

Małgorzata Pawłowska, Anita Olczak

## LEKOOPORNOŚĆ A STOSOWANIE INHIBITORÓW PROTEAZY HCV

### HCV PROTEASE INHIBITORS AND DRUG RESISTANCE

Katedra i Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii  
Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy  
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

#### STRESZCZENIE

Skuteczność leków działających bezpośrednio na wirusy (DAAs - *directly acting antivirals*) jest ograniczona w obecności mutantów, które stwarzają ryzyko substytucji aminokwasów w obrębie białek wirusowych i zmniejszenia wrażliwości na lek. W związku z wysoką zmiennością HCV oraz jego wysoką zdolnością replikacyjną podczas leczenia inhibitorami proteazy HCV dochodzi do selekcji wariantów lekoopornych i zjawiska przełomu. W pracy przedstawiono czynniki determinujące lekooporność, metody diagnostyki lekooporności oraz metody zapobiegania.

**Słowa kluczowe:** *leczenie przw C, inhibitory proteazy HCV, lekooporność*

Wysoka zdolność replikacyjna HCV szacowana na  $10^{12}$  nowych wirionów dziennie oraz stosunkowo niska dokładność polimerazy RNA determinują wysoką częstość mutacji nukleotydów genomu HCV związanych z błędami polimerazy. W konsekwencji populacja HCV charakteryzuje się dużą zmiennością i występowaniem wielu pseudotypów (quasispecies).

Skuteczność leków działających bezpośrednio na wirusy (DAAs - *directly acting antivirals*) jest ograniczona w obecności mutantów, które stwarzają ryzyko substytucji aminokwasów w obrębie białek wirusowych i zmniejszenia wrażliwości na lek. W związku z wysoką zmiennością HCV warianty lekooporne mogą występować naturalnie w populacji HCV u osób wcześniej nie leczonych, choć w przypadku braku presji leku ich zdolność reprodukcji jest niewielka i zwykle dominuje szcep dziki. Natomiast podczas leczenia inhibitorami proteazy HCV dochodzi do selekcji wariantów lekoopornych i zjawiska przełomu (1).

W diagnostyce szcepów lekoopornych stosuje się metody analizy genotypowej i fenotypowej. Analiza genotypowa obejmuje badanie sekwencji genetycznych wirusa umożliwiając identyfikację pojedynczych lub kombinacji substytucji nukleotydów decydujących o oporności na określone leki. Metody sekwencjonowania oparte na standardowej reakcji PCR dla populacji HCV nie określają mutacji u poszczególnych wariantów ani nie wykrywają wariantów lekoopornych, jeśli stanowią one mniej niż 15-25% populacji HCV. Ma to szczególne znaczenie przy identyfikacji wariantów lekooporności u osób wcześniej nie leczonych. Odsetki wariantów obecnych przed leczeniem najczęściej nie przekraczają tej granicy i mogą być wykrywane tylko wysoce czułymi metodami. Należą do nich: sekwencjonowanie klonalne (*clonal sequencing*), które wykrywa odsetki wariantów o częstości 5% populacji HCV, sekwencjonowanie głębokie (*ultra deep sequencing*) oraz TaqMAAMA (*TaqMan mismatch amplification mutation assay*) - które wykrywa bardzo niskie ilości wariantów. Ograniczeniem tej metody jest duża liczba quasispecies HCV i możliwość polimorfizmów w pobliżu miejsca mutacji.

Treatment efficacy of DAAs is limited in the presence of HCV mutants which revealed amino-acids substitution and drug resistance. Because of the high genetic heterogeneity of HCV and its rapid replication, monotherapy with DAA agents poses a high risk for selection of resistant variants. We review the factors that determine resistance, the methods of resistance detection and strategies to avoid the selection of resistant variants.

**Key words:** *CHC treatment, HCV protease inhibitors, resistance*

Analiza fenotypowa obejmuje ocenę stężenia leku (IC<sub>50</sub>) wymaganego do zahamowania *in vitro* replikacji HCV w 50%. Określa ona zmiany wrażliwości wariantów w stosunku do szcep dzikiego (2).

Inhibitory proteazy HCV są pierwszymi lekami grupy DAAs, które utorowały drogę poglądom dotyczącym zjawiska lekooporności leków p/HCV. Niektóre z nich pomimo wysokiej zdolności supresji wirerii HCV

charakteryzuje niska bariera genetyczna lekooporności, która determinuje niższą skuteczność leczenia. Dowiedziono, że bariera genetyczna lekooporności uwarunkowana układem aminokwasów w regionach odpowiadających za lekooporność różni się w zależności od genotypów i podtypów HCV. W konsekwencji obserwuje się zróżnicowany od genotypu (np. 1a vs 1b) wpływ na zdolność replikacyjną HCV i obniżoną wrażliwość na leki. Należy dodać, że do wywołania lekooporności u zakażonych genotypem 1a HCV wystarczy zmiana jednego nukleotydu w pozycji 155 genomu HCV, podczas gdy u zakażonych genotypem 1b HCV wymagane są zmiany dwóch nukleotydów. Wyjaśnia to wyższą skuteczność inhibitorów proteazy u zakażonych genotypem 1b HCV, a też różną częstość przełomów (3).

Dotychczas w genomie HCV zidentyfikowano 6 głównych mutacji warunkujących lekooporność na inhibitory proteazy NS3 HCV, w pozycjach 36, 54, 155, 156, 168 i 170 (4). W badaniach eksperymentalnych inhibitory proteazy (telaprewir lub boceprewir) zastosowane w monoterapii powodowały szybką redukcję HCV RNA, natomiast u pacjentów z wykrywalną wiramią HCV mutanty lekooporne dominowały nad szczepem dzikim od ósmego dnia terapii (5).

Ryzyko selekcji wariantów lekoopornych związane jest z niepełną supresją replikacji HCV. Wśród czynników warunkujących te zjawiska wymienia się:

- wysoką replikację HCV oraz błędy polimerazy warunkujące zróżnicowanie populacji HCV,
- presję selekcyjną leku oraz jego barierę genetyczną w kontekście liczby mutacji niezbędnych dla rozwoju lekooporności,
- tzw. „przestrzeń replikacyjną” (*liver turnover*) – z definicji jest to przestrzeń dla nowych wariantów, której wielkość zależy od szybkości replikacji oraz liczby i proliferacji zakażonych hepatocytów. Synteza wariantów HCV jest możliwa w nie zainfekowanych hepatocytach lub w hepatocytach zakażonych typem dzikim po obniżeniu jego replikacji przez leki. W zdrowej wątrobie „obrót” hepatocytów trwa około 100 dni, natomiast w wątrobie objętej procesem zapalnym skraca się do około 10 dni. Przewagę wariantów lekoopornych nad typem dzikim HCV warunkuje zwolnienie przestrzeni replikacyjnej przez wirusy typu dzikiego.
- podatność wariantów (*viral fitness*) – efektywność replikacji wariantów lekoopornych w stosunku do replikacji szczepu dzikiego HCV. Z klinicznego punktu widzenia wariant wysoce odporny o niskiej podatności ma mniejsze znaczenie niż wariant o niższej oporności o wysokiej zdolności replikacyjnej
- czynniki gospodarza jak: adherencja, wydolność układu immunologicznego, cechy genetyczne (np. polimorfizmy pojedynczych nukleotydów - SNP),

choroby metaboliczne (6).

Jedną z metod zapobiegania/zmniejszania lekooporności jest stosowanie terapii kombinowanej lekami o różnych mechanizmach działania wpływającymi zarówno na warianty lekooporne jak i typ dziki HCV. Te warunki spełnia terapia pegylovanym interferonem, rybawiryną i inhibitorem proteazy. Porównanie kinetyki wirerii szczepu dzikiego i wariantów lekoopornych na modelu doświadczalnym jednoznacznie potwierdziło zasadność terapii trójlekowej. Zastosowanie tej terapii umożliwi uzyskanie największego sukcesu terapeutycznego. Dominująca populacja szczepu dzikiego HCV jest skutecznie hamowana pod wpływem pegylovanego interferonu, rybawiryny i inhibitora proteazy doprowadzając do eliminacji wirerii. Pozostające w mniejszości warianty lekooporne są wrażliwe na pegylowany interferon i rybawirynę. W efekcie uzyskujemy wyleczenie u większości zakażonych HCV. U pacjentów z przełomem inhibitor proteazy powinien zostać odstawiony, co zapobiega dalszej ewolucji szczepów lekoopornych. Przerwanie leczenia antywirusowego usuwa presję selekcyjną leku, pozwalając populacji szczepu dzikiego HCV zastąpić mniej podatne warianty lekooporne, które po 2 latach po przerwaniu leczenia były niewykrywalne (7,8).

Niewątpliwie lekooporność nie jest jedyną przyczyną nieskuteczności nowoczesnej trójlekowej terapii pzw C. *Vierling* i wsp. na podstawie badań przeprowadzonych u 212 pacjentów, którzy nie uzyskali SVR podczas terapii trójlekowej PegIFN, rybawiryną i boceprewirem wykazali obecność wariantów lekoopornych tylko u połowy z nich (9).

Zapobieganie lekooporności DAAs obejmuje stosowanie terapii skojarzonej dwoma DAAs, PegIFN i rybawiryną, unikanie stosowania DAAs u pacjentów z wysoką szansą uzyskania SVR w terapii dwulekowej (pacjenci z niską wiramią wyjściową uzyskujący RVR, posiadający allel CC genotypu IL-28B) oraz monitorowanie kinetyki wirerii HCV i adherencji pacjenta podczas terapii.

## PIŚMIENNICTWO

1. Kieffer TL, Kwong AD, Picchio GR. Viral resistance to specifically targeted antiviral therapies for hepatitis C (STAT-C). *J Antimicrob Chemother* 2010;65:202-212.
2. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients with Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology* 2010;138:447-462.
3. Pawlotsky JM. Treatment Failure and Resistance with Direct-Acting Antiviral Drugs Against Hepatitis C Virus. *Hepatology* 2011;53:1742-1751.
4. Lange CM, Sarrazin C, Zeuzem S. Review article: specifically targeted anti-viral therapy for hepatitis C - a new

- era in therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;32(1):14-28.
5. Halfon P, Locarnini S. Hepatitis C virus resistance to protease inhibitors. *J Hepatol* 2011;55:192-206.
  6. Chevaliez S, Asselah T. Mechanisms of non-response to antiviral treatment in chronic hepatitis C. *Clin Res Hepatol Gastroenterol* 2011;35:S31-S41.
  7. Zeuzem S, Sulkowski MS, Zoulim F, i in. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis C treated with telaprevir in combination with peginterferon alpha2a and ribavirin: interim analysis of the EXTEND study. *Hepatology* 2010;52 (Suppl.1):434A
  8. Vierling JM, Ralston R, Lawitz EJ, i in. Long-term outcomes following combination treatment with boceprevir plus pegIntron/ribavirin in patients with chronic hepatitis C, genotype 1 HCV. *J Hepatol* 2010;52(Suppl.1):S470.
  9. Vierling JM, i in. Frequencies of resistance-associated amino acid variants following combination treatment with boceprevir plus PEGINTRON (peginterferon alfa-2b)/ribavirin in patients with chronic hepatitis C (CHC), genotype 1 (G1) [abstract 801]. *Hepatology* 2010;52(Suppl 1):702A.

Otrzymano: 1.12.2011 r.

Zaakceptowano do druku: 27.12.2011 r.

**Adres do korespondencji:**

Dr hab.med. Małgorzata Pawłowska, prof. UMK  
Katedra Chorób Zakaźnych i Hepatologii CM UMK  
ul. Floriana 12, 85-030 Bydgoszcz  
e-mail: kikchzak@cm.umk.pl