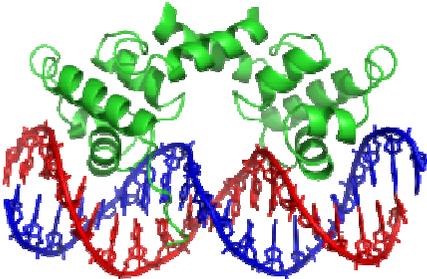
Lipemia



Coinfezione con altri virus (HIV, HBV)



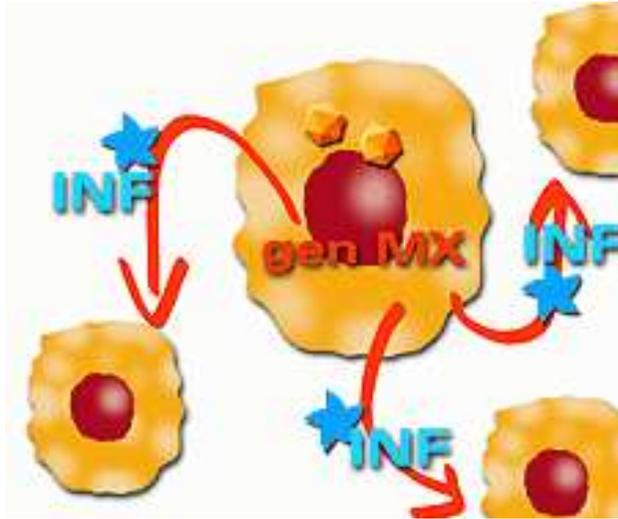
Genotipo interferone lambda



OSPITE



# Interferone

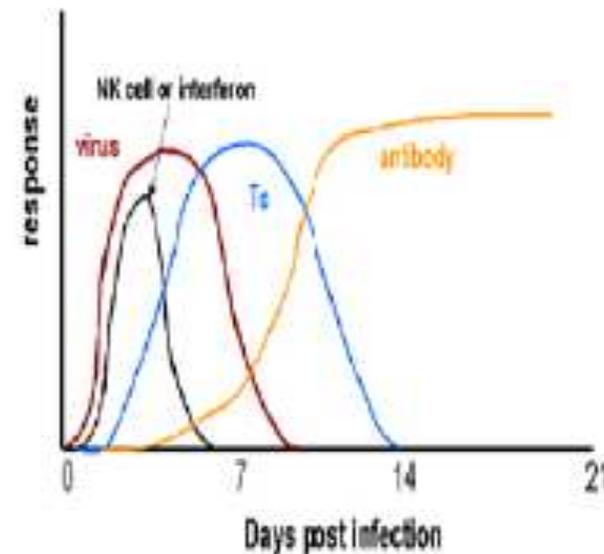


Gli interferoni (IFN) sono glicoproteine (citochine) prodotte

- da cellule del sistema immunitario (globuli bianchi)
- da cellule tissutali

in risposta alla presenza di agenti esterni.

Gli interferoni si legano alla membrana delle cellule e stimolano la produzione di enzimi antivirali; quando un virus attacca una cellula attivata dall'interferone, non riesce a moltiplicarsi (arresto o un'attenuazione dell'infezione)



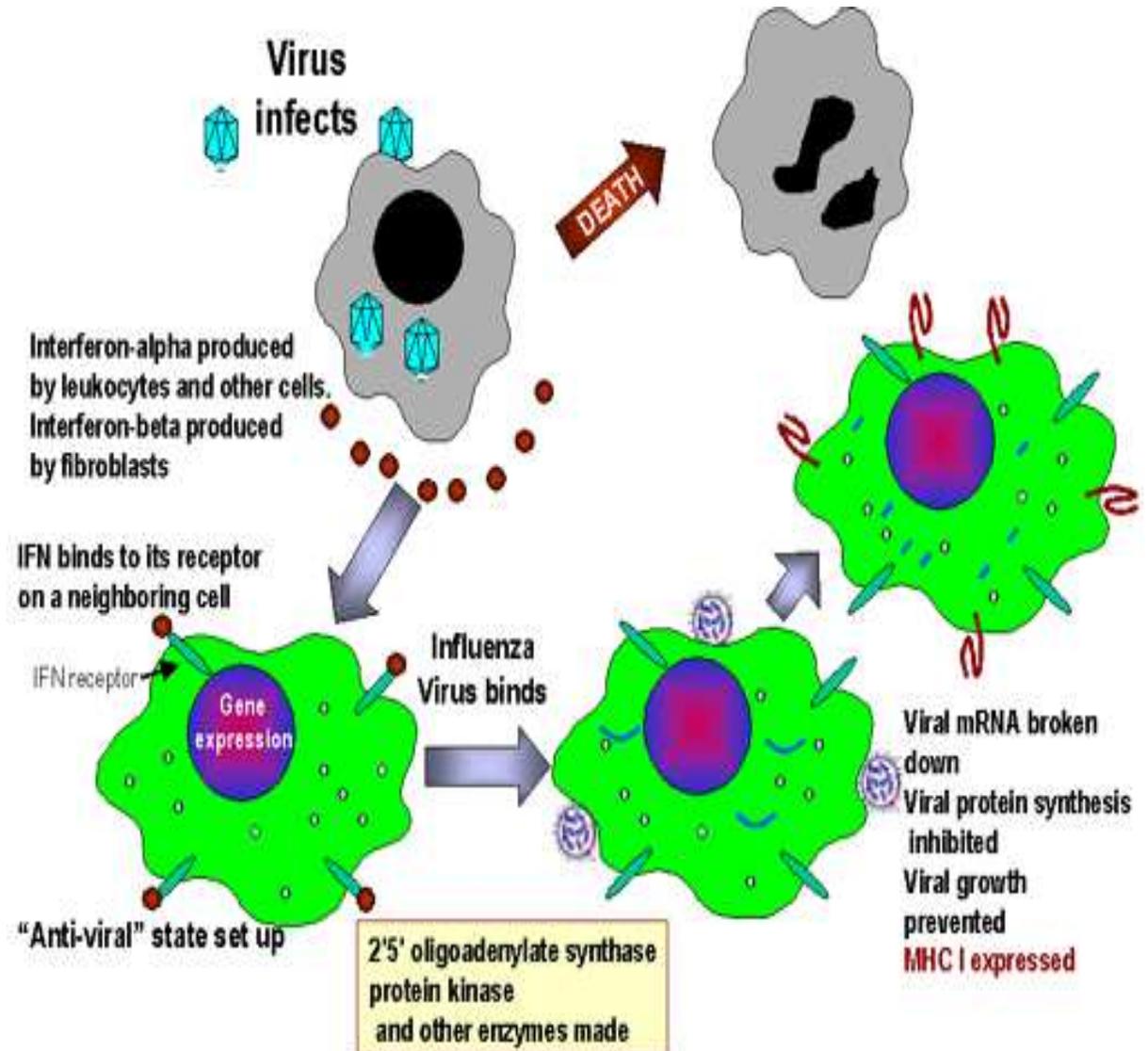
Typical response to an acute virus infection

# Interferone: tipi

- **tipo I**  
alfa and beta

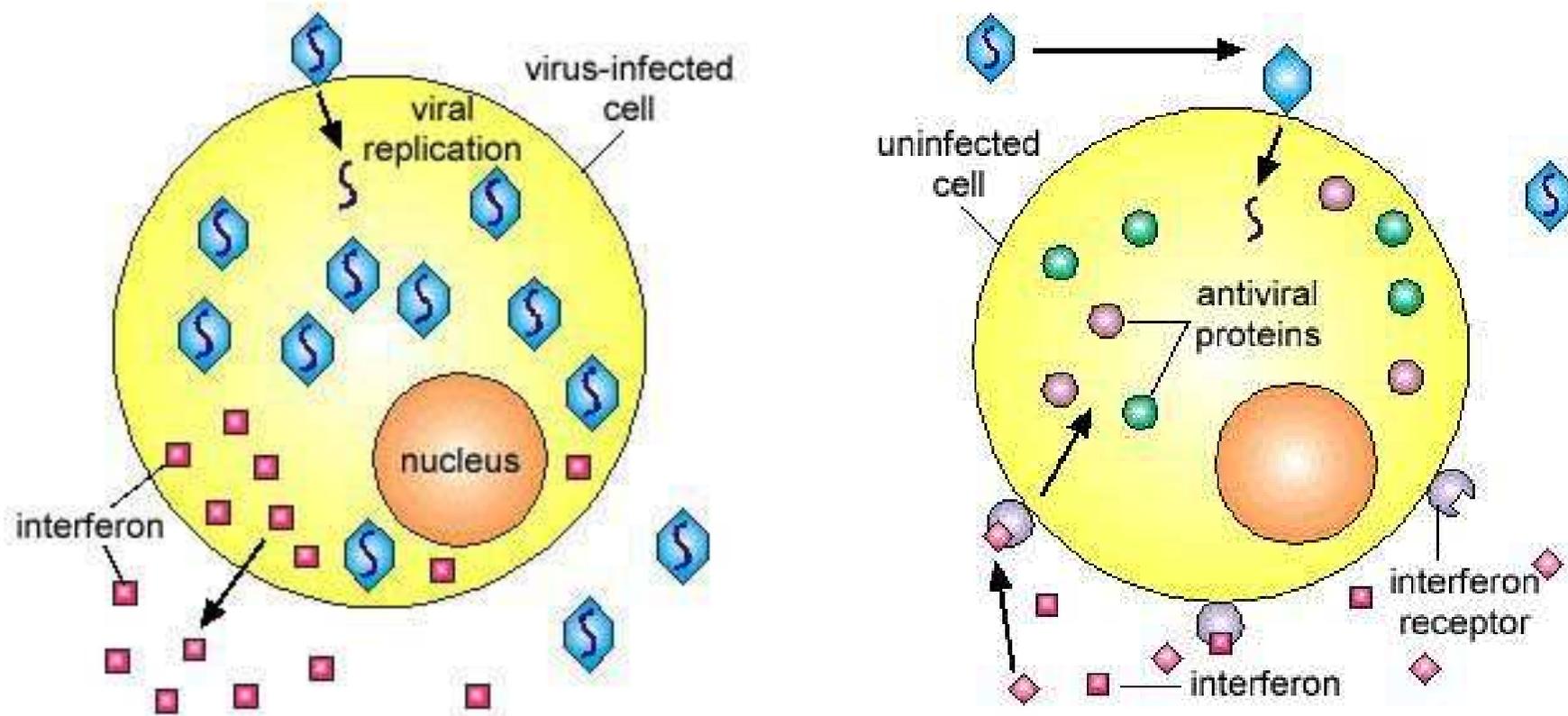
Alfa (leukocyte interferon)  
Prodotto dai leucociti

Beta (fibroblast interferon)  
Prodotto dai fibroblasti



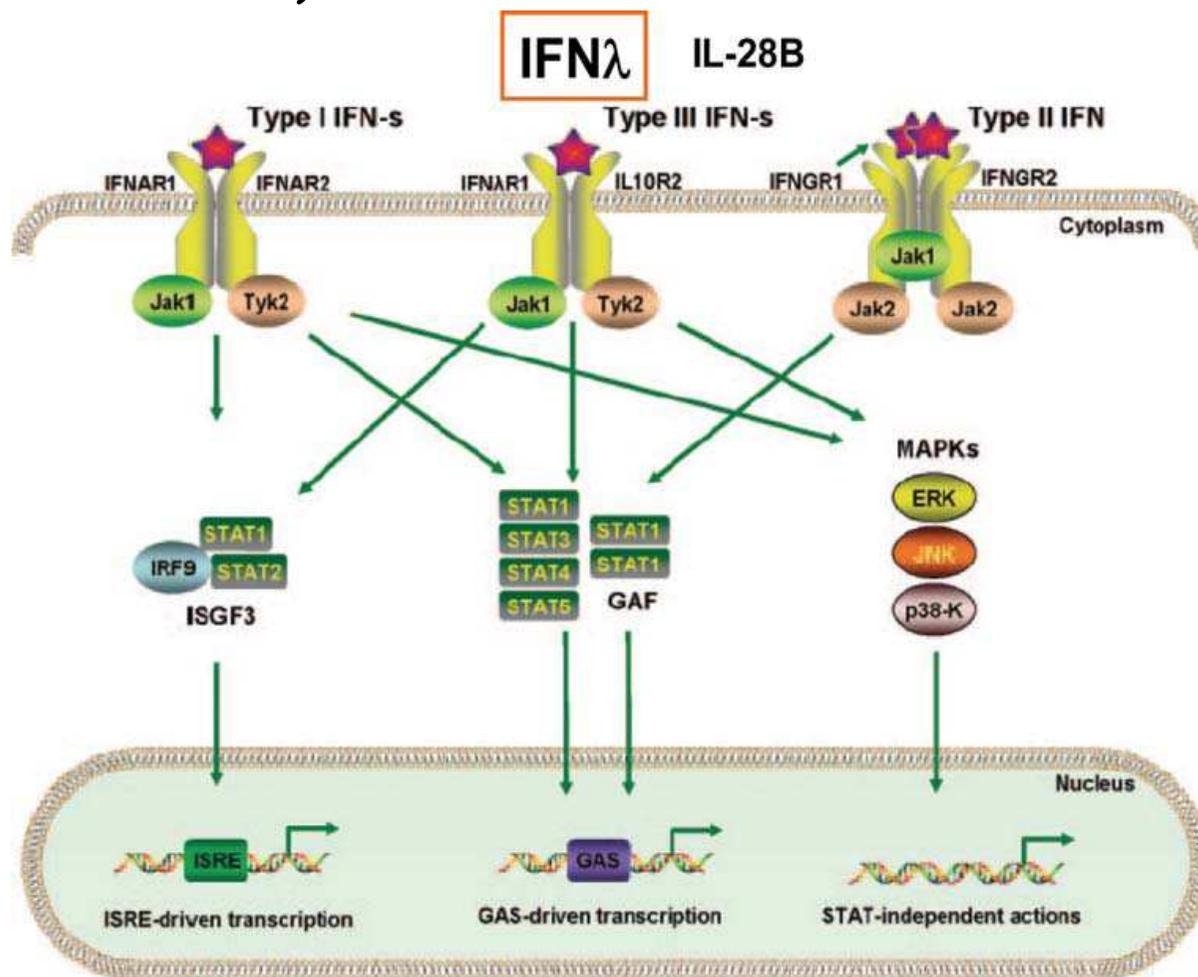
# Interferone: tipi

- **tipo II** Gamma (immune interferon) prodotto da cellule T attivate & cellule NK



# Interferone: tipi

- **tipo III** (tre molecole di interferone lambda) chiamate IFN- $\lambda$ 1, IFN- $\lambda$ 2 and **IFN- $\lambda$ 3** (oppure interleuchine IL29, IL28A e **IL28B**)



# un importante fattore predittivo di pretrattamento

## IL28B



**European**  
**HUMAN**  
**GENETICS**  
**Conference 2010**

Gothenburg, Sweden, June 12-15, 2010  
in conjunction with the  
European Meeting on Psychosocial Aspects of Genetics

[www.eshg.org](http://www.eshg.org)

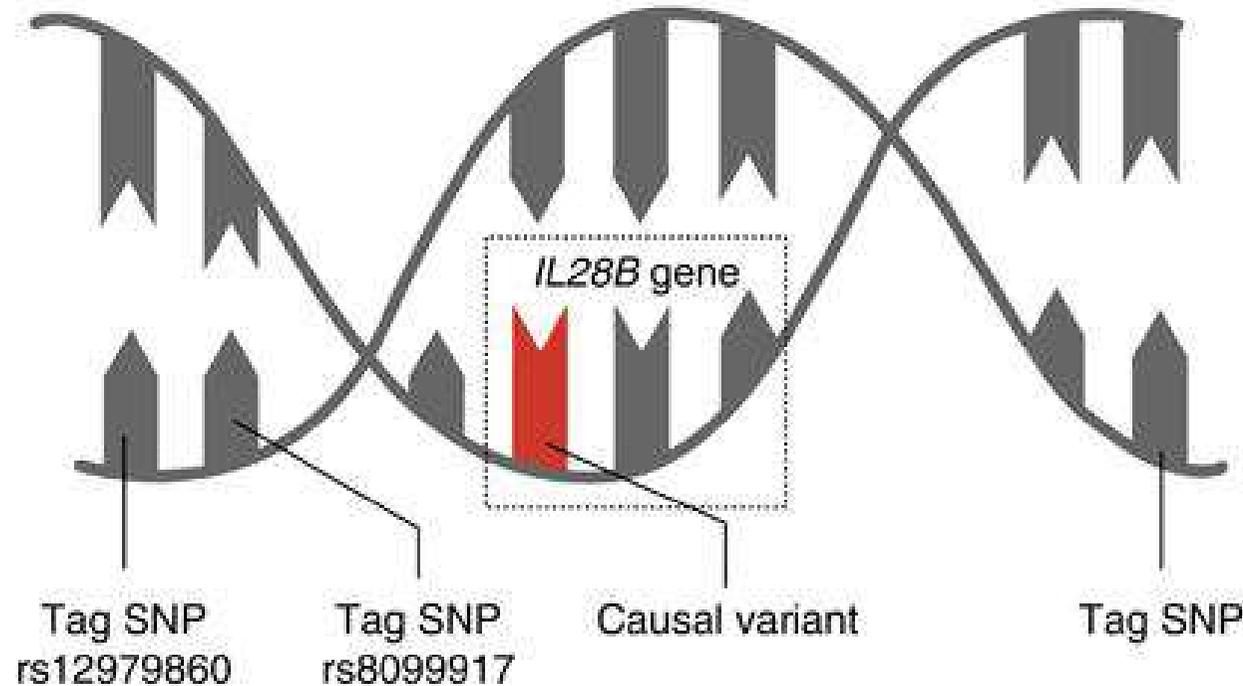
The European Society of Human Genetics promotes research in basic and applied human and medical genetics and facilitates contact between all concerned with these areas.

Una piccola mutazione genetica a carico di un gene che codifica per **IL28B** consente di prevedere in che modo i pazienti infettati da epatite C reagiscono al trattamento

È questo il risultato presentato nel corso della *Conferenza Annuale della European Society of Human Genetics* da Zoltan Kutalik, del dipartimento di genetica medica dell' Università di Losanna, in Svizzera.

Il gene *IL-28B*, che codifica per *IFN- $\lambda$ 3*, è situato sul cromosoma 19

Chromosome 19

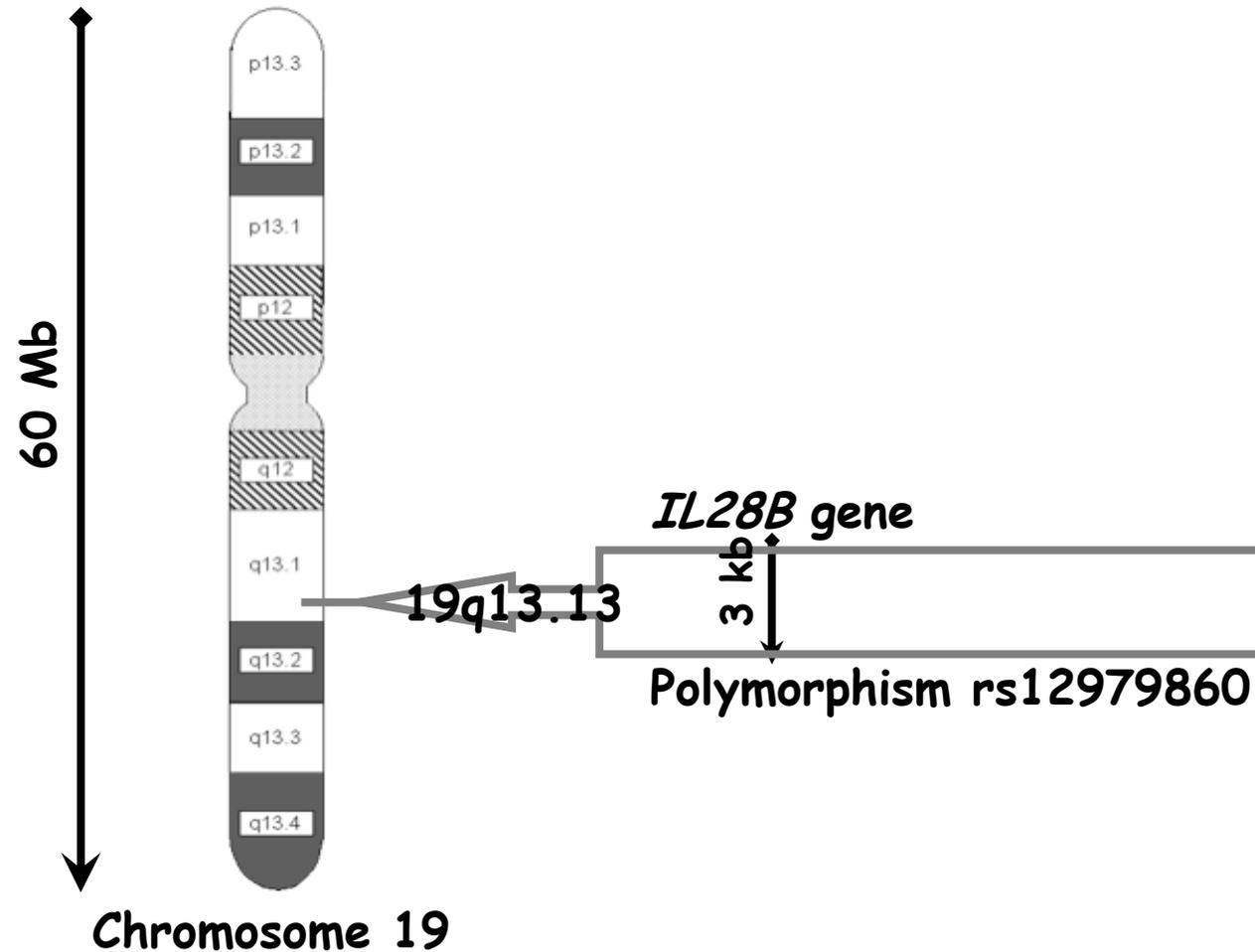


*rs8099917* e  
*rs12979860*:  
polimorfismi a  
singolo nucleotide  
(SNP)  
accanto al gene  
*IL28B*

La determinazione di uno solo di questi due SNP è sufficiente per predire una risposta virologica.

Il valore predittivo di SVR associato a *rs12979860* CC è più alto rispetto a *rs8099917* TT (positive predictive value: 72% vs. 63%)

# Un Polimorfismo sul cromosoma 19 predice la SVR



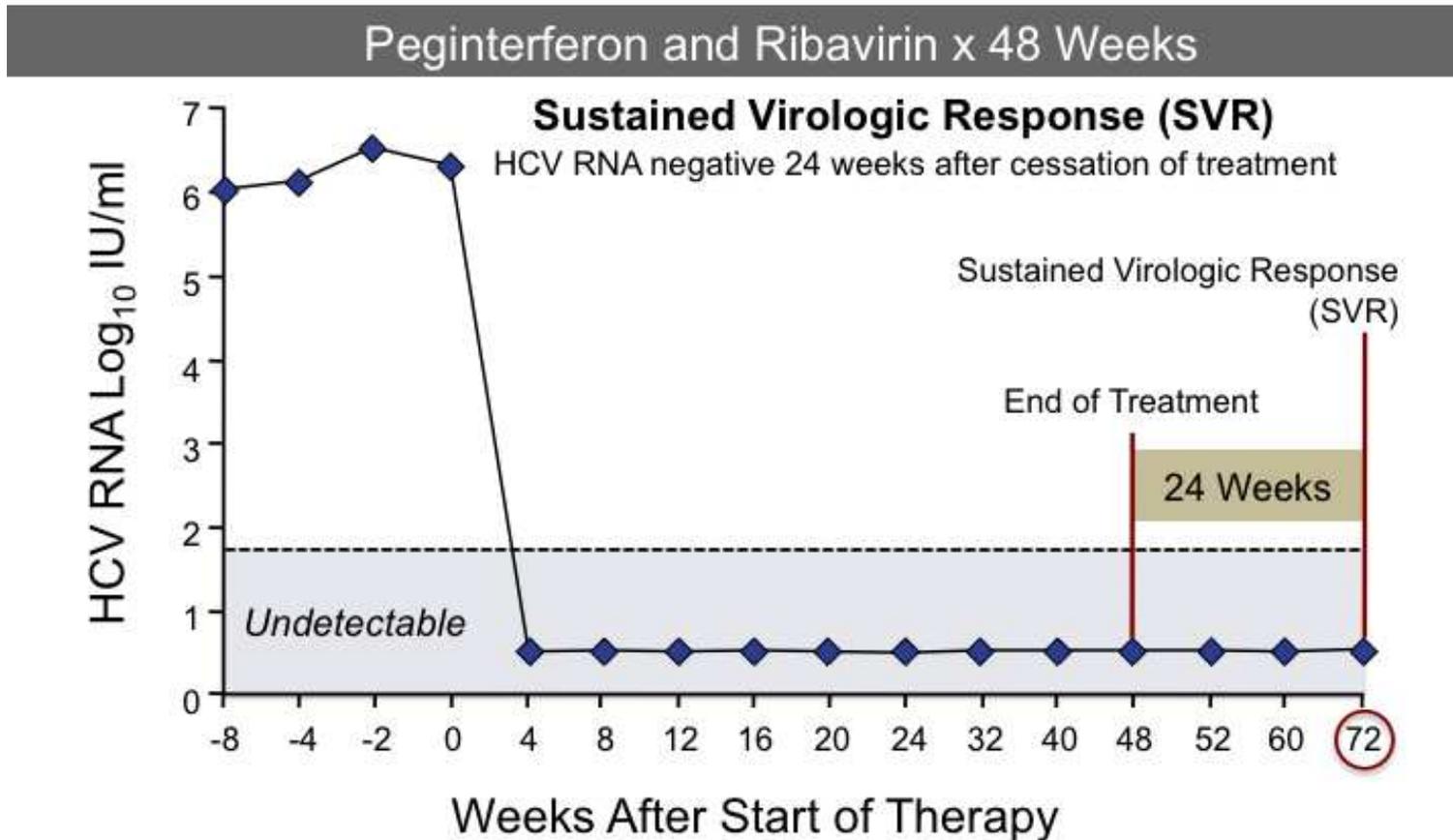
Ge D, et al. *Nature*. 2009;461:399-401.

Chromosome 19 graphic courtesy of Oak Ridge National Laboratory. Available at:

<http://www.ornl.gov/sci/techresources/meetings/ecr2/olsen.gif>. Accessed on: October 21, 2009.

# Sustained Virological Response (SVR)

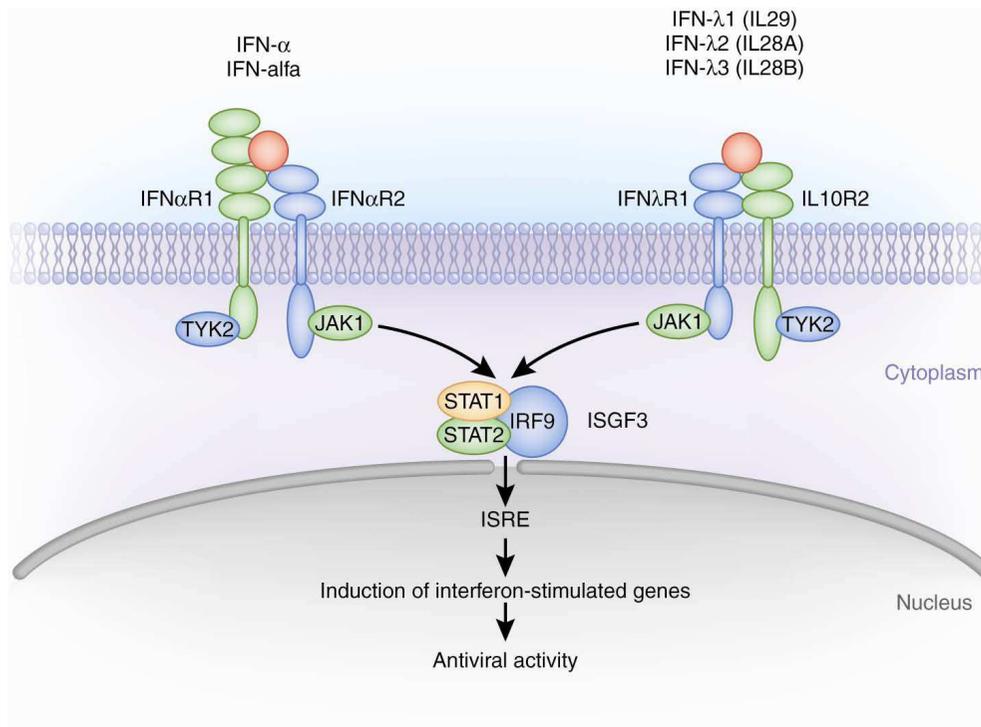
HCV-RNA negativo a 24 settimane post-terapia



Nell'analisi multivariata il decadimento rapido della viremia HCV a 48h è risultato predittore più potente per la predizione di SVR rispetto a viremia basale, genotipo ed incompleta aderenza

# IL28B

Studi di ricercatori di Losanna hanno mostrato che un polimorfismo di singolo nucleotide, o **SNP**, a carico del gene **IL28B**, che codifica per l'interferone lambda **IFN-λ3**, è associato in modo significativo con la capacità dell'organismo di eliminare il virus dell'epatite C.

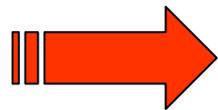
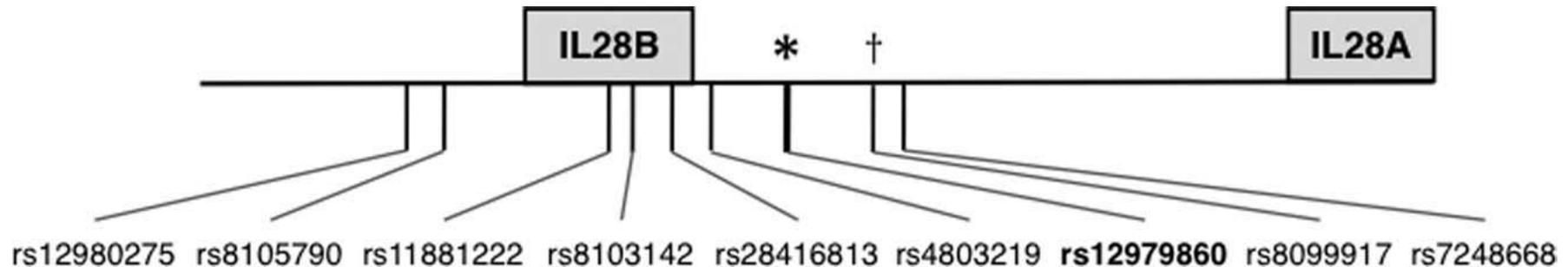


In particolare,

gli individui portatori dell'allele protettivo in questo locus genetico hanno una probabilità di eliminare il virus doppia ai non portatori,

e rispondono alla terapia in modo molto più efficace.

La presenza di un polimorfismo IL28B può essere utilizzato come un marcatore prognostico per la gestione del paziente HCV

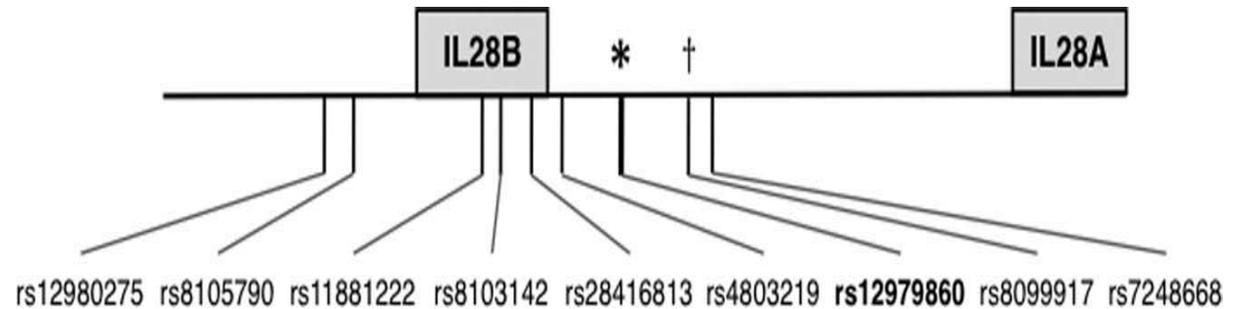


consente di prevedere in che modo i pazienti infettati reagiscono al trattamento, essendo in stretta associazione con il corso naturale dell'infezione



è cruciale per incrementare il successo della terapia

# rs12979860



Sono state identificate più varianti genetiche associate al gene IL28B.

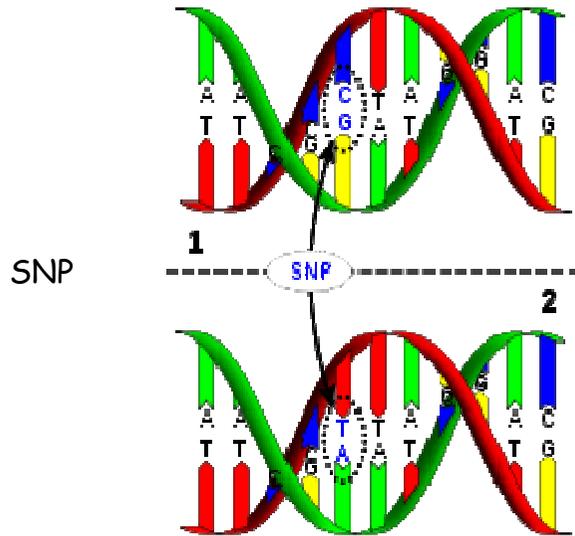
La prima scoperta, rs12979860(\*), comparata con rs8099917(†), è risultata essere il più forte predittore di risposta .

Studi genome-wide association (GWAS) indicano l'impatto della genetica dell'individuo sulla risposta del trattamento (peg-IFN-RBV ) per il genotipo 1.

Le varianti con la risposta migliore sono più diffuse nei pazienti di razza europea e bianca, rispetto a individui di razza nera.



Una popolazione con più fenotipi distinti contiene un *marker* genetico

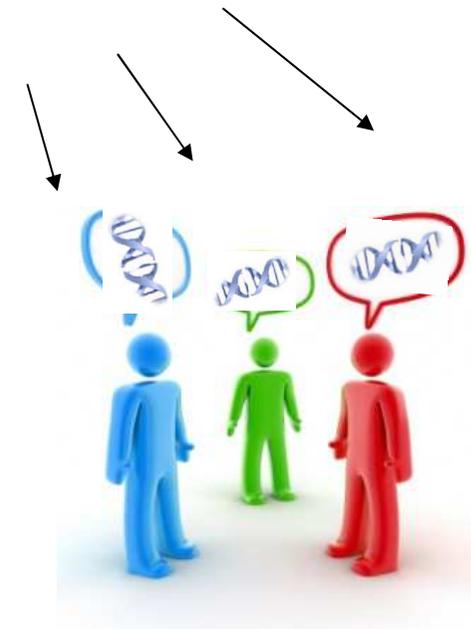


Il genoma umano contiene più di 3 Bilioni di nucleotidi  
> 10 Milioni di polimorfismi a singolo-nucleotide (SNPs)

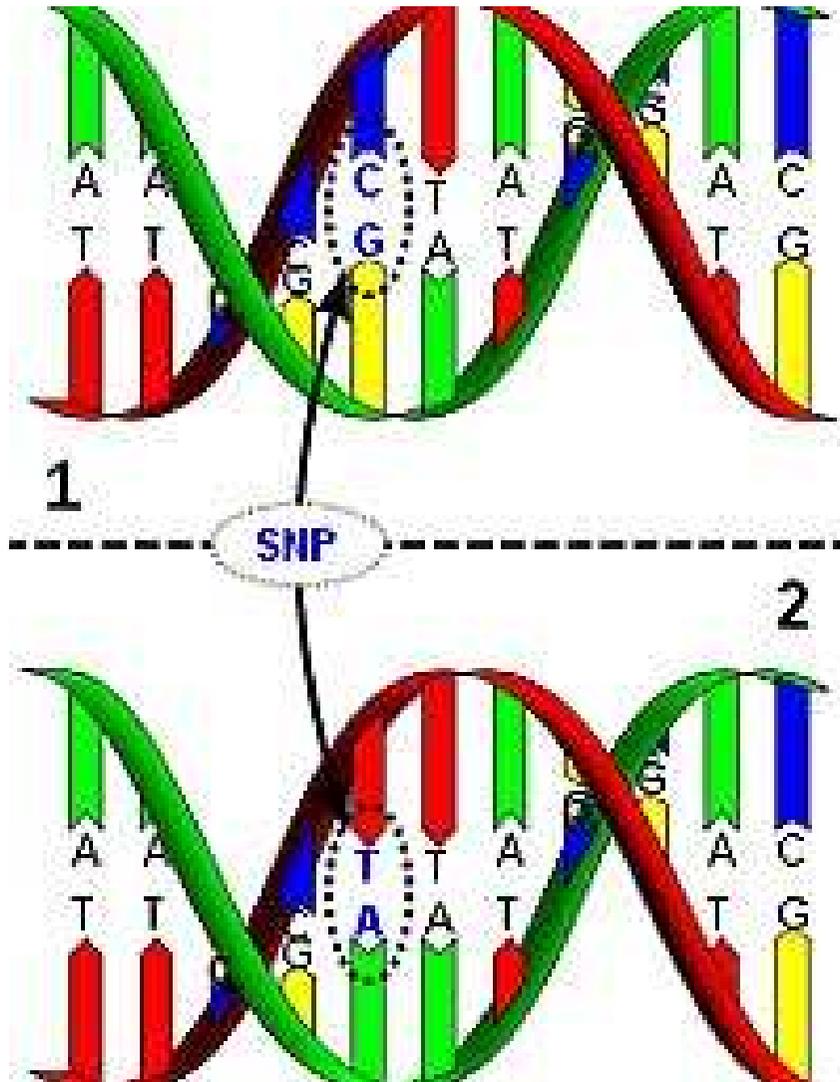
SNPs viene studiato con i *microarray chips* che generano grandi quantità di informazioni  
Ciascun *chip* contiene > 500,000 "tag" SNPs,  
> 90% delle mutazioni genetiche viene rilevata



Piattaforme di bioinformatica elaborano i dati e associano il genotipo al fenotipo



# IL28B

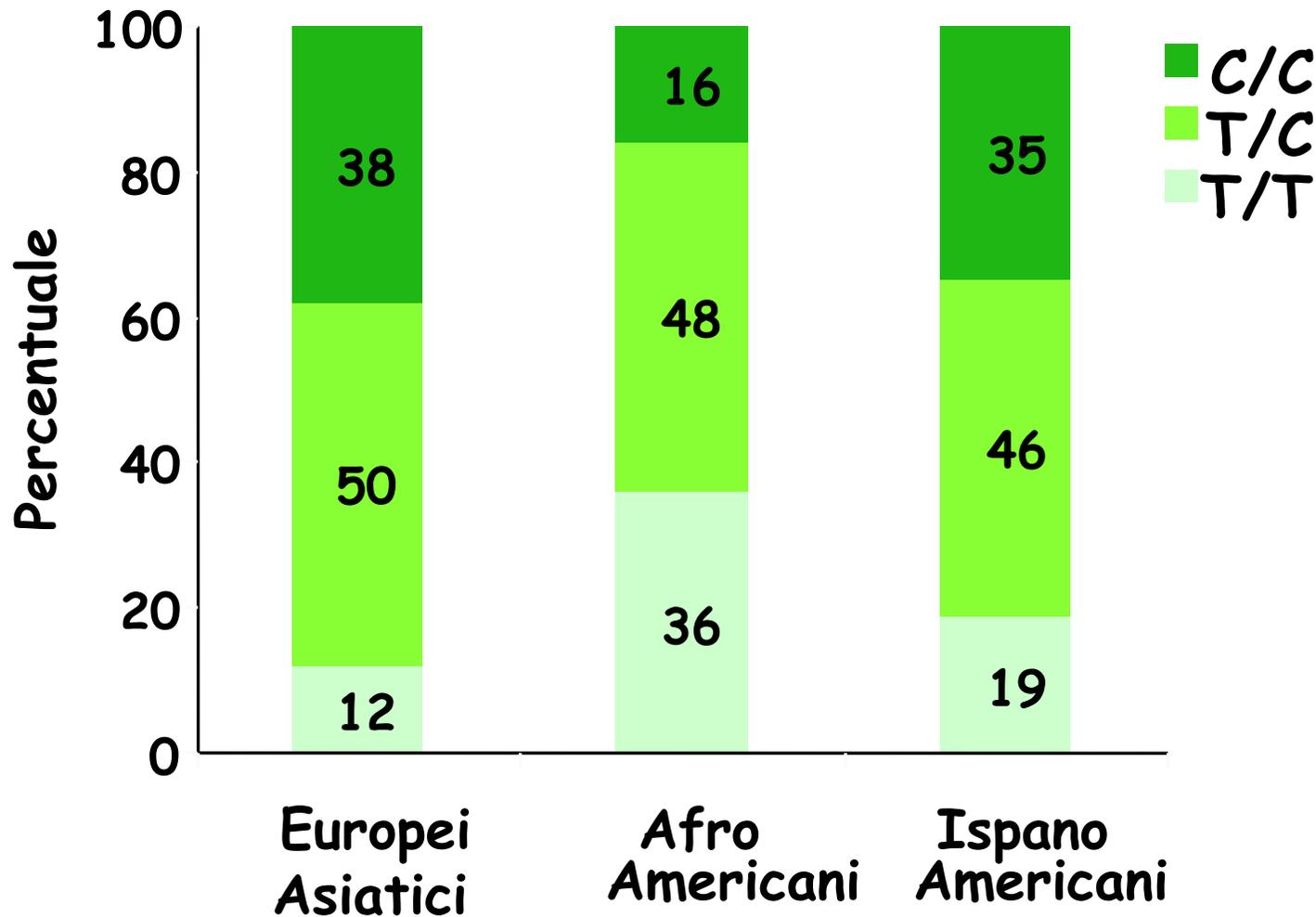


Altri fattori:  
il ruolo dell'allele CC del genotipo IL28B ha una importante funzione nella risposta sostenuta (SVR) in HCV genotipo 1

I pazienti che possiedono il genotipo C/C hanno un tasso di SVR maggiore di due/tre volte rispetto a quello dei pazienti con genotipo T/T.

# Rs12979860: Frequenza del Genotipo nella Popolazione

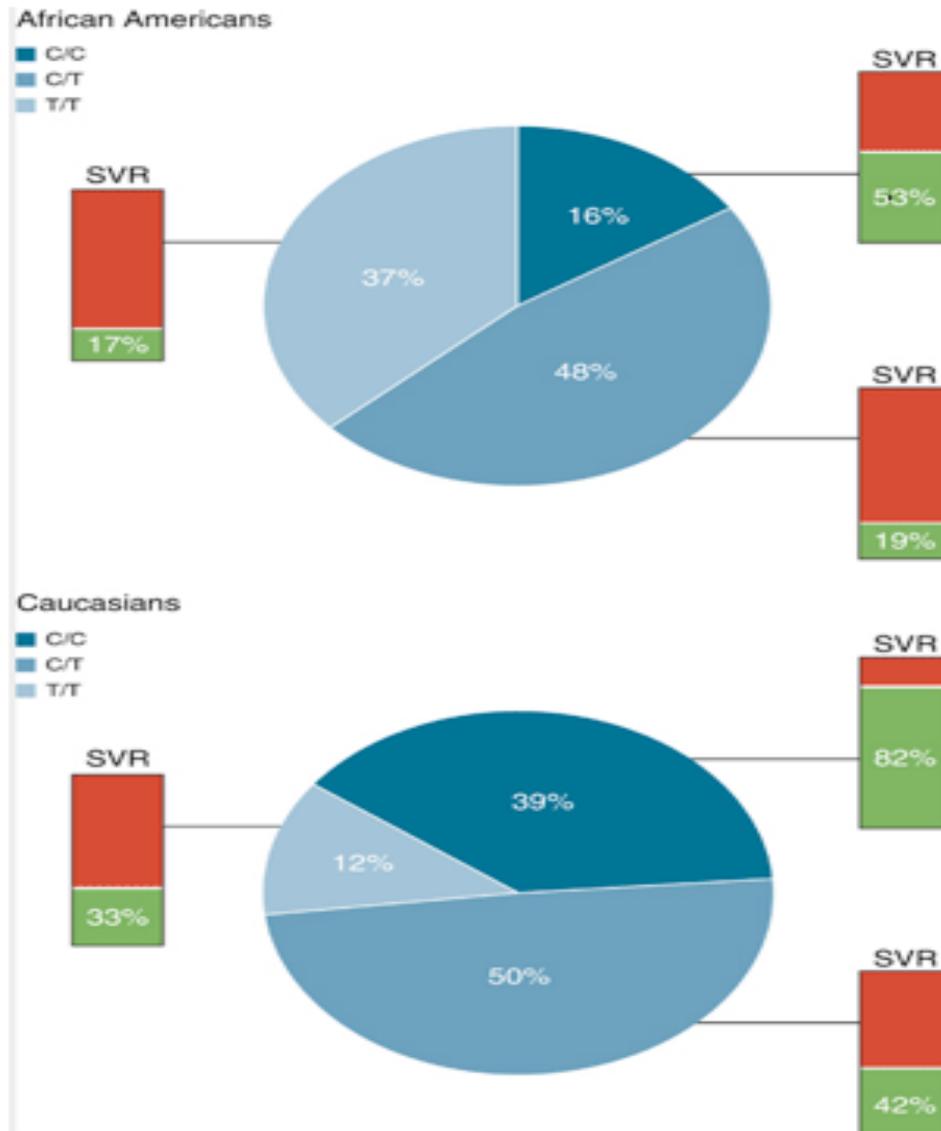
La frequenza allelica (rs12979860C) varia tra le razze ed i gruppi etnici: maggiore frequenza negli individui provenienti dall'Est Asia e inferiore negli afro-americani



CC genotype associated with favorable response to HCV treatment in pts treated with PEG/riba\* - Clark PJ, Am J Gastroenterol epub Oct 5 2010



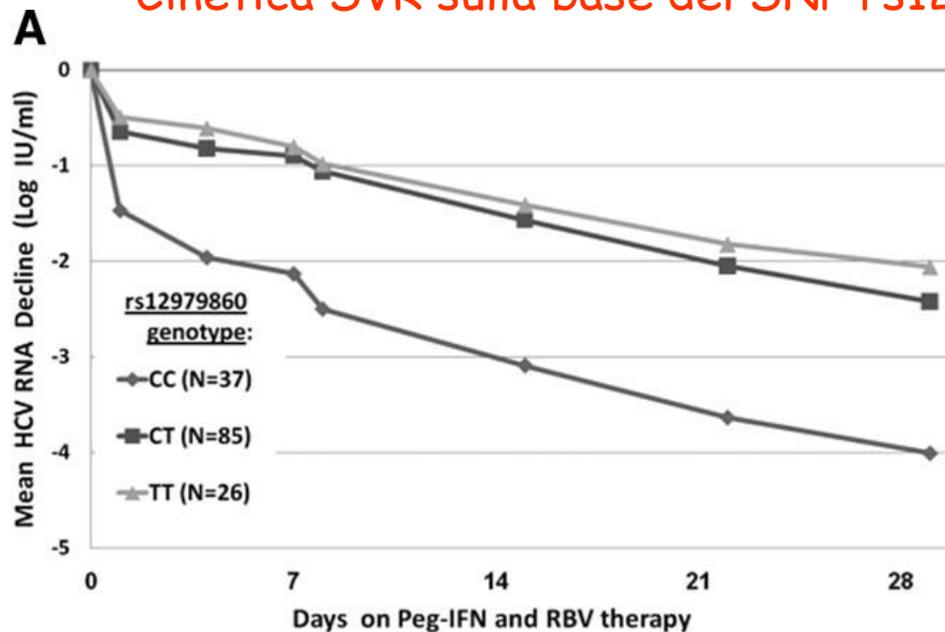
## SVR (%) con genotipo *IL28B* in Afro - Americani e Caucasici



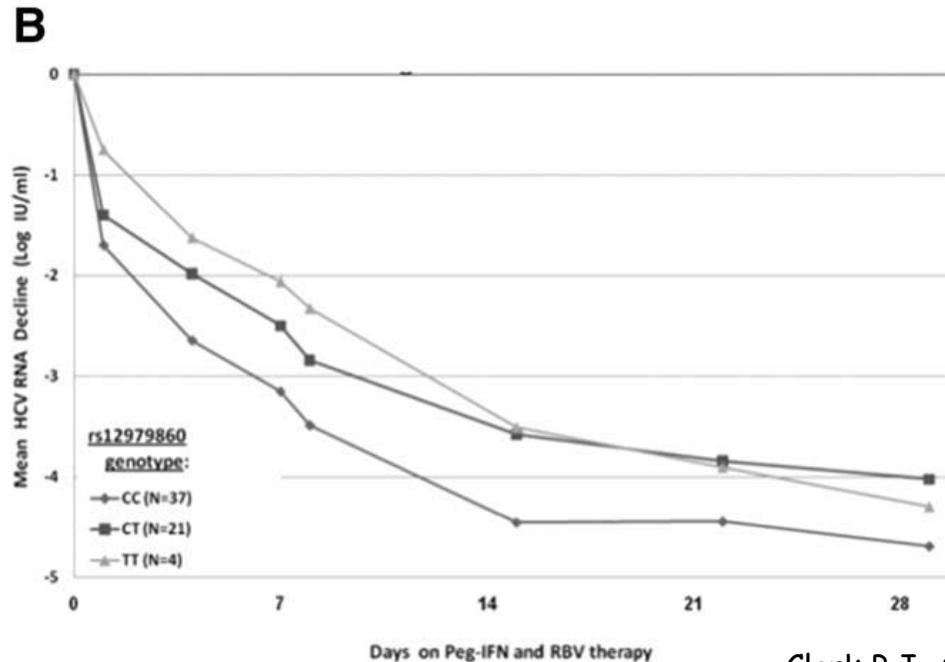
Per ciascun gruppo di popolazione, la proporzione di pazienti con genotipo "favorito" *IL28B* C/C, e "meno favorito" C/T e T/T

La percentuale SVR è mostrata in verde. I pazienti con genotipo *IL28B* C/C hanno il valore più alto di SVR.

## Cinetica SVR sulla base del SNP rs12979860

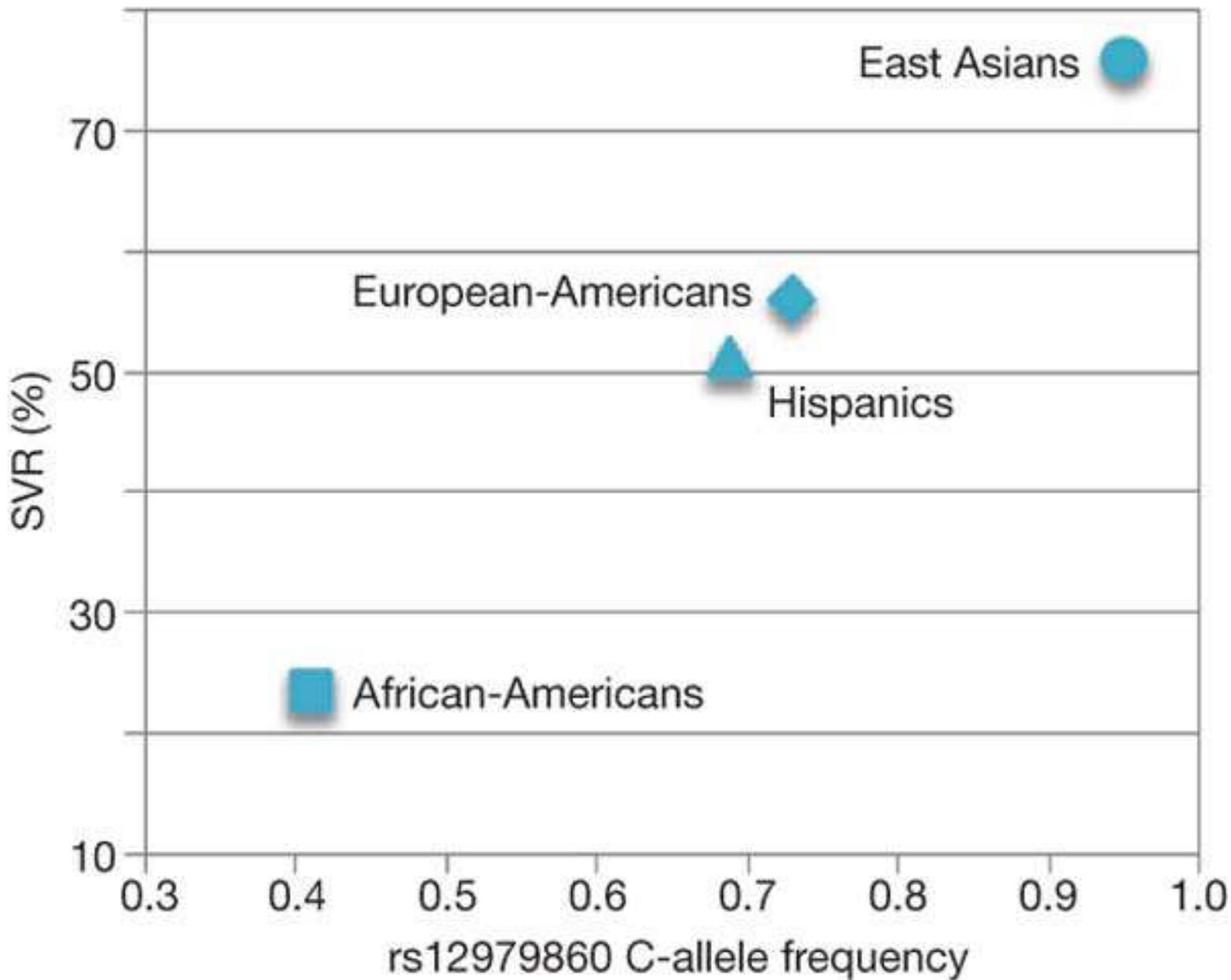


Dall'inizio della terapia PEG-IFN e RBV, i pazienti con genotipo C/C presentano un calo di HCV RNA più marcato nei 28 giorni rispetto ai pazienti con genotipo C/T or T/T.



Nella razza caucasica le differenze tra gli alleli C/C, C/T, e T/T sono più evidenti nei pazienti HCV genotipo 1 (A) che in quelli con genotipo 2 o 3 (B).

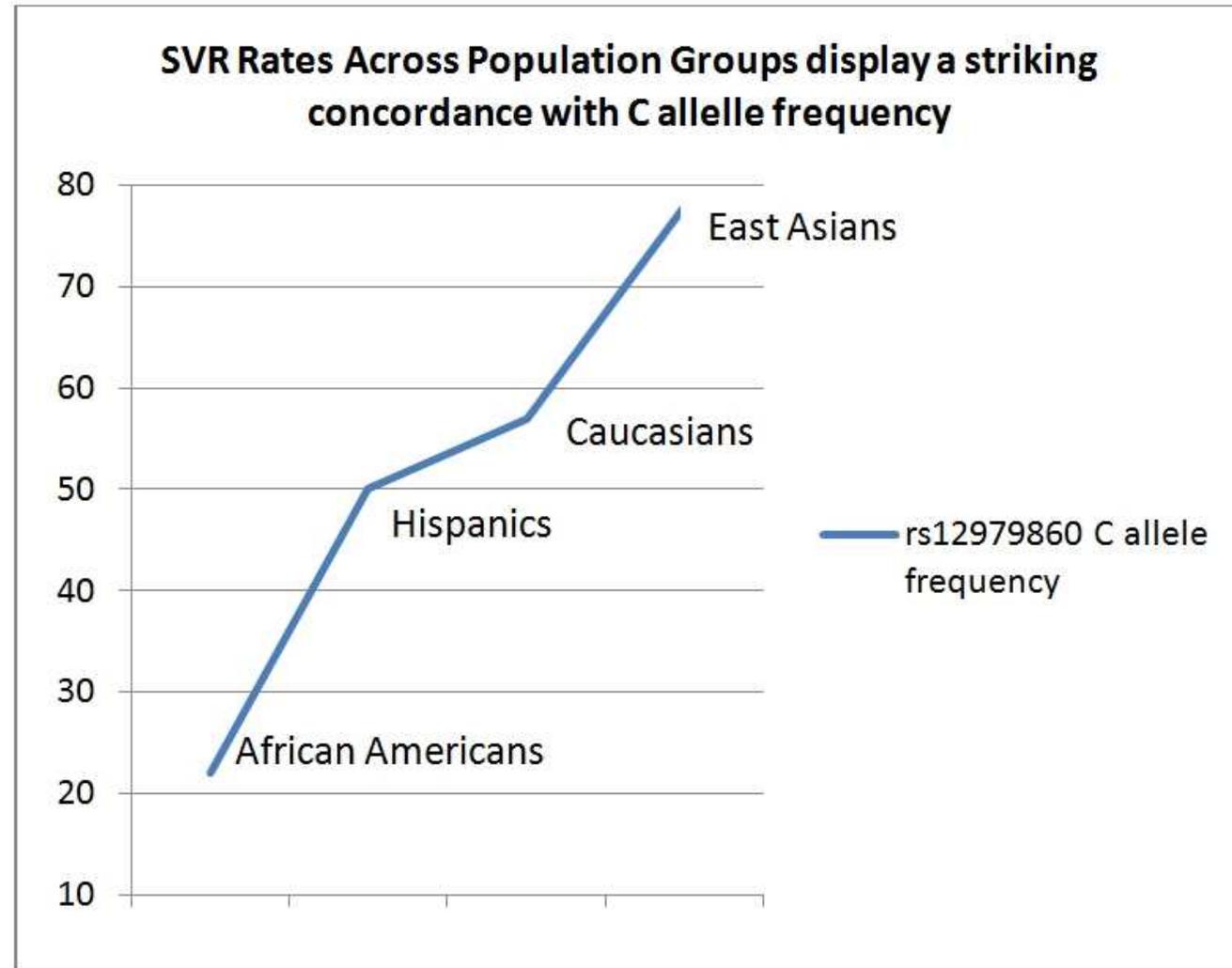
SVR e rs12979860-C: frequenza per razza

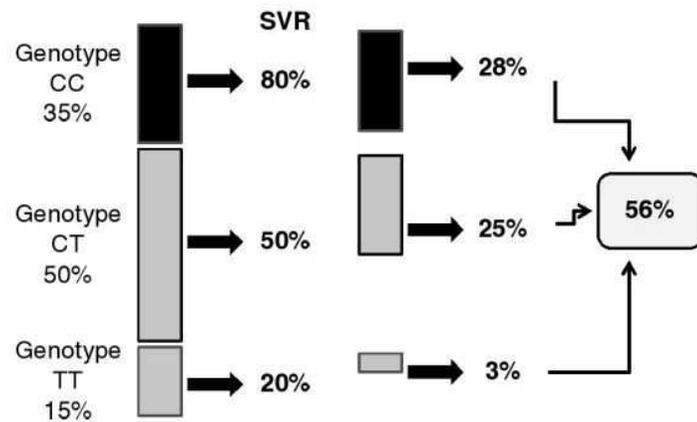




## SVR (%) con genotipo *IL28B* in Afro-Americani, Ispano-Americani, Caucasici e Asiatici

SVR %  
(Drug Efficacy  
at 4 weeks)





Source: Liver Int © 2011 Blackwell Publishing

Il meccanismo biologico responsabile di queste associazioni genetiche resta sconosciuto e al centro di ricerche attualmente in corso.

Il polimorfismo genetico nei soggetti IL28B-CC è fortemente associato ad una maggiore probabilità di clearance (eliminazione) virale spontanea a seguito di una infezione acuta da HCV.

L'allele C, associato ad una migliore risposta al trattamento, è correlato ad una carica virale basale più elevata.

Sembra plausibile che il polimorfismo IL28B abbia un ruolo nella espressione intra-epatica del gene stimolato da IFN, con conseguenze sia per la carica virale, che per la risposta al trattamento farmacologico con PEG-IFN e Ribavirina.

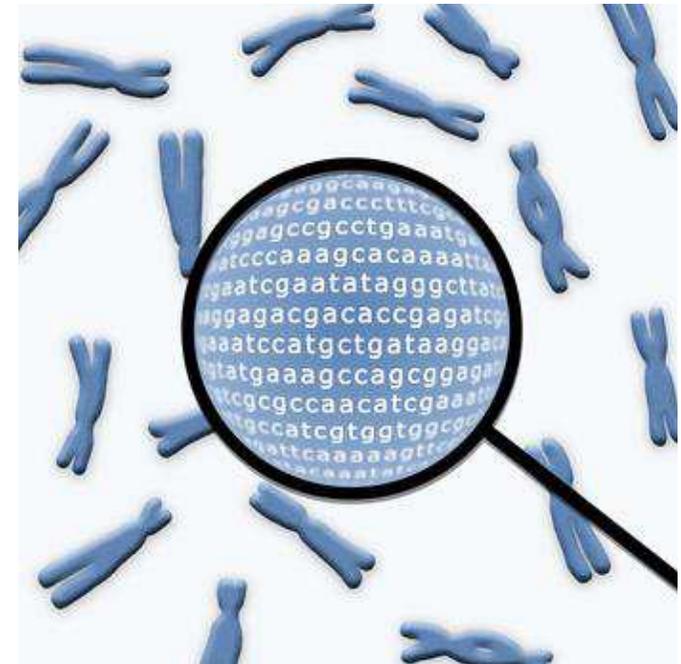
# IL28B: un buon saggio DIAGNOSTICO o PREDITTIVO ?

Indispensabile come predittore di risposta pretrattamento

Poco potente come saggio di differenziazione

Non può in maniera certa stabilire chi avrà e chi non avrà benefici dalla terapia

Può essere utile nelle decisioni terapeutiche in popolazioni con una alta prevalenza del genotipo CC



1- Eur J Clin Invest 2010; 40 (10):950-959

2- D. Ge, Nature, vol 461, 2009

3- D. Thomas, Nature, vol 461, 2009

# Fattori pre-trattamento

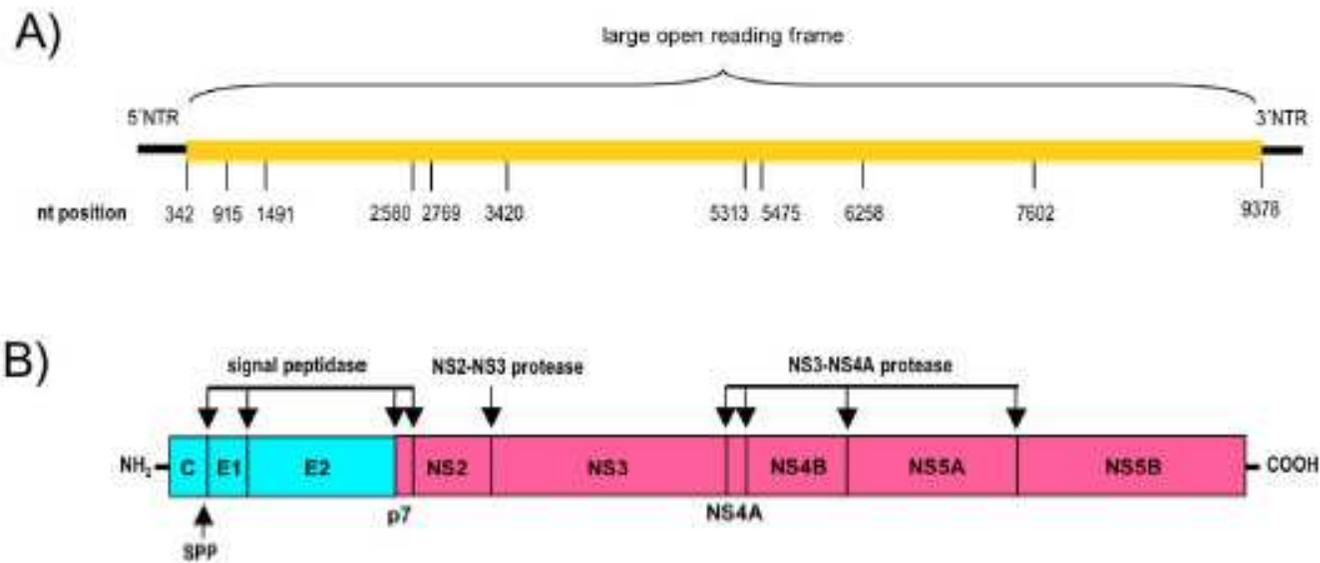


Genotipo virale

Carica virale

Sequenze virali NS5 a e b

**VIRUS**



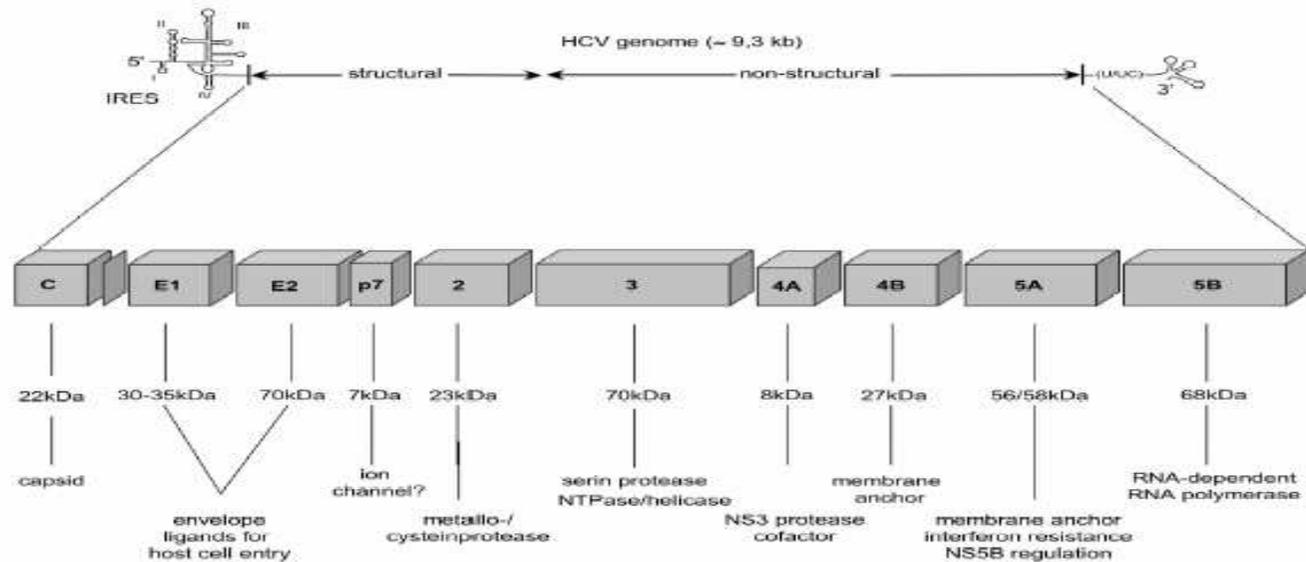


Elevata frequenza di mutazioni spontanee → eterogeneità genetica

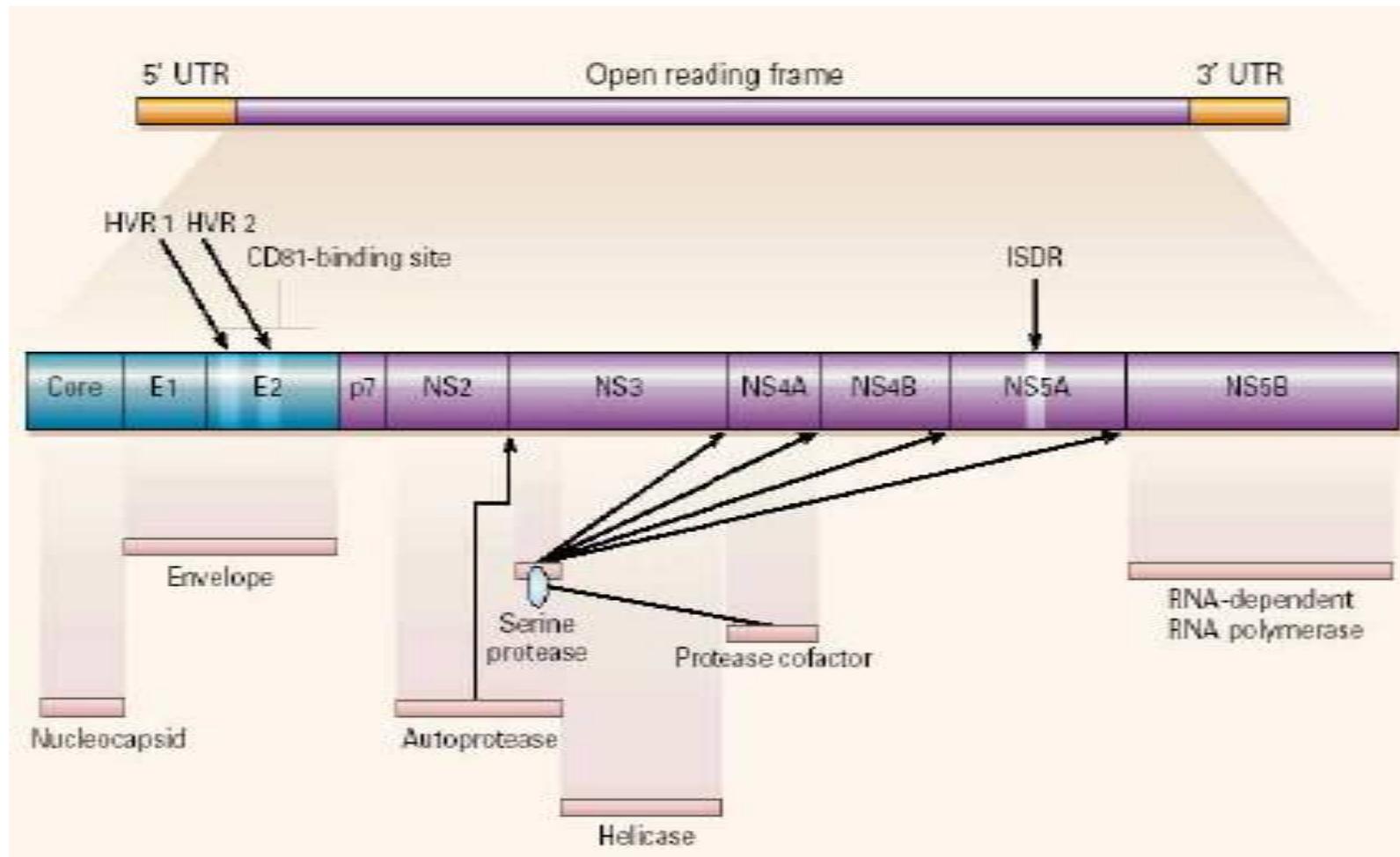
Alta variabilità:

6 genotipi

>50 sottotipi (*quasi-specie*)



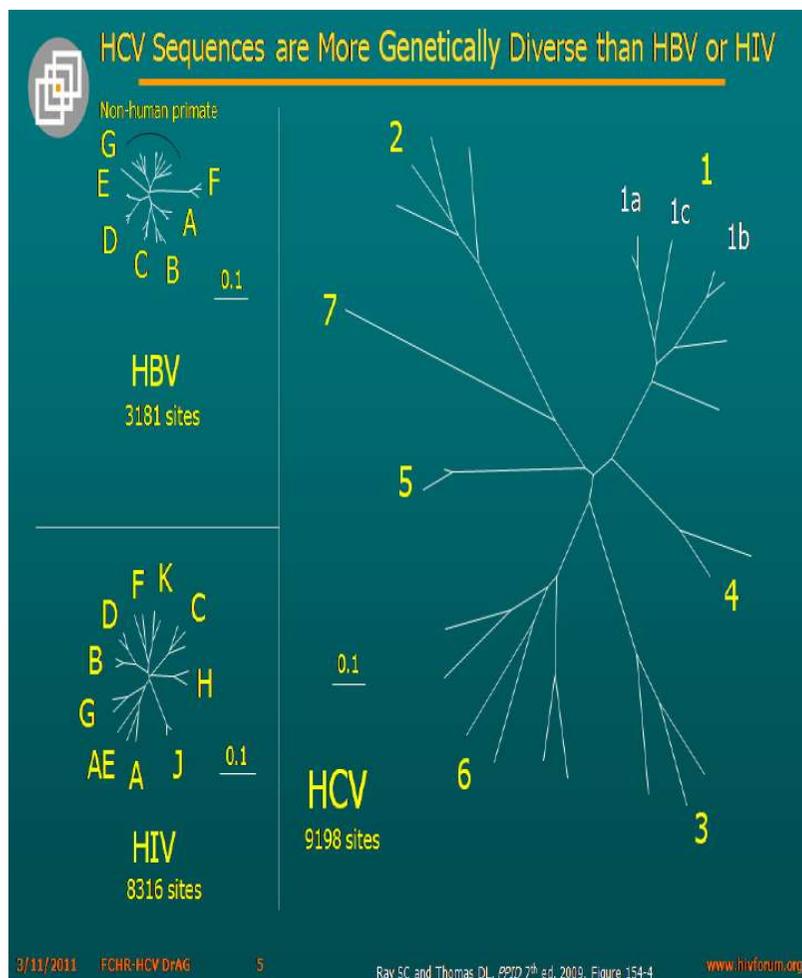
*In condizioni avverse sopravvive non il più forte ma chi sa adattarsi meglio (Charles Darwin)*



Il genoma è costituito da un singolo filamento di RNA (+) (9.5kb) Open Reading Frame (ORF) che codifica per una poliproteina dalla quale originano 10 proteine virali  
 La traduzione è regolata da una sequenza 5'NTR (non translated region)

# Genotipo virale

6 genotipi di HCV: da 1 a 6  
>50 sottotipi degli stessi: a, b, c



Sei genotipi maggiori, sulla base dell'analisi filogenetica delle regioni del core, E1 e NS5

Altro tipo di variabilità, le quasi-specie, cioè varianti spontanee o indotte dalla terapia e presenti nel singolo paziente infetto

Non vi è correlazione tra genotipo e gravità istologica o progressione della malattia.

Non vi è neanche correlazione tra genotipo e carica virale.

HCV è un virus molto eterogeneo perché molto mutante

# GENOTIPI DI HCV PREVALENTI

- Nordamerica, Centro-nordesteuropea: 1a
- Europa meridionale ed orientale, Giappone, Nordafrica (escl. Egitto), Turchia, Israele: 1b
- Giordania, Iran: 1a
- Resto Medio Oriente, Africa subsahariana: 4
- Sudafrica: 5
- Sudest asiatico: 7-9
- Indonesia: 10, 11
- Filippine: 1a





# GENOTIPI DI HCV

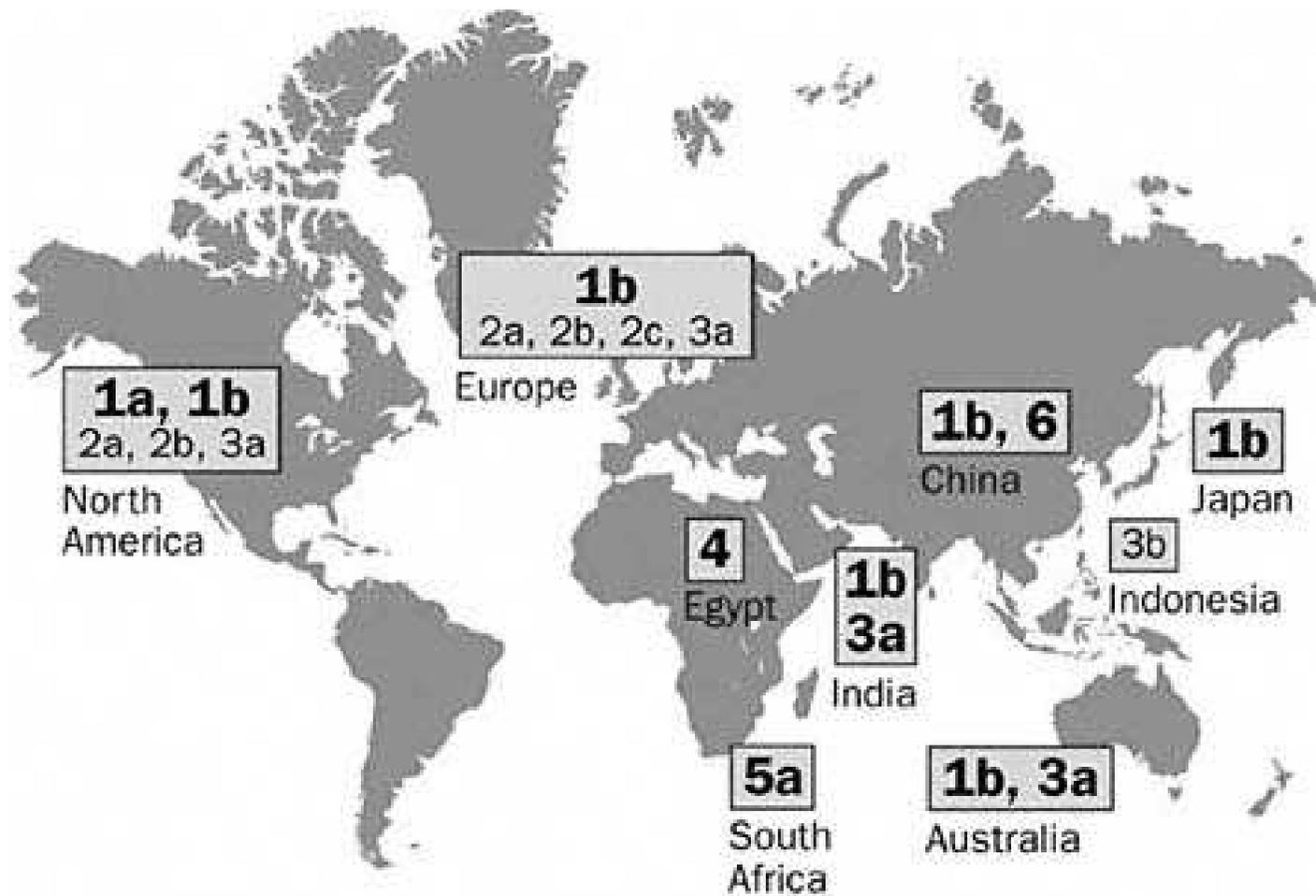
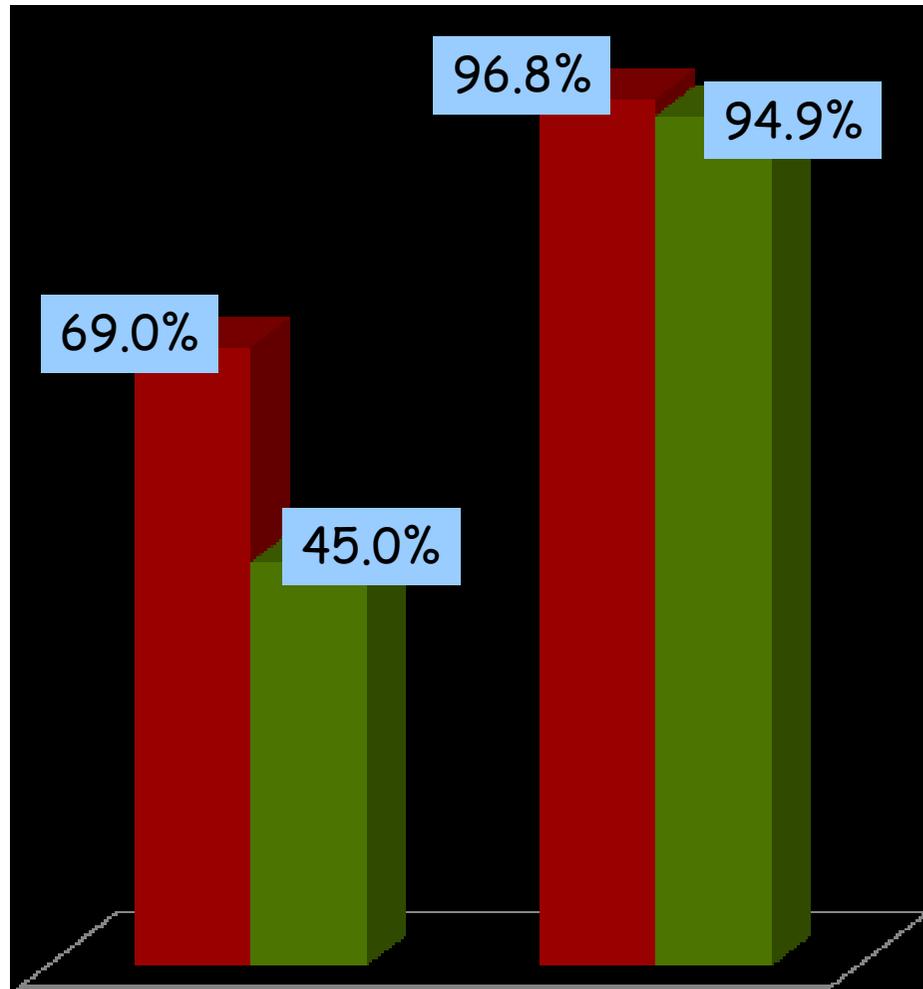


Figure 5. Geographic distribution of hepatitis C viral species.

La determinazione del genotipo è utilizzata per studi epidemiologici o, nel singolo individuo, per determinare la probabilità di risposta e la durata della terapia.



**SVR  
con genotipo IL28B**

CC

CT/TT

Genotipo 1

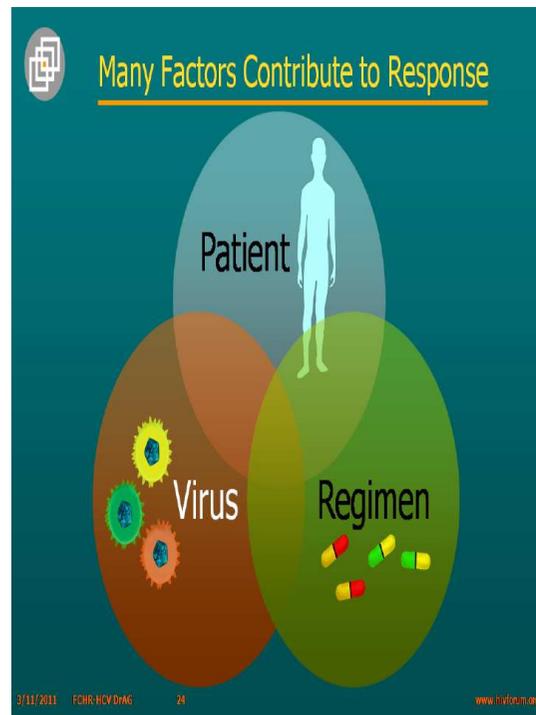
Genotipo 3

# Genotipo virale

Gli importanti progressi raggiunti nel trattamento dell'epatite cronica C hanno permesso di eradicare il virus nella maggior parte dei pazienti trattati:

circa il 40-50% dei pazienti con genotipo 1

e l'80% dei pazienti con genotipo 2 e 3 raggiungono, infatti, la risposta virologica sostenuta (SVR).



Nell'ambito del genotipo 1 la probabilità di guarire è maggiore nei pazienti con malattia più giovane e bassa carica virale rispetto ai pazienti con malattia epatica più avanzata ed alta carica virale.

I genotipi 2 e 3, più "facili" da trattare, vengono curati con solo 24 settimane di terapia, con maggiore probabilità di guarigione (70-80% dei casi nel genotipo 3 e oltre 90% nel genotipo 2).

# Genotipo 1

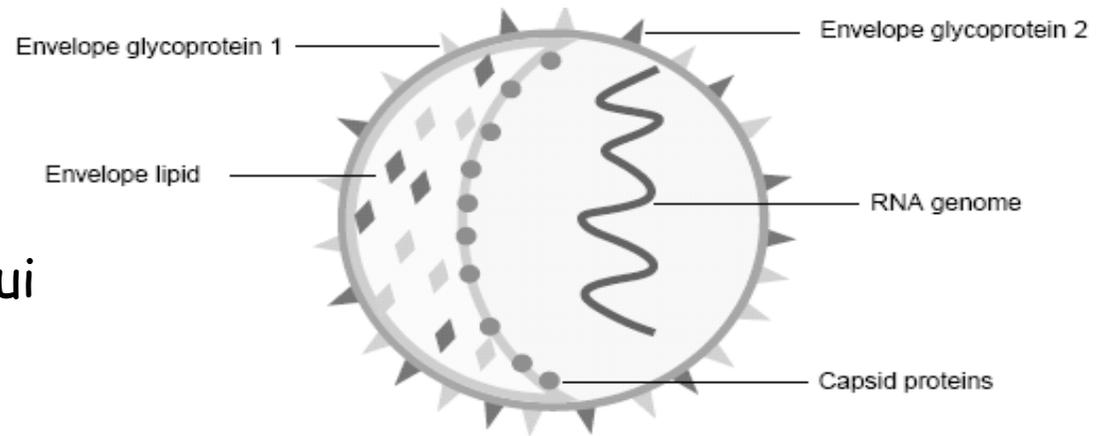
Per il genotipo 1 ed il genotipo 4 (considerati meno sensibili all'interferone) un ruolo importante nella risposta alla terapia è giocato dalla carica virale nel sangue prima di iniziare la cura: i soggetti che hanno una carica virale inferiore, pur con genotipo "sfavorevole", hanno una risposta migliore e più rapida alla terapia, arrivando anche al 70-80% di guarigione (simile quindi ai genotipi "favorevoli").



Abbreviazioni: NR, null response;  
SVR, sustained virologic response.  
(Dr. John McHutchison)

# CARICA VIRALE

Informazione accurata sui  
livelli di HCV circolante



## *Viremia (HCV RNA) qualitativa*

Il test si effettua oggi con metodica PCR, la positività documenta la replica virale: soglia di sensibilità di circa 100 copie di RNA/ml.

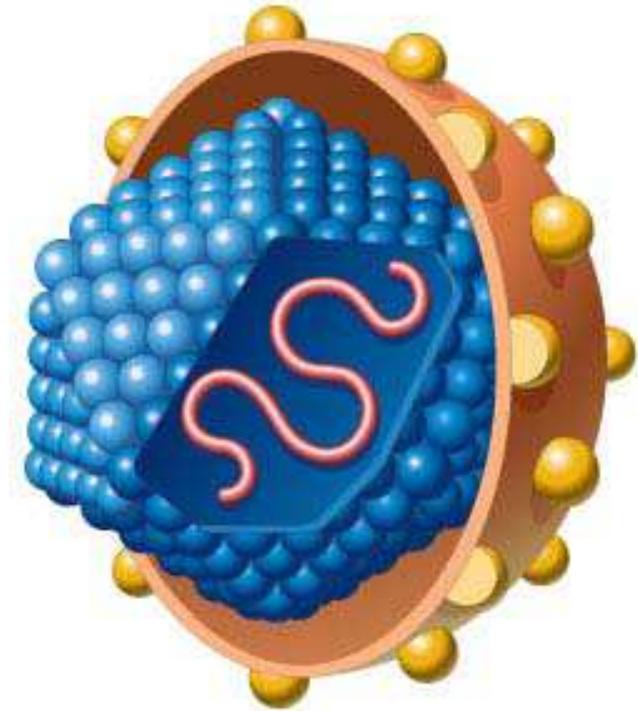
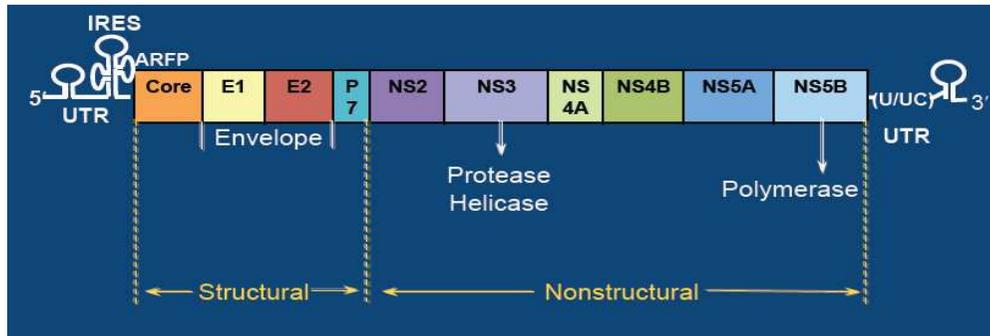
Se è positivo, viene accertata l'attività replicativa virale e non servono ulteriori determinazioni che non abbiano una precisa motivazione clinica, come ad esempio la risposta virologica precoce durante la terapia, la risposta a fine terapia e la risposta sostenuta.

Se è negativo, si tratta in genere di replica virale minima e non rilevabile, ma può trattarsi anche di guarigione, spontanea o indotta dalla terapia, pertanto è utile effettuare altri controlli a distanza. I tempi di tali controlli non sono tuttavia standardizzati.

# CARICA VIRALE

*HCV RNA:*

Test eseguito con metodiche diverse di biologia molecolare

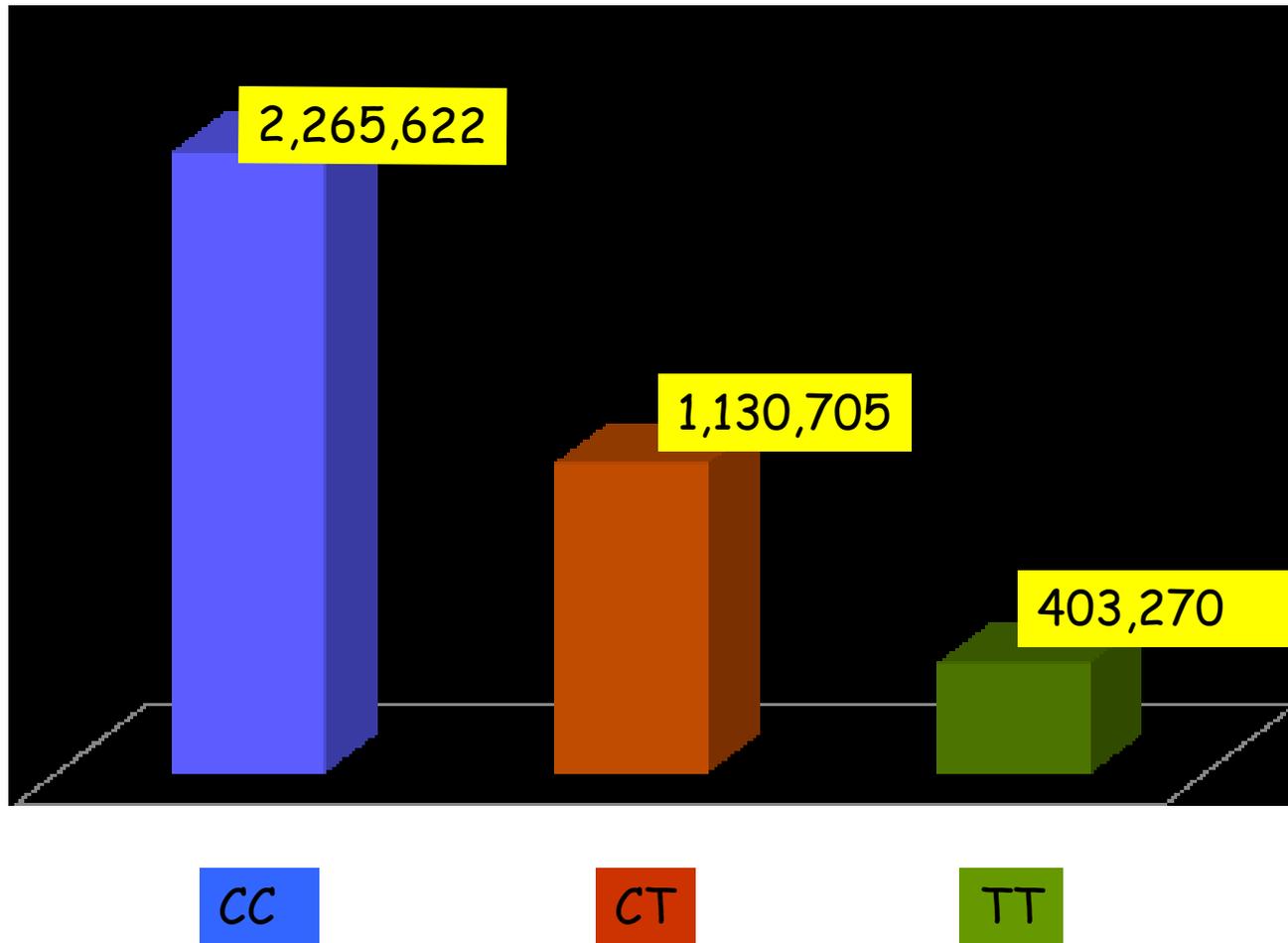


Non è accertata una correlazione tra l'HCV RNA quantitativo e la gravità istologica o la progressione della malattia.

E' invece accertato il valore predittivo di risposta della riduzione  $> 2 \log$  della carica virale dopo 12 settimane di trattamento, durante la terapia di combinazione interferon o interferon peghilato e ribavirina.

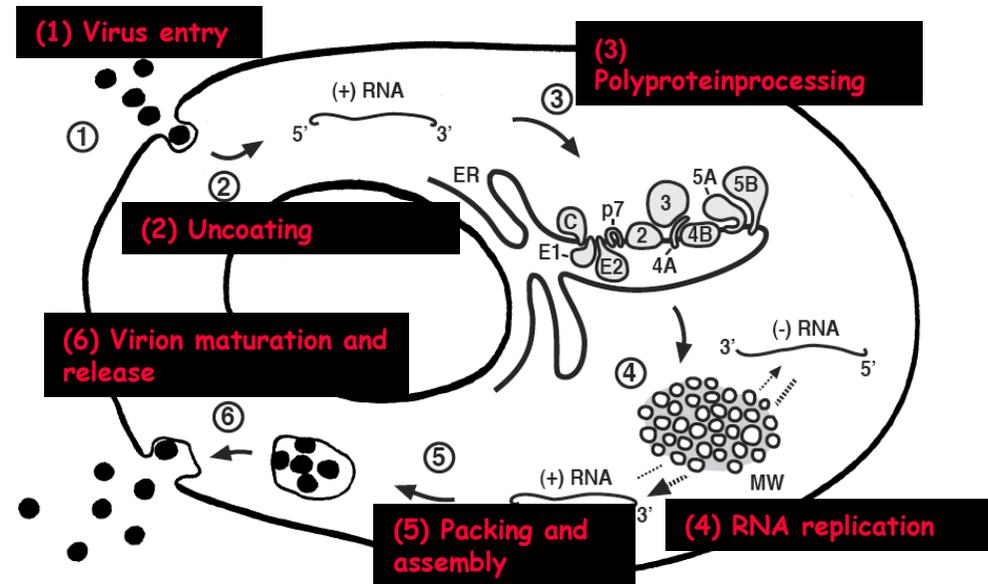
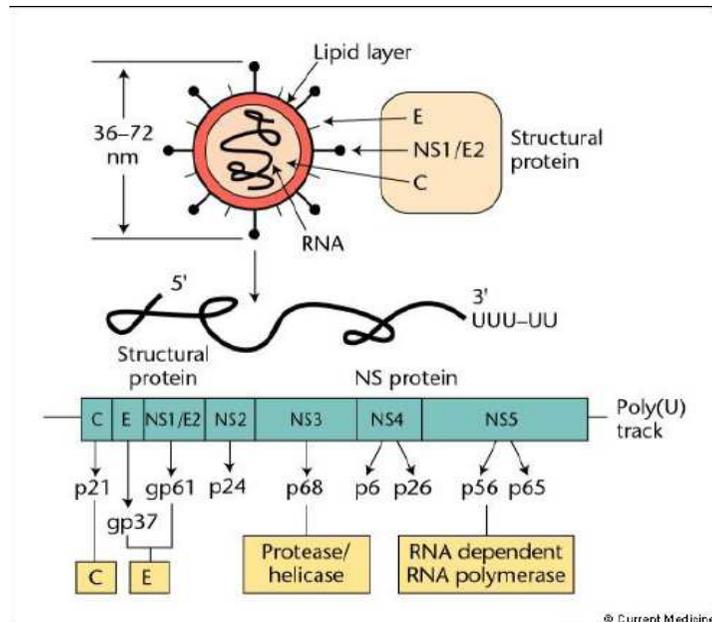
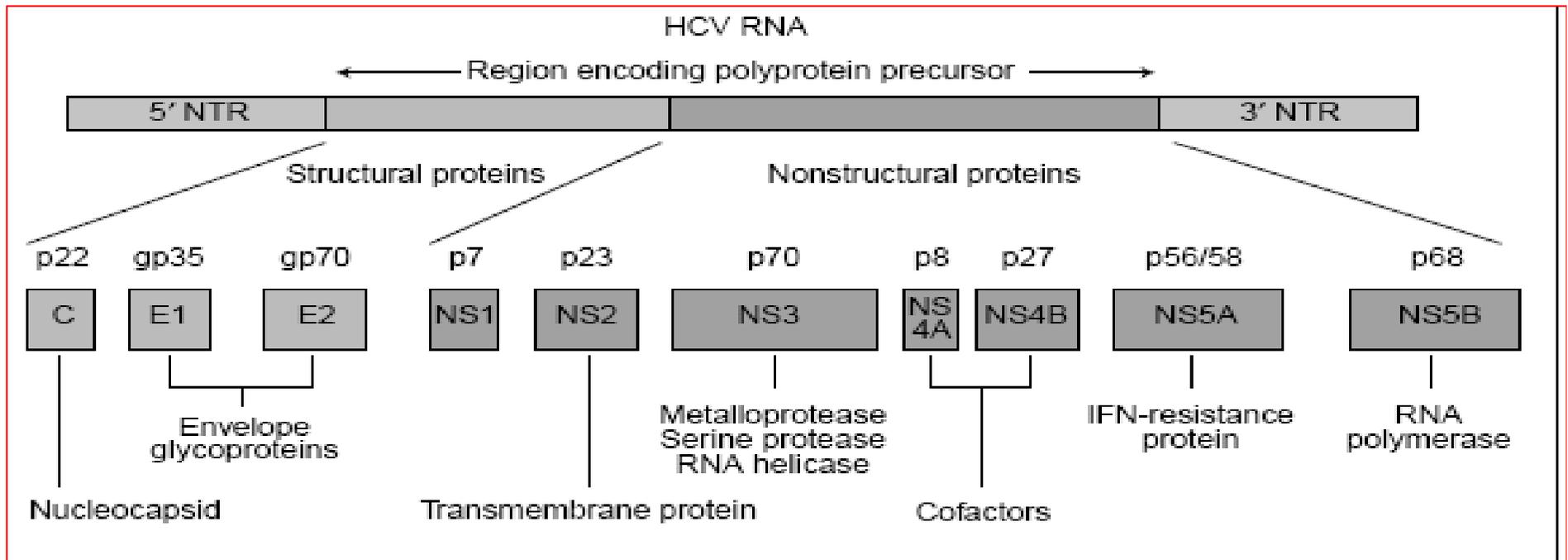
Pertanto la determinazione dell'HCV RNA quantitativo trova indicazione soltanto prima e durante la terapia dell'epatite

## HCV RNA (UI/ml) con genotipo IL28B



Pazienti con allele C (CC o CT) hanno carica virale plasmatica (HCV RNA) molto più alta dei pazienti con allele TT. La presenza dell'allele C favorisce la replicazione di HCV e potenzia la sua sensibilità alla terapia.

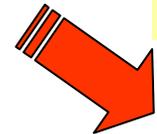
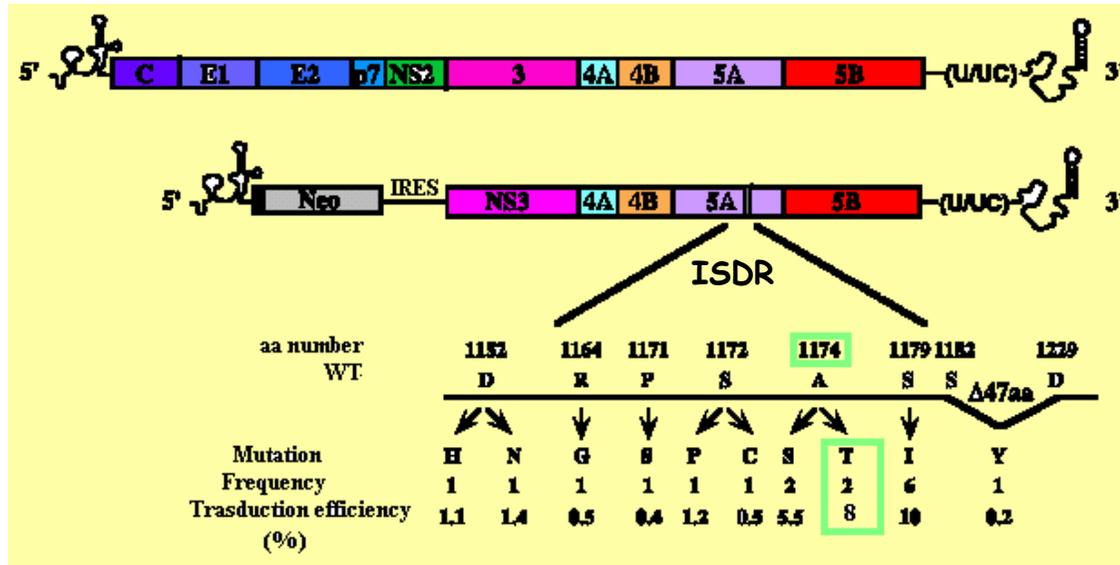
# sequenza VIRALE NS5 a e b



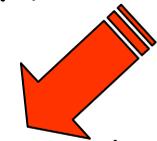
# sequenza VIRALE NS5a

Gioca un ruolo importante nella regolazione della replicazione virale e nel meccanismo di sensibilità all'interferone.

Contiene un dominio di 40 amminoacidi (2209-2248), chiamato IFN- $\alpha$  sensitivity-determining region (**ISDR**)



Attiva la trascrizione,  
interagisce con la polimerasi  
Lega singoli filamenti di RNA

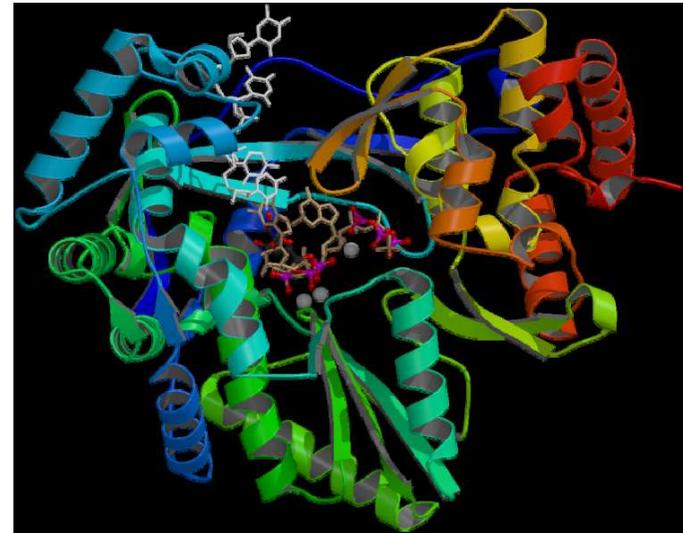
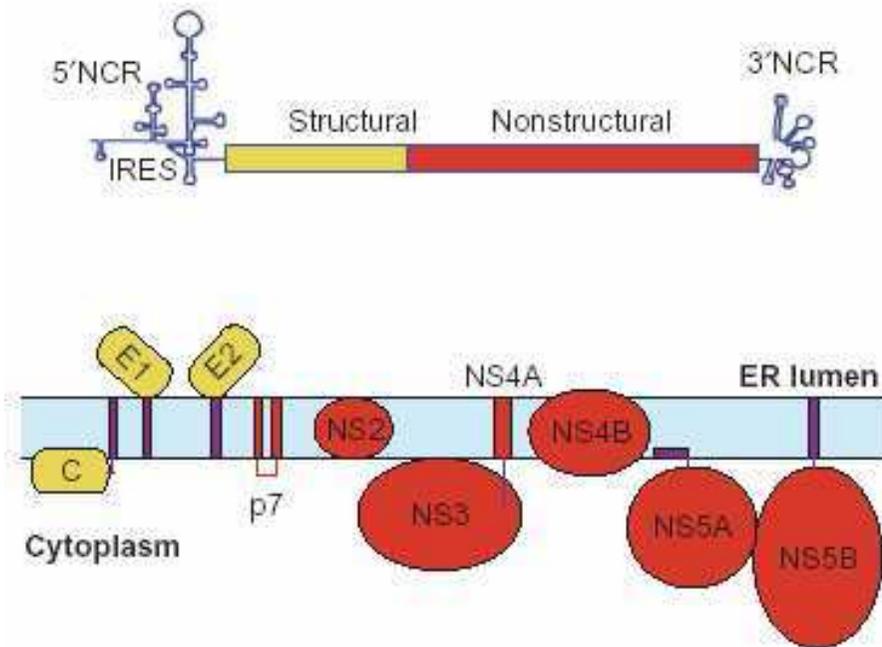


Ruolo nella risposta a terapia con IFN  
Aumentato numero di mutazioni nella regione ISDR  
correlazione positiva con SVR (sequenze ISDR *wild-type*, *intermediate-type* e *mutant-type*)

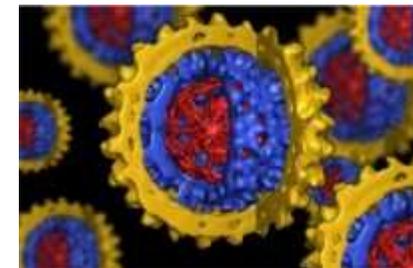
## sequenza VIRALE NS5b

Proteina non-strutturale di 591 aa,  
rappresenta la RNA polimerasi RNA-  
dipendente di HCV.

Ha un dominio idrofobico (21 aa)  
all'estremità terminale C, e i siti attivi nel  
citoplasma, con le tipiche strutture right-  
handed con palmo, pollice e dita



Possibile target  
per nuovi farmaci  
antivirali



Enomoto, N. Engl. J. Med. 1996

Schmidt-Mende, J. Immunol. Meth. 2011; J. Biol. Chem. 2001

# Quale il più importante fattore predittivo di risposta al trattamento antivirale per ciascun paziente?



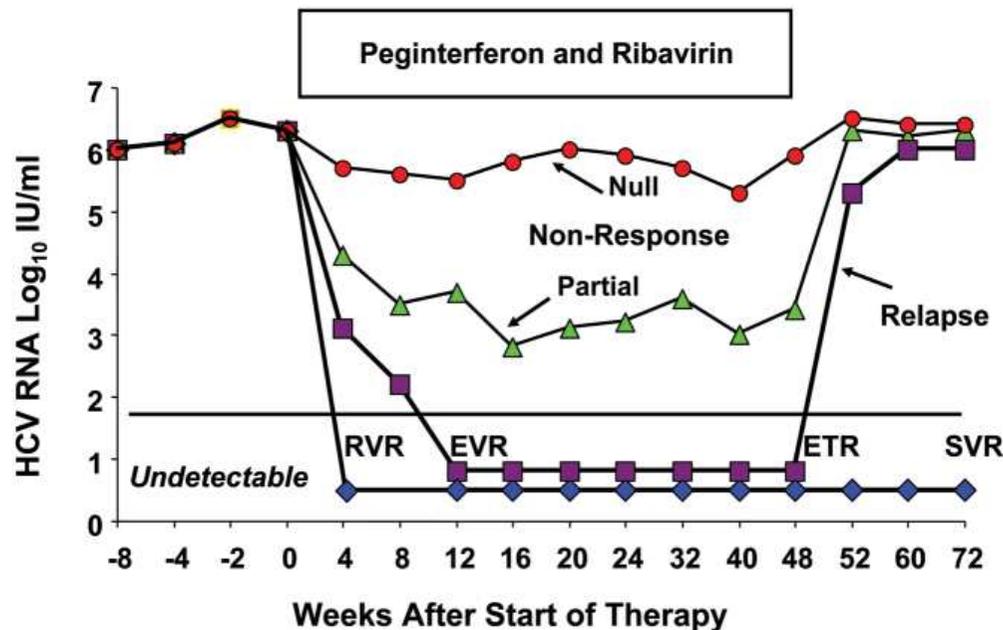
Short communication

Rapid prediction of sustained virological response in patients chronically infected with HCV by evaluation of RNA decay 48 h after the start of treatment with pegylated interferon and ribavirin

Giustino Parruti<sup>a,\*</sup>, Ennio Polilli<sup>a</sup>, Federica Sozio<sup>a</sup>, Valeria Cento<sup>b</sup>, Alessandro Pieri<sup>a</sup>, Francesco Di Masi<sup>a</sup>, Fabio Mercurio<sup>b</sup>, Monica Tontodonati<sup>a</sup>, Elena Mazzotta<sup>a</sup>, Francesca Ceccherini-Silberstein<sup>b</sup>, Lamberto Manzoli<sup>c</sup>, Carlo Federico Perno<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Infectious Disease Unit, Pescara General Hospital, Via Fonte Romana, 8 – 65124 Pescara, Italy  
<sup>b</sup> Department of Experimental Medicine, University of Rome "Tor Vergata", Rome, Italy  
<sup>c</sup> Section of Epidemiology and Public Health, University of Chieti, Italy

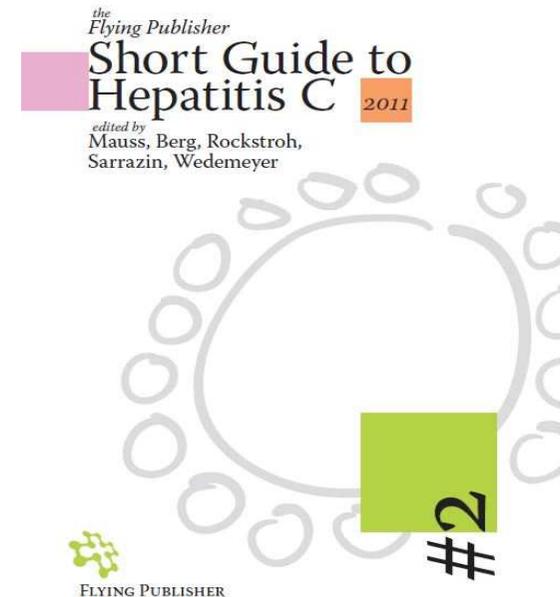
E' difficile stabilirlo



E' fondamentale predire gli effetti terapeutici prima di iniziare il trattamento

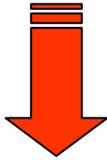
# Fattori predittivi di NON-risposta al trattamento

1. Genotipo virale (genotipo 1 e 4 più difficili di 2 e 3)
2. Discesa della viremia (HCV-RNA) alla 12 settimana di terapia < 2 log indice di scarsa risposta
3. Presenza di Fibrosi avanzata o cirrosi
4. Accumulo di ferro intraepatico
5. Coesistenza di sindrome metabolica (obesità, steatosi, diabete, ipertensione, insulino resistenza, ipertrigliceridemia)
6. Assunzione di alcool
7. Razza afro-americana
8. mancata "aderenza" alla terapia (assunzione di meno dell' 80% del dosaggio di Interferone e Ribavirina per meno dell'80% del tempo previsto di durata del trattamento)



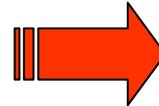
# Stabilire i predittori di risposta pretrattamento

WHERE ARE WE?



Terapia combinata:  
interferone peghilato e  
ribavirina

Genotipo 1a il +  
difficile da trattare  
Genotipo 2 e 3 SVR  
80%

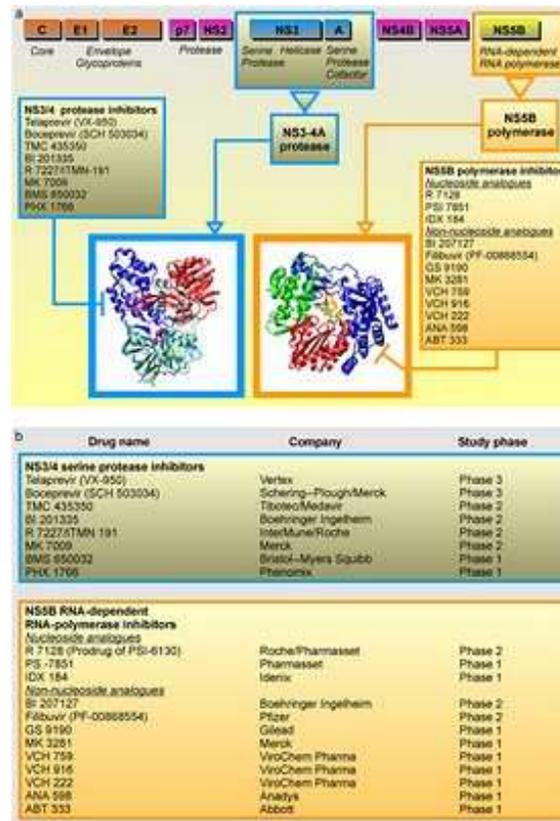


WHERE ARE WE GOING?



Nuove terapie

Specifically  
Targeted  
Antiviral Therapy  
for HCV  
(STAT-C)



If we keep doing what we've always done, we'll keep getting what we always got

# CONCLUSIONI

## i predittori di risposta pretrattamento

Minore probabilità di risposta		Più probabilità di risposta
T/T	C/T	C/C
Genotipo1		Genotipo2 e 3
>600.000IU/ml (Viral load)		<600.000IU/ml (Viral load)
Razza afro-americana		Altra razza
Maschio		Femmina
Età >40 anni		Età <40 anni

Genotipo IL28B (rs12979860)

Il genotipo IL28B CC è ora considerato il più forte predittore pretrattamento di SVR

*Induce:*

La clearance spontanea del virus

La risposta al trattamento

L'allele C (CC, CT) è correlato in maniera significativa con una più alta carica virale basale di HCV (contrariamente a quanto ci si aspetterebbe)

La decisione di trattare resta complessa  Conoscere il genotipo aiuta sia per i regimi di cura attuali sia futuri

Opportunità di individuare regimi di trattamento mirati al singolo paziente



TERAPIA  
PERSONALIZZATA



- 1- Eur J Clin Invest 2010; 40 (10):950-959
- 2- D. Ge, Nature, vol 461, September 2009
- 3- D. Thomas, Nature, vol 461, October 2009

Grazie per l'attenzione



*Stay Hungry. Stay Foolish.*  
Steve Jobs (1955 - 2011)



ERROR: undefined  
OFFENDING COMMAND: I

STACK:

```
(12)  
/Title  
( )  
/Subject  
(D:20120507131614+02'00')  
/ModDate  
( )  
/Keywords  
(PDFCreator Version 0.9.5)  
/Creator  
(D:20120507131614+02'00')  
/CreationDate  
(5317841)  
/Author  
-mark-
```