

Piotr Ząbek^{1*}, Jolanta Opoka-Kegler², Magdalena Baka², Tomasz Dyda¹, Grzegorz P. Stańczak¹,
Janusz J. Stańczak¹

CZĘSTOŚĆ WYSTĘPOWANIA MUTANTÓW HCV OPORNYCH NA INHIBITORY PROTEAZY U POLSKICH PACJENTÓW ZAKAŻONYCH GENOTYPEM 1 WIRUSA HCV*

¹Pracownia Diagnostyki Molekularnej, Wojewódzki Szpital Zakaźny w Warszawie

²Poradnia Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego
w Warszawie

STRESZCZENIE

CEL. Celem badania było oszacowanie częstości występowania wariantów wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) noszących mutacje warunkujące obniżenie wrażliwości na inhibitory proteazy (Boceprevir/Telaprevir) wśród pacjentów nieleczonych, zakażonych HCV genotypem 1.

MATERIAŁ I METODA. Zastosowano metodę sekwencjonowania populacyjnego, z interpretacją wyników wstępnych dostępną w Internecie algorytmem geno2pheno. Przebadano 91 próbek surowicy uzyskanych od pacjentów Przychodni Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie, zakażonych HCV genotypem 1.

WYNIKI. Sekwencjonowanie regionu NS3 kodującego proteazę było skuteczne w 85 z 91 próbek. Siedemdziesiąt trzy (85,9%) z 85 surowic zawierały szczep dziki HCV; w 12 (14,1%) próbkach wykryto mutacje związane z klinicznie obserwowaną obniżoną wrażliwością na Boceprevir/Telaprevir.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI. Uzyskane wyniki udowadniają obecność szczepów HCV noszących mutacje związane z opornością na inhibitory proteazy wśród polskich pacjentów, uprzednio nie leczonych. Mutanty HCV odporne na te leki wykryto w 14,1% próbek.

Wskazane są dalsze obserwacje oceniające oddziaływanie istniejących lub pojawiających się mutacji HCV warunkujących oporność na terapię trójlekową u pacjentów.

Słowa kluczowe: HCV, boceprevir, telaprevir, mutanty lekooporne

WSTĘP

Przewlekłe zapalenie wątroby typu C jest jednym z głównych problemów zdrowia publicznego na całym świecie. Według szacunków WHO, ponad 170 mln ludzi jest zakażonych wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV), a każdego roku przybywa 3 mln nowo zakażanych osób (1). Samoistne wyleczenie ostrego zapalenia wątroby wywołanego przez HCV jest rzadkie i zależy zarówno od cech gospodarza jak, i wirusa, u około 70% pacjentów infekcja przechodzi w stan przewlekły (2). Nieleczona infekcja HCV może prowadzić do przewlekłej choroby wątroby, marskości lub raka wątrobowo-

komórkowego i jest główną przyczyną transplantacji wątroby (3). Do roku 2011 standardowy schemat terapii opierał się na leczeniu skojarzonym pegylowanym interferonem α (Peg-IFN- α) i rybawiryną (RBV); długość leczenia wynosiła od 16 do 72 tygodni w zależności od genotypu wirusa, początkowej wirerii, szybkiej (RVR) i wczesnej odpowiedzi wirusowej (ERV) (4). Tylko około 50% pacjentów zakażonych HCV genotypem 1 lub 4 osiągało trwałą odpowiedź wirusową (SVR), zaś w przypadku genotypów 2 i 3 odsetek ten wynosił 85%. Ponadto, leczenie Peg-IFN- α i RBV powoduje liczne niekorzystne efekty uboczne: gorączkę, niedokrwistość czy depresję (5). Kliniczne obserwacje połączone z do-

*Badania częściowo sponsorowane przez Fundację Rozwoju Nauki przy Wojewódzkim Szpitalu Zakaźnym w Warszawie.

świadczeniem uzyskanym w czasie leczenia zakażenia HIV pozwoliły na zaprojektowanie nowych klas leków przeciw HCV.

W 2011 r. nowe leki z klasy inhibitorów NS3/4A proteazy (PIs) – boceprewir (BOC) i telaprewir (TPV) – zostały zatwierdzone przez Urząd ds. Żywności i Leków (FDA), a niedługo potem przez Europejską Agencję ds. Leków, do leczenia pacjentów zakażonych HCV genotypem 1. Wyniki badań klinicznych udowodniły, że dodanie BOC lub TPV do standardowego schematu terapii zwiększa odsetek SVR do ok. 70% wśród pacjentów uprzednio nieleczonych, zakażonych HCV genotypem 1 (6, 7). Stosowanie różnych leków przeciwwirusowych jest konieczne ze względu na szybką selekcję wariantów opornych na inhibitory proteazy podczas monoterapii (8). Analiza genomu HCV ujawniła, że szczepy niosące mutacje związane z obniżoną wrażliwością na inhibitory proteazy są obecne jako warianty mniejszościowe, obecne przed rozpoczęciem leczenia, a nie powstają *de novo* podczas replikacji w czasie leczenia (9, 10). Wysoka różnorodność genetyczna HCV może prowadzić do wyłonienia się pierwotnych lub pojawiających się w trakcie leczenia mutacji warunkujących oporność. Ponadto, wysokie tempo replikacji HCV i brak zdolności korekcyjnej wirusowej RNA-zależnej polimerazy RNA powoduje nagromadzenie się różnych subpopulacji wirusa, tzw. *quasispecies*, w zakażonym organizmie (11).

Dotychczas zidentyfikowano kilkanaście mutacji w regionach NS3 i NS4 mających wpływ na wrażliwość HCV na TPV i/lub BOC. Najistotniejsze klinicznie są mutacje V36A, T54A, R155K i A156V/S, warunkujące wysoką oporność HCV na zatwierdzone lub testowane inhibitory proteazy (12). Obecność zmian genetycznych związanych z lekoopornością może ograniczać stosowanie pierwszych zatwierdzonych inhibitorów proteazy.

Celem tego badania było określenie częstości występowania w Polsce pierwotnej oporności na inhibitory proteazy pośród pacjentów zakażonych HCV genotypem 1 uprzednio nieleczonych.

MATERIAŁ I METODY

Zbadano 91 próbek surowic uzyskanych od pacjentów z przewlekłym wzw C, będących pod opieką Poradni Chorób Zakaźnych i Pasożytniczych Wojewódzkiego Szpitala Zakaźnego w Warszawie. Pacjenci pochodzą z różnych regionów Polski, ich średni wiek wynosił 48 (od 14 do 72) lat, 51 (56%) z nich to kobiety. Pacjenci włączeni do badania byli zakażeni HCV genotypem 1; w 100% subtyp 1b. Średni poziom wirēmii wynosił 5,62 log IU/ml (od 2,62 do 6,99 log IU/ml). Żaden z pacjentów nigdy nie był poddany leczeniu Peg-IFN+RBV, bez lub z inhibitorami proteazy. Wartość wirēmii HCV

była oznaczana przy użyciu automatycznego systemu m2000sp/m2000rt (Abbott Molecular, IL, USA) i testu RealTime HCV (Abbott Molecular, IL, USA); jego limit wykrywalności (LOD) wynosi 1,08 log IU/ml, a górny limit policzalności – 8,00 log IU/ml.

Genotyp HCV został oznaczony przy użyciu zestawu Versant HCV Genotype LiPa Assay (Siemens, Niemcy). RNA HCV został wyizolowany z surowicy przy wykorzystaniu kolumn wirowniczych (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche, Szwajcaria). RT-PCR przeprowadzono w cyklerze cieplnym 2720 Thermal Cycler (Life Technologies, NY, USA) według następującego profilu termicznego: odwrotna transkrypcja w 52°C przez 30 min, denaturacja w 94°C przez 2 min, następnie 40 cykli: 94°C przez 15 sek., 55°C 30 sek. i 68°C przez 90 sek.; końcowa elongacja - 5 min w 68°C. Amplifikacja i sekwencjonowanie regionu NS3 HCV zostały wykonane z wykorzystaniem primerów oligonukleotydowych zsyntetyzowanych według *Bartels DJ i wsp.* (9). Primery te umożliwiły powielenie fragmentu regionu NS3A o długości 890 par zasad; ilość produktu PCR była analizowana elektroforetycznie w żelu agarozowym. Reakcję sekwencjonowania przeprowadzono w następujących warunkach: 25 cykli w 96°C przez 10 sek., 50°C przez 5 sek. i 60°C przez 55 sek. Sekwencjonowanie wykonano z użyciem 3100-Avant Genetic Analyzer (Life Technologies, NY, USA); uzyskane sekwencje przeanalizowano programem SeqScape v.2.7 (Life Technologies, NY, USA). Ostatecznie, do interpretacji wyników posłużył algorytm *geno2pheno* (najnowsza dostępna wersja w czasie analizy), wartość odcięcia parametru krotności zmiany ustawiono na 2,0.

WYNIKI

Sekwencjonowanie populacyjne regionu NS3 kodującego domenę katalityczną proteazy było udane w 85 na 91 próbek. W 6 próbkach nie uzyskano produktu amplifikacji lub uzyskane sekwencje były niskiej jakości. Siedemdziesiąt trzy próbki (85,9%) z 85 zawierały szczep dziki wirusa, żadne mutacje warunkujące oporność nie zostały wykryte według algorytmu *geno2pheno*. W 12 (14,1%) próbkach wykryto mutacje związane z klinicznie obserwowaną obniżoną wrażliwością na inhibitory proteazy. Pięć (5,88%) spośród tych mutantów posiadało zmianę D168E, 2 (2,35%) szczepy - A87T, obie odpowiedzialne za oporność na BOC; kolejne 2 (2,35%) - mutację T54S warunkującą możliwą oporność na TPV. W pozostałych trzech izolatach wykryto: mutacje R117H (2 izolaty-2,35%) oraz V55A (1 izolat- 1,17%). Warunkują one obniżoną wrażliwość na oba inhibitory proteazy. Żaden z wykrytych wariantów nie niósł więcej niż jednej mutacji związanej z lekoopornością.

DYSKUSJA

Rozwój nowych leków przeciwwirusowych działających bezpośrednio na cykl życiowy patogenów wirusowych jest wielkim osiągnięciem przemysłu farmaceutycznego. Wprowadzenie nowych związków umożliwiło skuteczną kontrolę replikacji klinicznie istotnych wirusów przenoszonych drogą krwi – HIV, HBV, a obecnie także HCV. Szybko po wprowadzeniu tych leków, podobnie jak w zakażeniach bakteryjnych, rozpoznano nowy problem – tworzenie, selekcję i transmisję wirusowych wariantów genetycznych z obniżoną wrażliwością lub opornością na leki. Zastosowanie inhibitorów proteazy w leczeniu przewlekłego wzw C zwiększa odsetek pacjentów z SVR. Istnieje jednak ryzyko niepowodzenia terapii, spowodowane obecnością transmitowanych lub powstających *de novo* lekoopornych wariantów genetycznych HCV. Celem tego badania było określenie częstości występowania w Polsce pierwotnej oporności na inhibitory proteazy wśród pacjentów uprzednio nieleczonych zakażonych HCV genotypem 1.

Przedstawione wyniki dokumentują obecność szczepów HCV, niosących mutacje związane z lekoopornością, wśród polskich pacjentów uprzednio nieleczonych. Częstość występowania lekoopornych wariantów HCV w badanej grupie wynosi 14,1%. Liczba zbadanych próbek i obecność pacjentów z różnych regionów Polski pozwala traktować uzyskane wyniki jako reprezentatywną próbę.

Częstość występowania wariantów genetycznych z obniżoną wrażliwością lub opornością na inhibitory proteazy jest podobna do przedstawionej w badaniu *Vicenti i wsp.* (13). Inne badania wykazują niższy odsetek lekoopornych szczepów HCV (10). Rozbieżności te mogą być wynikiem różnic w badanych grupach pacjentów – liczbą pacjentów, czasem trwania infekcji, przeniesieniem szczepów lekoopornych, położeniem geograficznym.

Wysoka częstość występowania szczepów HCV naturalnie opornych na leki jest czynnikiem ryzyka niepowodzenia wirusowego (brak obniżenia wirēmii w czasie terapii) w czasie przyszłego leczenia. Zalecane schematy leczenia przeciwwirusowego, zawierające BOC lub TPV, sugerują użycie inhibitorów proteazy przez krótki czas – taki rygor postępowania zapobiega kumulowaniu mutacji.

Potrzeba rutynowego oznaczania lekooporności HCV jest ciągle dyskutowana. Głównym powodem tego są sprzeczne doniesienia o znaczeniu klinicznym mutacji warunkujących lekooporność oraz fakt, że materiał genetyczny HCV nie jest archiwizowany w zakażonych komórkach, inaczej, niż w przypadku HBV czy HIV. Taka sytuacja umożliwia ponowne leczenie pacjentów z niepowodzeniem wirusowym tym samym zestawem leków, gdy szczepy oporne zostaną zastąpione przez populację wrażliwą. Testowanie lekooporności może być przydatne u niektórych grup pacjentów np. nieodpowiadających na leczenie (*non-responders*), z nawrotem wirēmii po leczeniu (*relapsers*) czy też z niekorzystnym polimorfizmem IL-28b, co zostało uwzględnione przez grupę ekspertów z forum HCV DRAG (HCV Drug Development Advisory Group) w zaleceniach dotyczących różnych aspektów monitorowania lekooporności HCV (14).

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Wyniki przeprowadzonych badań udowadniają obecność szczepów HCV niosących mutacje związane z lekoopornością wśród polskich pacjentów uprzednio nieleczonych.
Mutanty HCV oporne na BOC i TPV wykryto w 14% badanych próbek.
2. Obecnie, z powodu braku wystarczających informacji, dalsze i nieprzerwane obserwacje są niezbędne, by ocenić oddziaływanie istniejących lub pojawiających się mutacji warunkujących oporność na wynik kliniczny u pacjentów poddanych terapii trójlekowej.

Otrzymano: 9.04.2013 r.

Zaakceptowano do druku: 15.06.2013 r.

Adres do korespondencji:

Piotr Ząbek

Pracownia Diagnostyki Molekularnej

Wojewódzki Szpital Zakaźny

ul. Wolska 37, 01-201 Warszawa

Tel.: +48 22 33 55 278

e-mail: pzabek@zakazny.pl