

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE

Ciclo XXVIII

Settore Concorsuale di afferenza: 06/B1

Settore Scientifico disciplinare: MED 09

TERAPIA CON ANTIVIRALI AD AZIONE DIRETTA
IN PAZIENTI CON EPATITE CRONICA HCV E
SEVERA FIBROSI O CIRROSI

Presentata da: **Dr. Giovanni Vitale**

Coordinatore Dottorato

Relatore

Prof. Lucio Cocco

Dr.ssa Annagiulia Gramenzi

Esame finale anno 2016

INDICE

1. PARTE INTRODUTTIVA

- 1.1 Epatopatia cronica HCV:
 - storia della terapia, dagli interferoni ai *Direct Acting Antivirals* *pg 2*
- 1.2 *Direct Acting Antivirals*
 - 1.2.1 Infezione HCV e replicazione *pg 7*
 - 1.2.2 Classi di DAA *pg 12*
- 1.3 Inibitori delle proteasi NS3/4a di prima generazione
 - 1.3.1 Telaprevir *pg 14*
 - 1.3.2 Simeprevir *pg 19*
- 1.4 Inibitori nucleosidici della RNA polimerasi NS5B
 - 1.4.1 Sofosbuvir *pg 22*

2. PARTE SPERIMENTALE

- 2.1 Premessa *pg 24*
- 2.2 Pazienti e metodi *pg 25*
- 2.3 Risultati *pg 33*
- 2.4 Discussione *pg 42*

Bibliografia *pg 46*

1. PARTE INTRODUTTIVA

1.1 EPATOPATIA CRONICA HCV:

STORIA DELLA TERAPIA, DAGLI INTERFERONI AI DAA

Circa il 3% della popolazione mondiale (130-170 milioni di persone) è cronicamente infetta dal virus dell'epatite C (HCV). Negli USA, dove si stima che da 2,7 a 3,9 milioni di individui abbiano contratto il virus, l'epatite C è la più comune infezione virale trasmessa per via ematica. La sua prevalenza sorpassa quella dell'HIV (1,1 milioni) e dell'epatite B (0,8-1,4 milioni), messe assieme [1]. L'epatite C è l'unica infezione cronica che può essere eradicata definitivamente con la terapia antivirale giacché, a differenza di quanto accade per HIV e HBV, i suoi acidi nucleici non si integrano con il genoma ospite. Poiché il suo decorso è spesso asintomatico, circa il 75% dei pazienti sono ignari dell'infezione fino a quando la malattia non sviluppa le complicanze della cirrosi ovvero l'epatocarcinoma. L'infezione HCV rappresenta la principale causa di malattia cronica di fegato in grado di condurre alla morte del paziente nei paesi industrializzati occidentali e in Giappone. Tra il 1996 e il 2006 la prevalenza della cirrosi HCV-relata è raddoppiata e i casi di epatocarcinoma sono aumentati addirittura di venti volte. Sebbene sia una malattia in prima istanza epatica, essa spesso si associa a diabete, disordini linfoproliferativi (incluso il linfoma non Hodgkin), depressione, disturbi cognitivi, artropatie e *sindrome secca* [1]. Per le considerazioni sopra esposte, ridurre i tassi d'infezione attraverso la prevenzione da un lato, e attraverso la diagnosi e il trattamento dall'altro, rappresenta una delle necessità principali della sanità pubblica mondiale. L'obiettivo più importante è quello della prevenzione primaria ma ad oggi non è ancora disponibile un vaccino efficace. La terapia dell'epatite cronica C rappresenta invece il prototipo della medicina personalizzata ed è in continuo divenire, a causa dei rapidissimi progressi della ricerca in tale ambito. L'*endpoint* utilizzato per determinare il successo della terapia è la *sustained virologic response* (SVR), definita come assenza di HCV-RNA sierico 12 settimane dopo la fine del trattamento.

Nei primi anni '90 la terapia basata su interferone ha rappresentato lo *standard* di cura: tale regime aveva delle percentuali di successo del 6% ed era accompagnato da frequenti effetti collaterali che portavano spesso all'interruzione del trattamento. Dall'inizio degli anni 2000 le formulazioni peghilato di interferone (pegIFN), combinate con un analogo della guanosina ovvero la ribavirina (RBV), hanno preso il posto dell'interferone standard, risultando più tollerate e più sicure.

La farmacocinetica dell'interferone, che richiedeva 3 somministrazioni settimanali con la formulazione standard, venne quindi migliorata passando ad un'unica somministrazione settimanale; sebbene siano disponibili in commercio 2 differenti tipi di PegIFN, l'alfa-2a e l'alfa-2b, efficacia e tollerabilità sono sostanzialmente sovrapponibili.

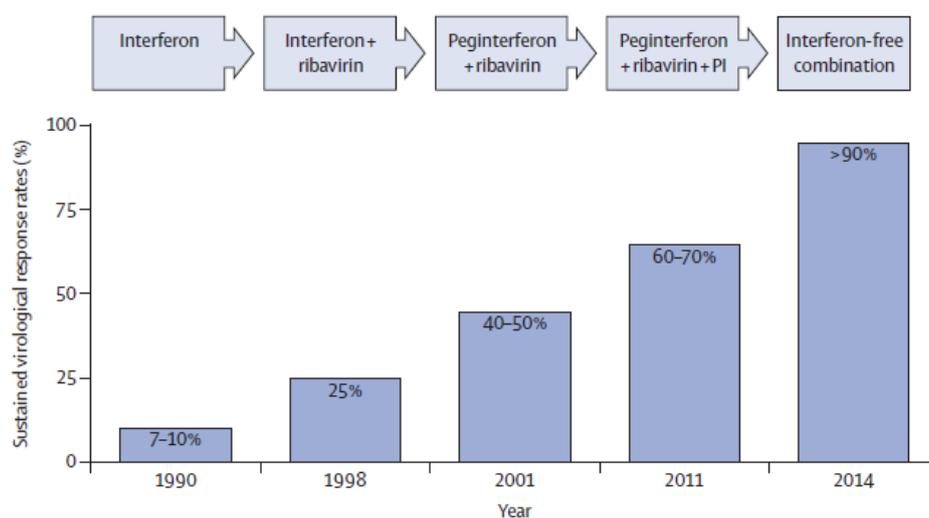
Controindicazioni alla terapia interferonica sono rappresentate da scompenso dell'epatopatia, depressione e psicosi non controllate dalle terapie farmacologiche, epilessia, aritmie cardiache, malattie autoimmuni. Eventi avversi frequenti sono rappresentati, oltre a quelli citati sopra, da piastrinopenia e leucopenia da mieloinibizione, sindrome simil-influenzale con cefalea, febbre e artralgie, suscettibilità alle infezioni.

L'utilizzo della RBV, il cui dosaggio viene regolato sulla base del peso corporeo del paziente e del genotipo virale, ha rappresentato poi un caposaldo delle terapie passate ed è compresa in molti dei regimi attuali [2].

Limiti all'utilizzo della RBV sono invece rappresentati dall'insufficienza renale cronica, dalla cardiopatia ischemica, precipitata dalla potenziale anemia emolitica indotta dal farmaco, e dall'impossibilità di effettuare una contraccezione efficace, stante la sua documentata azione teratogena.

A maggio 2011, il trattamento standard dell'epatite C era quindi rappresentato dall'associazione pegIFN/RBV per un periodo variabile da 24 a 48 settimane, a seconda del genotipo virale [3]. Comunque meno della metà dei pazienti affetti da genotipo 1, il più comune negli USA (prevalenza del sottotipo 1a) e in Europa (prevalenza del sottotipo 1b), raggiungevano l'SVR con la terapia pegIFN/RBV. I tassi di SVR si aggiravano attorno al 50% in Europa e al 40% negli USA. L'avvento e la successiva approvazione dei *Direct Acting Antivirals* (DAA) ha inaugurato una nuova era per quanto riguarda il trattamento dell'epatite C. Contrariamente all'azione non specifica sul virus delle terapie a base di interferone, i DAA agiscono direttamente su componenti proteiche coinvolte nella replicazione virale. Le

principali classi sono gli inibitori della proteasi NS3/4A, gli inibitori dell'NS5A, e gli inibitori della polimerasi NS5B. Gli inibitori delle proteasi inizialmente approvati nel maggio 2011 dalla *Food and Drugs Administration* (FDA), telaprevir (TVR) e boceprevir (BOC), hanno condotto a un incremento dell'efficacia, quando combinati con pegIFN/RBV, ma si sono resi responsabili di nuovi eventi avversi in aggiunta a quelli storicamente dovuti alla terapia classica con pegIFN/RBV [4]. Si è passati da tassi di SVR inferiori al 10% della monoterapia con interferone alfa di fine anni '90 a quelli superiori al 75% nei pazienti *naive* con genotipo 1, e compresi tra il 30 e il 70% nei pazienti precedentemente trattati con pegIFN/RBV [2]. Lo studio del genotipo dell'IL28B nei pazienti sottoposti a triplice terapia [5] ha permesso in questa fase di evidenziare risposte virologiche meno precoci e più basse nei pazienti con genotipo C/T o T/T rispetto a quelli con genotipo C/C, consentendo di individuare le categorie di ammalati che più avrebbero beneficiato di questa combinazione: nei pazienti *naive*, infetti da genotipo 1, i tassi di SVR oscillavano dall'82% al 55% nel gruppo BOC a seconda del genotipo (rispettivamente CC e TT) mentre variavano dal 90 al 73% nel gruppo TVR [6]. Nella figura 1 è riportata la storia dei trattamenti antivirali con i rispettivi tassi di SVR mentre nella figura 2 viene focalizzata l'attenzione sui cosiddetti regimi *interferon free* [7]. Da marzo 2015 il TVR non è più prescrivibile mediante il Sistema Sanitario Nazionale stante la messa in commercio di nuovi DAA, più efficaci e più tollerati anche perché combinabili all'interno di protocolli liberi da interferone.



Webster DP et Al. 2015

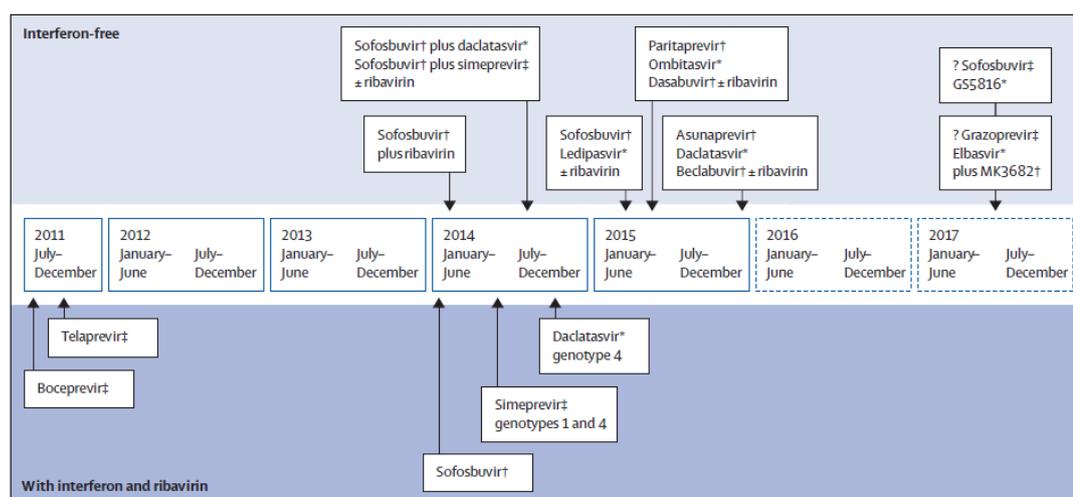
Figura 1

Storia del trattamento antivirale e rispettivi tassi di SVR

La seconda ondata di DAA ha incluso l'inibitore della proteasi simeprevir (SMV) e il primo inibitore della polimerasi ovvero il sofosbuvir (SOF).

Il SMV, rappresenta l'evoluzione naturale del TVR, ovvero è un inibitore della proteasi NS3/4A di prima generazione, *second wave*; è approvato in Italia e in Europa in combinazione con pegIFN/RBV per i pazienti che non presentano fibrosi avanzata, genotipo 1-4, *naive*, mentre nei pazienti con fibrosi almeno F2 in Europa e F3-F4 in Italia la combinazione è possibile con SOF +/- RBV per 12-24 settimane, a parità di genotipo, a patto che il paziente sia *naive* [8, 9].

Sono quindi comparsi in contemporanea o seguiti altri regimi, *interferon free*, comprendenti oltre ai sopracitati SOF e SMV, il cosiddetto regime 3D (paritaprevir/ritonavir/ombitasvir, cosomministrato con il dasabuvir), il ledipasvir e il daclatasvir.



Webster DP et Al. 2015

Figura 2

Storia dei regimi *interferon free*: *inibitore NS5A, † inibitore NS5B, ‡ Inibitore della Proteasi

Queste combinazioni terapeutiche offrono significativi vantaggi, inclusi alti tassi di SVR, cicli di trattamento più brevi e un calo sensibile degli eventi avversi.

Sebbene la ricerca abbia fatto passi in avanti straordinari nell'epoca dei DAA, rimangono alcune criticità legate ai costi elevati, al rischio di sviluppo di resistenze e interazioni farmacologiche potenzialmente tossiche con farmaci di uso comune, alla mancanza di un'adeguata esperienza, oltre che quelle legate all'alto numero di

pillole da assumere, previsto da alcuni regimi e alla sicurezza in alcune popolazioni speciali come quella rappresentata dai pazienti con insufficienza renale di grado severo (tabella 1) [10]:

DAA	EVENTO AVVERSO/LIMITAZIONI	DAA	EVENTO AVVERSO/LIMITAZIONI
INIBITORE PROTEASI			
Simeprevir	- Iperbilirubinemia - Fotosensibilità - Controindicato in classe Child Pugh B e C	Asunaprevir	- Elevazione ALT -Infrequentemente elevati livelli di bilirubina
Paritaprevir (legato al ritonavir)	- Iperbilirubinemia - Elevazione ALT - Interazioni farmacologiche - Controindicato in classe Child Pugh C	Grazoprevir	Ben tollerato
INIBITORI NS5A			
Ledipasvir	- Bassa barriera di resistenza - Ben tollerato - Interazione con inibitori di pompa	Daclatasvir	- Bassa barriera di resistenza - Ben tollerato
Ombitasvir	- Bassa barriera di resistenza - Ben tollerato	Elbasvir	- Bassa barriera di resistenza - Ben tollerato
INIBITORI NS5B			
Sofosbuvir	Assenti dosaggi raccomandati se GFR < 30 ml/min	Dasabuvir	Non ci sono eventi avversi peculiari. Finora ben tollerato
Beclabuvir	Non ci sono eventi avversi peculiari, Finora ben tollerato		

Modificato da Banerjee D, Reddy KR, 2016

Tabella 1

Principali eventi avversi e limitazioni nell'utilizzo dei DAA

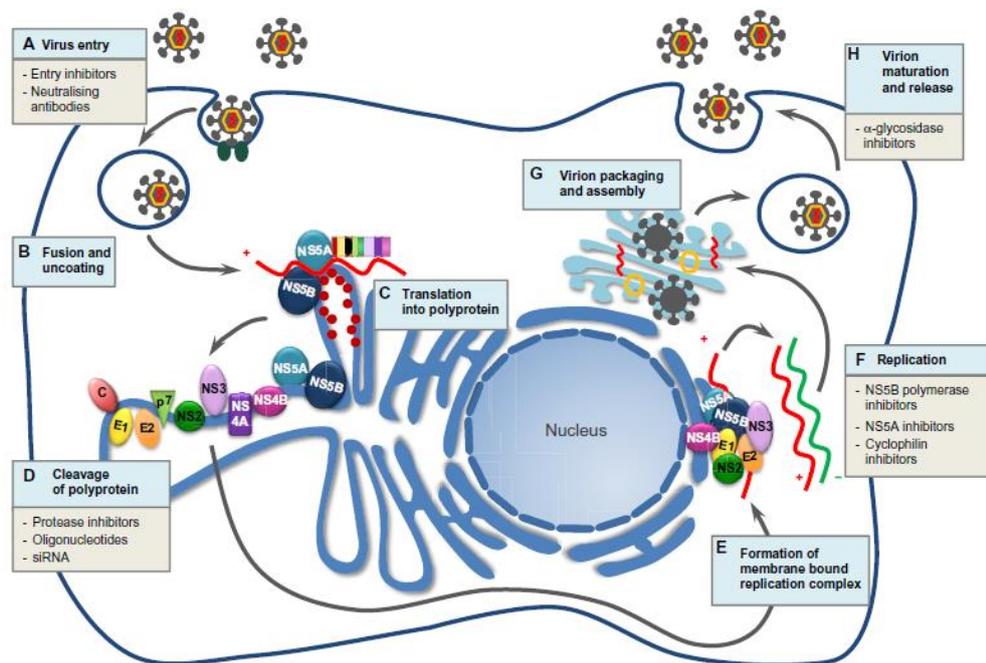
1.2 DIRECT ACTING ANTIVIRALS (DAA)

1.2.1 INFEZIONE DA HCV E REPLICAZIONE VIRALE

Prima di affrontare l'argomento DAA nel dettaglio, è necessaria una breve premessa sul virus e sul suo ciclo replicativo poiché questo offre molteplici potenziali *target* terapeutici. Una volta che il virus entra nel torrente ematico, si associa alle *low density* e alle *very low density lipoprotein* (LDL e VLDL). Le proteine strutturali del virus (E1 ed E2) possono, una volta nel fegato, legarsi a una serie di recettori: quello per LDL (LDLR), i glicosaminoglicani degli epatociti, il CD-81, il recettore scavenger-BI (SR-BI) e la claudina. L'*envelope* del virus, fortemente glicosilato, si fonde così con la membrana epatocitaria. Dopo l'endocitosi, l'acidificazione delle vescicole libera i filamenti di RNA dal nucleocapside, rilasciandoli nel citoplasma. Con l'aiuto dell'mRNA ospite, l'RNA virale migra nel reticolo endoplasmatico (RE) rugoso dove, dopo una serie di operazioni, viene trascritto. Il risultato finale è una poliproteina di 3000 aminoacidi, processata da peptidasi dell'ospite e da proteasi virali in 11 proteine [11]. La replicazione è largamente mediata dalla proteina non strutturale 5 B (NS5B), una RNA polimerasi RNA-dipendente (RdRp), coadiuvata dalla proteina non strutturale 5 A (NS5A). La figure 3 riportano il ciclo di replicazione virale, le proteine sintetizzate e i potenziali obiettivi di trattamento [12].

L'infezione da virus C rappresenta un processo dinamico; l'emivita del virus è di poche ore e un paziente infetto è in grado di generare ed eliminare 10^{12} virioni al giorno. Il risultato di questa elevata attività replicativa, associato alla presenza di regioni ipervariabili nel genoma del virus e alla perdita della capacità di "correttrice di bozze" da parte della RdRp, si traduce in una drammatica diversità nella popolazione infetta, con la nascita di quasi specie e differenze nel patrimonio genomico che possono variare anche del 30-35% da un virione all'altro [4]. Ciò ha condotto alla catalogazione del virus in sei genotipi (dall'1 al 6), ulteriormente suddivisi in sottotipi, con diversa distribuzione geografica e diverso tipo di risposta alla terapia con pegIFN/RBV. Tali proprietà di replicazione rendono l'HCV simile all'HIV; infatti, nonostante gli errori di copiatura producano molti genomi non funzionali, globalmente vi è un vantaggio di sopravvivenza derivante dalla continua creazione di nuove sottopopolazioni, favorita dalla pressione esercitata dal sistema immunitario dell'ospite e dalle terapie. Queste considerazioni forniscono il razionale per lo sviluppo e l'implementazione di terapie antivirali combinate proprio come avviene nei confronti dell'HIV. Fino a poco tempo

fa la mancanza di un modello in vitro di replicazione dell'HCV aveva limitato molto lo sviluppo di nuovi farmaci.



Holmes JA and Tompson AJ, 2015

Figura 3

Ciclo di replicazione dell'HCV e bersagli dei DAA:

A: entrata del virus nella cellula per via recettoriale

B: fusione e scapsidamento del genoma

C: traduzione in una singola poliproteina nel reticolo endoplasmatico

D: clivaggio della poliproteina da parte di proteasi del virus e dell'ospite in 10 proteine mature

E: formazione di un complesso di replicazione legato alla membrana nucleare

F: trascrizione tramite la NS5B polimerasi

G: assemblaggio delle componenti virali

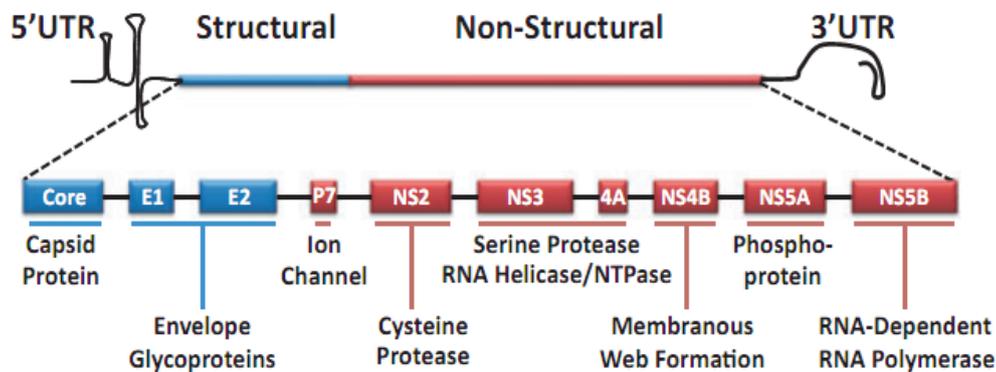
H: maturazione e rilascio del virus all'esterno dell'epatocita

Sebbene il virus possa infettare e replicarsi negli scimpanzé, l'uso di questi primati per la messa a punto di nuove terapie è limitato dall'elevato costo, dalla necessità di alloggi adeguati e di regolari cure veterinarie. Nel 1999 Lohman e collaboratori [13] hanno messo a punto un modello di replicazione HCV a partire dall'RNA del genotipo 1b e dalle linee cellulari Huh-7 di epatoma umano. In seguito è stato sviluppato un clone del genoma HCV che ricapitolava l'intero ciclo vitale del virus in cellule di coltura ed era in grado di indurre un'epatite acuta C negli scimpanzé. Questo ha facilitato e permesso lo *screening* di un gran numero di potenziali farmaci diretti contro l'HCV e

l'identificazione dei potenziali candidati al ruolo di DAA. Tali agenti agiscono colpendo specifici punti dell'infezione e della replicazione virale.

Bersagli del genoma

I potenziali obiettivi dei DAA comprendono proteine strutturali e non strutturali (figura 4). Quelle strutturali, che potrebbero servire come bersagli, includono la proteina *core* del nucleocapside (C) e le glicoproteine E1 ed E2 dell'*envelope*. Le proteine non strutturali comprendono: la regione NS2/NS3, l'NS3 serina proteasi RNA elicasi, la NS4A, peptide cofattore dell'NS3, la proteina NS5A e la NS5B RNA polimerasi RNA-dipendente [4].



Poordad F. and Dieterich D, 2012

Figure 4

Poliproteina dell'HCV: organizzazione genomica

Proteine E1 e E2

Le proteine E1 ed E2, incorporate nell'*envelope* lipidico del virus, sono fondamentali per il suo ciclo replicativo poiché permettono al virus di entrare nel citoplasma dell'ospite. Sono localizzate tra la proteina C e la proteina strutturale P 7. L'inibizione delle proteine dell'*envelope* potrebbe prevenire l'infezione impedendo l'accesso al citoplasma e riducendo la possibilità da parte dei virioni sintetizzati di infettare epatociti vergini. Comunque le regioni ipervariabili di E2 suggeriscono che la pressione immunologica potrebbe selezionare varianti *escape* qualora esse divenissero obiettivo di DAA o vaccini.

Proteina P7

Questa proteina virale è localizzata tra le regioni E2 ed NS2, rappresentando così l'interfaccia tra le regioni codificanti elementi strutturali e non strutturali. Nei modelli sperimentali si associa al reticolo endoplasmatico, ai mitocondri e alla membrana cellulare, è dotata di un'attività di canale ionico e, in modelli primati non umani, i trascritti con mutazioni della regione P7 non sono infettivi.

Proteine NS2/NS3

NS2 è la prima proteina non strutturale sul terminale amminico della poliproteina. Prima di essere scissa da quest'ultima, forma un complesso dimerico avente funzione di proteinasi con NS3, che determina autocataliticamente la separazione delle due. Sebbene NS2 non sia essenziale per la formazione del complesso di replicazione, partecipa all'assemblaggio del virus e al suo rilascio. La sua inibizione blocca la processazione della poliproteina HCV. NS3 partecipa all'attività della proteasi NS3A/NS4B. Un terzo della proteina ha attività serina proteasi mentre la rimanente porzione ha attività di RNA elicasi. Quando è espressa singolarmente, si distribuisce in tutto il citoplasma dell'epatocita.

NS3/NS4A proteasi

NS3 forma un complesso con NS4A, una piccola proteina che funziona come cofattore di serina proteasi. Quando coesprese, sono localizzate sul reticolo e insieme sono responsabili del clivaggio delle proteine non strutturali localizzate a valle di NS3, nella direzione del terminale carbossilico della poliproteina. NS4A aiuta a proteggere l'NS3/NS4A dalla degradazione proteolitica e partecipa anche nel bloccare elementi della risposta immunitaria innata dell'epatocita.

Proteina NS4B

Un altro dominio non strutturale della poliproteina HCV, a valle di NS3/NS4A, è NS4B. La proteina sembra partecipare alla formazione del complesso di replicazione. I suoi domini possono essere identificati sia sulla superficie interna che esterna del reticolo endoplasmatico. Qui può agire nello scambio di informazioni tra il lume del reticolo e il citosol.

Proteina NS5A

Una volta scissa dalla poliproteina, si localizza sulle membrane dove si lega al terminale 3' dell'RNA virale appena sintetizzato e partecipa alla replicazione del genoma. Mutazioni di NS5A hanno il potenziale per incrementare la replicazione HCV. Questa proteina interagisce anche con NS5B nel mantenere la replicazione.

Polimerasi NS5B

Come la maggior parte delle proteine dell'HCV, è associata al reticolo endoplasmatico o a membrane derivate da quest'ultimo. Essa è una RNA polimerasi RNA-dipendente, componente principale dell'apparato replicativo. La sua attività è modulata da NS5A e da NS3. L'affinità di NS5B per l'RNA è regolata dalla ciclofilina B della cellula ospite.

1.2.2 CLASSI DI DAA

Sia i target genomici che i meccanismi d'azione dei farmaci sono utilizzati per classificare i DAA (figure 5 e 6).

Gli inibitori di NS3/4A bloccano l'attività enzimatica richiesta per scindere l'HCV nelle sue proteine strutturali e non strutturali e sono noti come inibitori delle proteasi (PI). In base al periodo di approvazione, alla potenza, all'attività contro ceppi resistenti, alla biodisponibilità, alla sicurezza e alla tollerabilità, essi sono divisi in PI di prima e seconda generazione e, per ogni generazione, in quelli *first* e *second wave*.

Ad esempio farmaci con lo stesso profilo di resistenza sono considerati essere della stessa generazione e potrebbero essere raggruppati in *wave* separati in base a dose, sicurezza e profilo di tollerabilità.

Sebbene l'esatto meccanismo d'azione sia sconosciuto, la proteina NS5A è essenziale per la replicazione e l'assemblaggio dell'HCV. Gli inibitori di NS5A bloccano la replicazione virale in una fase precoce di assemblaggio di modo da impedire il rilascio dell'RNA virale o di proteine strutturali. Gli agenti che bloccano l'attività di NS5B inibiscono RdRp e sono definiti come inibitori delle polimerasi. Sono stati sintetizzati sia inibitori nucleosidici che non nucleosidici della RdRp.

Gli Inibitori nucleosidici (NI) si legano al sito attivo della RdRp mentre i non nucleosidici (NNI) si legano all'enzima al di fuori del sito attivo, inducendo cambiamenti conformazionali che riducono l'attività della RdRp.

Gli NI tendono ad avere molta potenza contro più genotipi HCV e inducono meno resistenze rispetto agli NNI. Infine, la ciclofillina A è una proteina dell'ospite che interagisce con NS5B e appare promuovere l'abilità della proteina nel legare l'RNA virale: nessuno dei suoi inibitori è attualmente però ancora oggi disponibile in commercio [4].

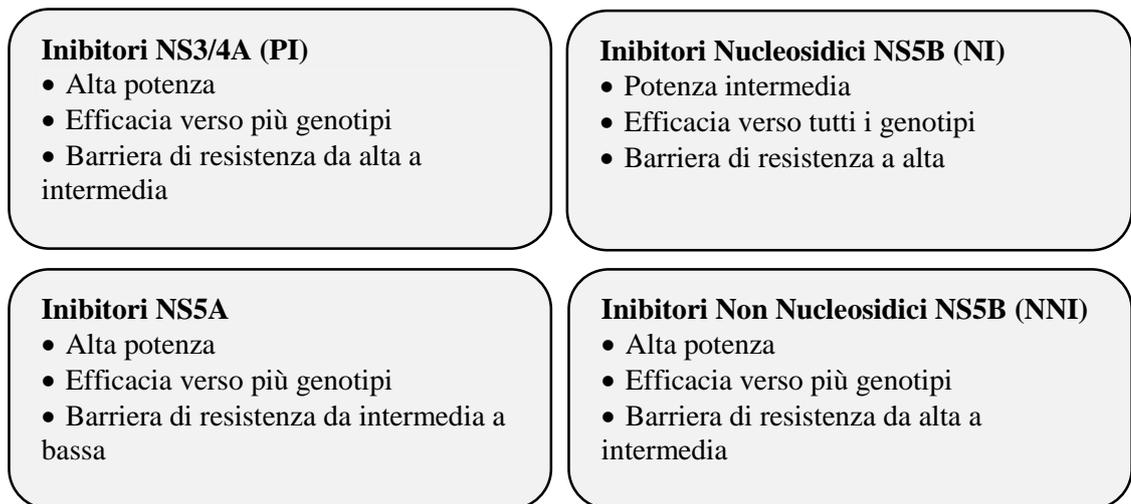


Figura 5
Classi di DAA e caratteristiche dei farmaci

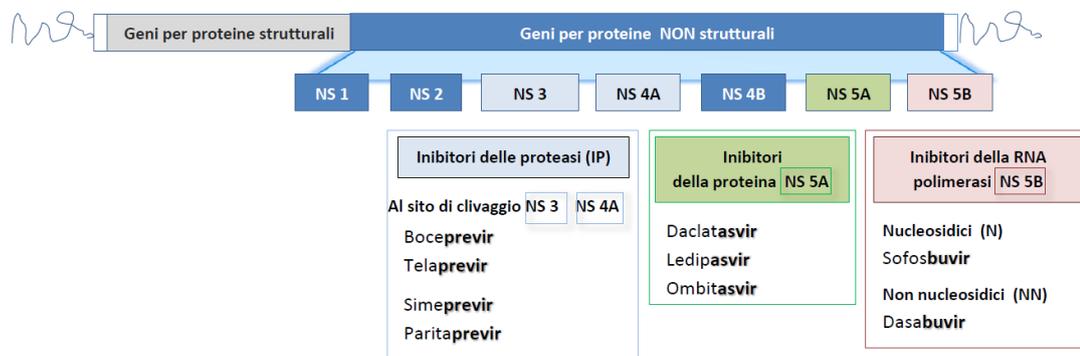


Figura 6
Genoma virale , bersagli terapeutici e rispettivi DAA approvati

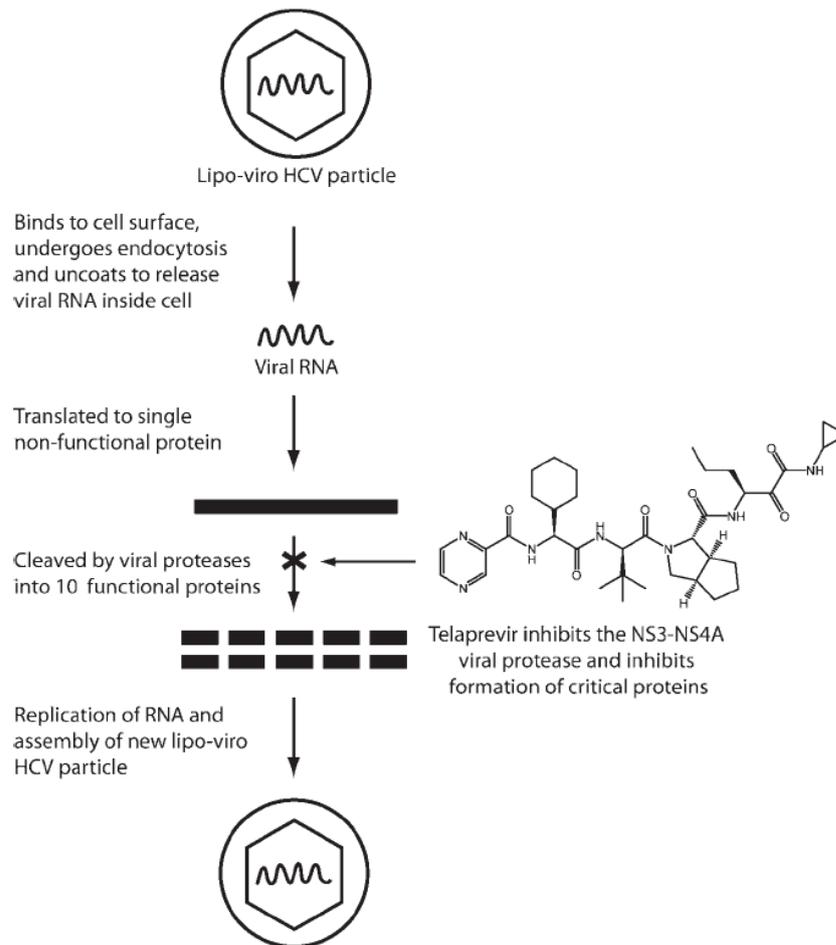
1.3 INIBITORI DELLA PROTEASI NS3/4A DI PRIMA GENERAZIONE

1.3.1 TELAPREVIR

Il TVR e il BOC costituiscono la *first wave* dei PI di prima generazione. A fronte di un significativo aumento dell'SVR nei pazienti affetti da genotipo 1, questi farmaci vanno combinati con PegIFN/RBV, ed hanno una significativa tossicità addizionale, oltre a prevedere un elevato numero di pillole da assumere e un elevato numero di interazioni farmacologiche.

TVR è un peptide mimetico che compete con il substrato virale per l'attivazione di NS3, inibendo il complesso della proteasi virale NS3-NS4A, uno degli enzimi fondamentali per la replicazione virale. La figura 7 descrive il meccanismo d'azione del farmaco in relazione al ciclo vitale dell'HCV [14]. Come già ricordato, NS3 è una serina proteasi virale che catalizza il clivaggio della poliproteina virale mentre NS4A è un cofattore che interagisce con NS3 al fine di aumentare l'attività proteasica, attraverso il riconoscimento e l'ancoraggio del complesso NS3-NS4A al reticolo endoplasmatico e la stabilizzazione di NS3. Il complesso così formato è responsabile di almeno due azioni proteolitiche: la prima consiste nel clivaggio della poliproteina iniziale non funzionale a livello di 4 diversi siti, consentendo così il rilascio di peptidi funzionali alla replicazione; la seconda consiste nella capacità del complesso di limitare la risposta immunitaria innata verso l'HCV, attraverso il clivaggio di proteine fondamentali nel permettere all'epatocita di riconoscere l'invasione virale. Il TVR, una volta legatosi a NS3-NS4A, forma prima un complesso non covalente inibente l'enzima, seguito da un complesso covalente, molto stabile, con un tempo di dissociazione dal sito molto lento, caratteristica che contribuisce ad aumentarne l'efficacia. Gli studi preclinici e clinici indicano che il TVR è biodisponibile oralmente e si accumula negli umani con 2-3 dosi quotidiane. La concentrazione media nel sangue è più alta con 750 mg ogni 8 ore piuttosto che con 450 mg ogni 8 ore o 1250 mg ogni 12 ore, suggerendo che l'accumulo del farmaco dipende sia dalla dose che dalla frequenza di somministrazione. Il più importante sito d'azione del TVR è

rappresentato dall'epatocita infetto, motivo per cui la sua distribuzione e il suo accumulo nel fegato sono entrambi rilevanti. La somministrazione orale nei ratti ha prodotto elevate concentrazioni nel fegato (rapporto fegato-plasma 35:1), suggerendo che il farmaco può raggiungere elevate concentrazioni nel fegato umano dopo la somministrazione per os.



Smith LS et Al, 2011

Figura 9

Struttura e meccanismo d'azione del TVR

Selezione dei candidati alla triplice terapia con TVR e pegIFN/RBV

In Italia la triplice terapia è stata considerata lo *standard* di cura in tutti i pazienti infetti da infezione HCV, genotipo 1, *naive* e non dal 2012 al 2014. La combinazione pegIFN/RBV ha rappresentato invece il trattamento di scelta per tutti gli altri pazienti infetti con genotipi non 1. Il genotipo 1 ha costituito quindi l'elemento chiave per candidare i pazienti alla terapia basata su TVR. Altri importanti elementi nel valutare

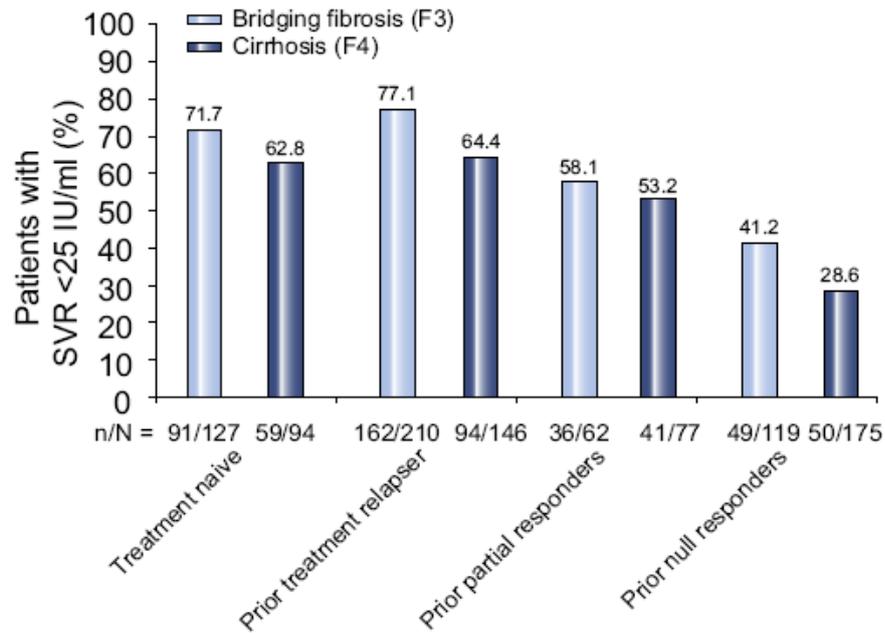
la probabilità di ottenere un SVR con la triplice terapia sono stati il grado di fibrosi o la presenza o meno di esposizione a precedenti trattamenti.

La fibrosi è anche importante per valutare l'urgenza del trattamento in quanto pazienti con fibrosi lieve non hanno priorità, stante il basso rischio di progressione. Dall'altro lato, questi sono i pazienti che hanno più possibilità di raggiungere una SVR; pertanto tutti quelli senza controindicazioni andrebbero considerati candidati alla terapia antivirale.

Efficacia

Gli esperti considerano da sempre i pazienti precedentemente trattati una sfida nella pratica clinica a causa della mancanza di dati precisi sui precedenti trattamenti, della difficoltà nello standardizzare le varie definizioni di risposta, dell'assenza dei dati virologici nei momenti chiave della terapia e spesso dei ricordi imprecisi dei pazienti. I problemi non si hanno tanto nell'individuare i *relapser* quanto nel differenziare un *partial responder* da un *null responder*, a causa della difficoltà nel recuperare i dati sull'esatto declino in logaritmi dell'HCV-RNA ai vari monitoraggi. La definizione corretta di *null responder* è peraltro difficile e richiederebbe, oltre ai dati sulla cinetica virale, le informazioni sull'aderenza alla terapia e su eventuali riduzioni delle dosi. Tuttavia, conoscere il tipo di risposta precedente permette di stimare le possibilità di SVR ed è un importante determinante nella scelta di chi sottoporre o meno a triplice terapia. L'identificazione dello stadio di fibrosi è potenzialmente più importante della precedente risposta in quanto la fibrosi avanzata ha un impatto maggiore sulla SVR rispetto alla mancata risposta a precedenti linee di terapia.

Lo studio internazionale EAP (*Early Access Program HEP3002*), condotto su 1078 pazienti con fibrosi F3 o cirrosi, ha confermato le evidenze degli studi REALIZE e ADVANCE [15-17]. Il tasso di SVR complessivo era del 56%, del 68% nei pazienti *naive* (62.8% nei cirrotici) e del 34% nei *null responder* (28.6% nei cirrotici), tassi maggiori rispetto comunque a quelli evidenziati negli studi registrativi (figura 10). Fattori predittivi di risposta erano un basso grado di fibrosi, il genotipo 1 b e il paziente *naive* [17].



Colombo M et Al, 2014

Figura 10

Tassi di SVR per grado di fibrosi e risposta al precedente trattamento

Sicurezza

Alcuni ammalati presentano problematiche cliniche o psichiatriche che controindicano a priori un trattamento antivirale che preveda l'interferone, spesso ostacolo insormontabile per tutti quei pazienti che hanno avuto esperienza di forme severe di depressione, anemia o malattie autoimmuni.

Come accade con la terapia antivirale basata su pegIFN/RBV, i PI sono controindicati nelle donne gravide e nei loro partner maschili. Inoltre sono controindicati quando somministrati assieme a farmaci il cui metabolismo dipende dal CYP3A4/5, in quanto le concentrazioni di tali medicinali nel sangue, aumentando, potrebbero determinare eventi avversi anche letali [18]. Inoltre la somministrazione in contemporanea a potenti induttori di CYP3A4/5 può ridurre le concentrazioni plasmatiche di TVR, riducendone l'efficacia (Tabella 4). Le interazioni farmacologiche con i PI vanno sempre valutate e il loro utilizzo andrebbe evitato nei cirrotici scompensati e nei trapiantati di fegato non essendoci dati di farmacocinetica e sicurezza in questa popolazione. I farmaci più importanti comunemente prescritti in grado di interagire con i PI di prima generazione sono contraccettivi ormonali, statine, diidropiridina, inibitori dei canali del calcio e inibitori delle fosfodiesterasi. Giacché riducono i livelli plasmatici dei contraccettivi

orali, potendone rendere inefficace l'azione, essi non vanno utilizzati durante il periodo di trattamento con TVR e vanno preferiti metodi anticoncezionali di barriera e dispositivi intrauterini. Per quanto riguarda gli eventi indesiderati più frequenti riconducibili alla terapia con TVR negli studi clinici, includevano *rash* (56%), anemia (36%), prurito (28%) e disturbi ano-rettali (29%) [1]. Nei pazienti più fragili ovvero quelli con fibrosi avanzata o cirrosi, presenti nello studio EAP, il tasso globale di eventi avversi era del 67 % (grado 2 - 4), il 16% dei pazienti abbandonava la terapia a causa di essi o presentava eventi avversi di grado severo e lo 0.6% moriva [17].

Questi dati hanno portato a considerare con cautela il paziente cirrotico per il trattamento con PI, riservando lo stesso solo a quelli in classe di compenso funzionale.

Classe di farmaci	Controindicato con TVR
Alfa-litici	Alfuzosina
Anticonvulsivanti	N/A
Antimicobatteri	Rifampicina
Derivati dell'Ergot	Diidroergotamina, ergotamina, ergonovina e metilergonovina
Procinetici intestinali	Cisapride
Prodotti di erboristeria	Erba di S.Giovanni (<i>Hypericum perforatum</i>)
HMG CoA reduttasi	Lovastatina, simvastatina e atorvastatina
Contraccettivi orali	N/A
Neurolettici	Pimozide
Inibitori PDE-5	Sildenafil o tadalafil
Sedativi/ipnotici	Triazolam, midazolam

modificato da Jacobson IM et al., 2012

Tabella 2

Farmaci controindicati durante il trattamento con TVR

1.3.2 SIMEPREVIR

La *second wave* dei PI, include agenti con aumentata potenza e dosaggio, ma con profilo di resistenza sovrapponibile a BOC e TVR. Il termine PI di seconda generazione è stato invece riservato per farmaci che abbiano anche un miglior profilo di resistenza.

Il SMV è un potente e non covalente inibitore della proteasi NS3/4a (figura 11), attivo contro l'infezione da genotipi 1, 2, 4, 5 e 6. Ha il vantaggio di essere assunto in un'unica somministrazione verso le tre del TVR e di non risentire, per quanto riguarda l'assorbimento, dell'assunzione con il pasto grasso. Non deve essere utilizzato in monoterapia mentre può essere combinato con altri DAA come SOF in regimi liberi da interferone.

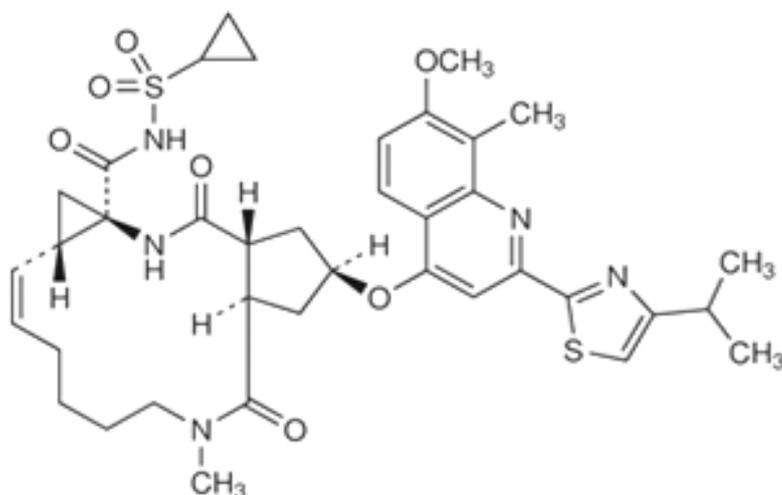


Figura 11

Simeprevir: struttura molecolare

Efficacia

Nei pazienti *naive*, genotipo 1, il SMV, in associazione a pegIFN/RBV ha prodotto tassi di SVR di circa l'80% [7]. Quando è stato utilizzato invece nei pazienti precedentemente non responsivi si è rilevato essere non inferiore in termini di efficacia al TVR: rispettivamente 54% vs 55% di SVR [19]. Fattori predittivi di SVR del SMV, se combinato a pegIFN/RBV, sono assenza di cirrosi, assenza di polimorfismo Q80K nei genotipi 1a, pazienti *naive*, HCV-RNA < 2.000.000 UI/mL.

I regime *interferon free* hanno ricevuto l'approvazione da parte dell'FDA a fine 2014 con la combinazione SMV e SOF +/- RBV nel genotipo 1 per 24 settimane.

Con questa associazione i tassi di SVR hanno raggiunto circa il 90%; in questo caso il grado di fibrosi, l'esposizione a precedenti trattamenti, l'aggiunta di RBV e la presenza di genotipo 1a non sembrano influenzare i tassi di SVR [20].

Sicurezza

Pazienti in trattamento con SMV possono avere esperienza di una varietà di eventi avversi che comprendono astenia, cefalea, prurito, sintomi influenzali e neutropenia; gli eventi avversi peculiarmente e unicamente associati ai regimi basati sul SMV sono iperbilirubinemia (solitamente modesta e transitoria), legata all'azione inibitrice del farmaco sui trasportatori di bilirubina OATP1B1 e MRP2, e reazioni di fotosensibilità; essendo un sulfamidico, SMV è attivo fotodinamicamente e gli eventi avversi possono essere scatenati dai raggi UV, anche in presenza di misure protettive nei confronti dell'esposizione solare stessa. Negli studi registrativi l'incidenza di iperbilirubinemia era del 22.8% vs il 10% della terapia con pegIFN/RBV mentre le reazioni di fotosensibilità erano dell'1.6% vs lo 0%. Il tasso di eventi avversi di grado severo era maggiore nel gruppo pegIFN/RBV che nel gruppo di pazienti trattati con SMV+pegIFN/RBV (10.0% vs 3.3%, rispettivamente), suggerendo la buona tollerabilità del SMV [10].

I più comuni eventi avversi riportati nei regimi *interferon free* (SMV e SOF +/- RBV) erano astenia (31%), cefalea (20%), nausea (16%), insonnia (14%), prurito (11%), *rash* (11%) e fotosensibilità (7%) ma con grado di severità compreso tra G1 e G2. *Rash*, prurito, iperbilirubinemia e anemia erano poi più comuni nei regime terapeutici che prevedevano anche la RBV. Complessivamente gli eventi avversi di grado G3 o G4 risultavano inferiori al 5% [10, 20].

SMV è metabolizzato dal citocromo P450 (isoforma 3A49) ed il suo utilizzo può portare a interazioni farmacologiche sfavorevoli quando somministrato assieme a induttori o inibitori del citocromo CYP3A (tabella 3). In aggiunta, vi è un aumento delle concentrazioni sieriche nei pazienti con malattia avanzata che assumono SMV, motivo per cui è controindicato nella classe funzionale B o C di Child Pugh [21].

Classe di farmaci	Controindicato con SMV
Antibiotici	Eritromicina, claritromicina, telitromicina
Anticonvulsivanti	Carbamazepina, oxcarbazepina, fenobarbital, fenitoina
Antimicobatteri	Rifampicina, rifabutina, rifapentina
Farmaci antiretrovirali	Cobicistat, efavirenz, delavirdina, etravirina, nevirapina, darunavir/ritonavir, atazanavir, fosamprenavir, lopinavir, indinavir, nelfinavir, saquinavir, tipranavir, ritonavir
Antiarritmici	Amiodarone (somministrato con SOF)
Prodotti di erboristeria	Erba di S.Giovanni, cardo mariano
Procinetici intestinali	Cisapride
Antimicotici	Itraconazolo, ketoconazolo, posaconazolo, fluconazolo, voriconazolo
Immunosoppressori	Ciclosporina, desametasone

<http://www.olyzio.com/hcp/drug-drug-interactions>

Tabella 3

Farmaci controindicati durante il trattamento con SMV

1.4 INIBITORI NUCLEOSIDICI DELLA RNA POLIMERASI NS5B

1.4.1 SOFOSBUVIR

SOF è un profarmaco il cui principale metabolita, il 2'-deossi-2'- α -fluoro- β -C-metiluridine-5'-monofosfato, inibisce la RNA polimerasi virale NS5B (figura 12).

Approvato dall'FDA nel 2013 per il trattamento dell'epatite C, in Italia è disponibile per l'acquisto solo dal gennaio 2015. Sebbene sia ad azione pangenotipica il suo utilizzo è consentito per i genotipi 1, 2, 3 e 4, ma sempre in combinazione con altri DAA, ad eccezione del genotipo 2, dove può essere utilizzato in associazione alla sola RBV. La dose è di 400 mg una volta al giorno.

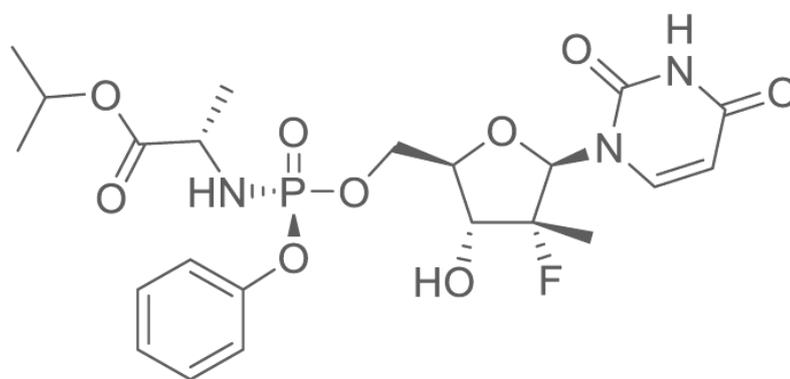


Figura 12

Sofosbuvir: struttura molecolare

Efficacia

Nel genotipo 1 l'associazione con la sola RBV è considerata subottimale.

Le combinazioni disponibili e consentite dalle linee guida nazionali ed europee sono:

- SOF – SMV +/- RBV (vedi paragrafo precedente);
- SOF – Daclatasvir +/- RBV: tale combinazione per 12-24 settimane si è dimostrata efficace anche nei pazienti resistenti agli inibitori delle proteasi di I generazione, con tassi di SVR del 98%, ammalati per i quali questa associazione rappresenta una buona alternativa;
- SOF - Ledipasvir: tale combinazione ha prodotto tassi di SVR superiori al 94% quando utilizzata, a prescindere dal grado di fibrosi, dalla presenza di genotipo 1a o b o dall'esposizione a pregressi trattamenti. Nei pazienti cirrotici in fase di scompenso o non responsivi a precedenti trattamenti, che non tollerano RBV, la terapia va estesa a 24 invece che 12 settimane. E'

controindicato nei pazienti con grave compromissione della funzione epatica (classe di Child Pugh C) [22].

Sicurezza

L'unica limitazione al suo utilizzo è rappresentata dalla presenza di insufficienza renale di grado avanzato; SOF è infatti eliminato preliminarmente dal corpo attraverso la filtrazione glomerulare. Studi di farmacocinetica non richiedono aggiustamento della dose per pazienti con insufficienza renale di grado lieve o moderato. Nei pazienti con valori di velocità di filtrazione glomerulare < 30 ml/min, inclusi quelli in emodialisi, la somministrazione di SOF è controindicata, in quanto non sono state stabilite raccomandazioni sull'aggiustamento della dose. Per il resto non sono descritti significativi eventi avversi: astenia, cefalea, nausea, insonnia, anemia, prurito e tosse, sono quelli più frequentemente riportati negli studi registrativi. I pazienti che hanno interrotto il trattamento con SOF - RBV per eventi avversi sono stati meno del 2% e anche quelli cirrotici non hanno presentato un tasso maggiore rispetto a quelli che non lo erano [10].

2. PARTE SPERIMENTALE

2.1 PREMESSA

I pazienti cirrotici rappresentano la popolazione più complessa da trattare per una serie di motivi:

- urgenza di trattamento per il rischio di ulteriore progressione della malattia o di sviluppo di epatocarcinoma;
- presenza di alcune condizioni come l'anemia e la piastrinopenia che possono rappresentare una controindicazione ai trattamenti comprensivi di pegIFN/RBV;
- spesso sono pazienti già sottoposti in passato a cicli di terapia antivirale;
- la presenza di fibrosi avanzata o cirrosi rappresenta storicamente uno dei fattori predittivi negativi di risposta più importanti.

Basti pensare che i tassi di SVR, per i pazienti con genotipo 1, *non responder* e cirrotici, sottoposti a duplice terapia pegIFN e RBV sono del 9% come dimostrato da un'analisi condotta su una coorte di 1046 pazienti nello studio HALT-C [23].

Da qui è nato il vorticoso progresso della ricerca scientifica degli ultimi anni, stimolato dalla necessità di trovare nuove soluzioni terapeutiche in grado di aumentare i livelli di risposta in questa tipologia di pazienti e ridurre così il rischio di complicanze associate all'infezione HCV, senza però incrementare gli eventi avversi e gli effetti collaterali legati al trattamento stesso.

TVR e SMV rappresentano i capostipiti degli inibitori delle proteasi di prima generazione.

La triplice terapia con pegIFN/RBV e TVR è stata disponibile in Emilia Romagna dal maggio 2013 al febbraio 2015; in questo periodo sono stati valutati e raccolti dati riguardo le caratteristiche dei pazienti trattati, l'efficacia e sicurezza del trattamento antivirale su 35 soggetti affetti da fibrosi avanzata o cirrosi.

A causa dell'introduzione in commercio di nuovi DAA, all'interno di schemi di combinazione con e senza pegIFN, il TVR è stato sostituito dal SMV ed è prescrivibile ora solo in fascia C.

Lo studio è stato perciò esteso anche a pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi, trattati con SMV in associazione a SOF e RBV, nell'ambito di un regime terapeutico *interferon free* secondo le modalità prescrittive dell'Agenzia Italiana del Farmaco (AIFA), ai fine di confrontare efficacia e tollerabilità dei due regimi.

2.2 PAZIENTI E METODI

Disegno dello studio

Lo studio, è stato condotto in un centro italiano epatologico di terzo livello, c/o l'azienda ospedaliero-universitaria policlinico Sant'Orsola Malpighi di Bologna, su pazienti con infezione cronica HCV, genotipo 1, fibrosi avanzata o cirrosi, sia *naive* che già sottoposti a precedenti linee di terapia antivirale. Sono stati analizzati i dati riguardo alla sicurezza e l'efficacia.

Lo studio si può riassumere in 2 fasi temporali:

I FASE

(Dispensazione del TVR attraverso SSN ovvero da maggio 2013 a febbraio 2015): tutti i soggetti eleggibili hanno ricevuto TVR 750 mg tris in die (TID) durante le prime 12 settimane, in combinazione con pegIFN/RBV. La durata della terapia con pegIFN/RBV è stata la seguente (figura 1):

- soggetti con severa fibrosi (Metavir F3) *naive* o *relapser* hanno ricevuto un'aggiunta di 12 o 36 settimane (durata totale del trattamento 24 o 48 settimane) sulla base della risposta virologica alla 4^a e 12^a settimana, misurata mediante l'HCV-RNA nei laboratori locali:
 - ✓ soggetti con HCV RNA indosabile alle settimane 4 e 12 hanno ricevuto 12 settimane aggiuntive di pegIFN/RBV per un totale di trattamento di 24 settimane;
 - ✓ soggetti con HCV RNA dosabile alle settimane 4 o 12 hanno ricevuto 36 settimane di pegIFN/RBV per un totale di trattamento di 48 settimane;
- soggetti con severa fibrosi (Metavir F3), precedentemente trattati, con anamnesi di *viral breakthrough*, *partial* o *null response*, o quelli con cirrosi (Metavir F4) hanno ricevuto pegIFN/RBV per 36 settimane aggiuntive (durata totale di trattamento 48 settimane).

Per tutti i soggetti le *stopping rules*, basate sulla risposta virologica, sono state applicate come di seguito riportato (tabella 1), per garantire che TVR o pegIFN/RBV venissero sospesi in caso di fallimento della terapia o *viral break-through*:

Linee Guida per la sospensione di Telaprevir, PegIFN e RBV		
Farmaci	HCV-RNA > 100 IU/mL alla Wk 4 di trattamento	HCV-RNA > 100 IU/mL alla Wk 12 di trattamento
Telaprevir	Sospensione definitiva	Trattamento con telaprevir completato
PegIFN/RBV	Prosecuzione fino alla Week 12	Sospensione definitiva

Tabella 1

Indicazioni alla sospensione del trattamento con TVR.

Oltre alle settimane 4, 8 e 12, l'HCV-RNA è stato misurato alla settimana 24 per i soggetti con un trattamento totale di 24 settimane e alle settimane 24 e 48 per quelli che devono effettuare 48 settimane totali di terapia. In aggiunta tutti i soggetti sono stati sottoposti a una visita di controllo con dosaggio dell'HCV-RNA 12 settimane dopo la sospensione del trattamento. Invece tutti i soggetti che hanno interrotto il trattamento precocemente sono stati sottoposti a visita e prelievo al momento della sospensione e 12 settimane dopo l'ultima somministrazione del farmaco. La valutazione di sicurezza e tollerabilità è stata effettuata durante lo studio con compilazione di apposite *case report form* (CRF):

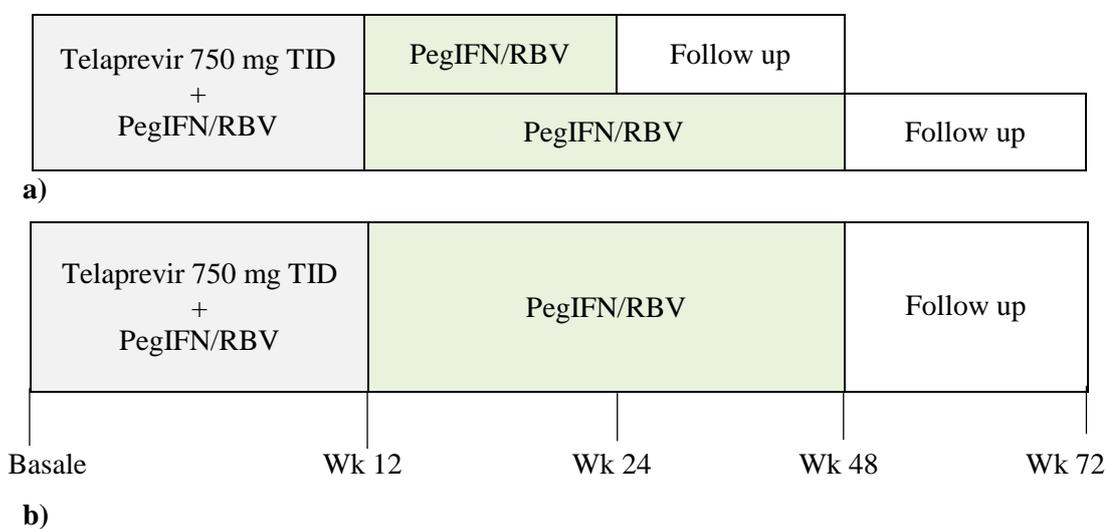


Figura 1

a) Trattamento di pazienti naïve e relapser con severa fibrosi

b) Trattamento di pazienti cirrotici o con partial o null response o viral break-through e severa fibrosi

Criteri di inclusione:

- sesso maschile o femminile, di età compresa tra 18 e 80 anni;
- evidenza di infezione HCV, genotipo 1;
- HCV-RNA dosabile;
- fibrosi epatica severa (Metavir F3) o cirrosi (Metavir F4) documentate con biopsia o test non invasivi (fibroscan), effettuati entro i precedenti 18 mesi;
- compenso della malattia (classe di Child Pugh A);
- possibilità di garantire il trattamento standard con pegIFN /RBV;
- nelle donne in età fertile gonadotropina corionica sierica o urinaria risultata negativa alla visita di *screening*;
- nei pazienti sessualmente attivi di sesso maschile e femminile l'utilizzo di 2 metodi contraccettivi efficaci dal momento dello *screening* fino a 4 mesi nelle donne e 7 mesi negli uomini dopo la sospensione di tutta la terapia;
- consenso informato firmato che indica l'avvenuta comprensione da parte del paziente dello studio e delle procedure e la sua adesione.

Criteri di esclusione:

- eleggibilità per l'arruolamento in altri protocolli di studio;
- genotipo differente dall'1;
- controindicazioni alla somministrazione di pegIFN/RBV o se vi sono stati dati anamnestici o di laboratorio precludenti il trattamento con pegIFN/RBV;
- pregresso trattamento con inibitori delle polimerasi o proteasi;
- presenza di epatocarcinoma attivo;
- storia di ascite, encefalopatia, sanguinamento da varici e/o le seguenti alterazioni di laboratorio: INR ≥ 1.5 , albumina sierica $< 3,3$ g/dL, bilirubina totale $< 1,8$ volte il limite superiore di normalità (eccezion fatta per i soggetti con sindrome di Gilbert);
- coinfezione con i virus HBV e HIV;
- presenza di una delle seguenti alterazioni laboratoristiche: neutrofili < 1500 /mmc, PLT < 50.000 , Hb < 11.5 g/dL nelle donne e < 12.5 negli uomini, *clearance* della creatinina calcolata < 50 ml/min, potassio < 3.5 mmol/L;
- inadeguato controllo della funzione tiroidea;

- rischio basale aumentato per anemia (talassemia, sferocitosi, sanguinamenti gastrointestinali, etc.);
- familiarità per morte improvvisa o allungamento congenito del QT o storia personale di allungamento congenito del QT;
- storia di severa patologia psichiatrica, incluse psicosi e/o depressione caratterizzata da tentato suicidio, ospedalizzazioni o periodi di disabilità per tale patologia;
- presenza in anamnesi di patologie immuno-mediate;
- anamnesi positiva per pneumopatia cronica con riduzione della funzionalità respiratoria;
- presenza di disturbi convulsivi di difficile controllo;
- storia di disordini oftalmici severi dovuti a diabete, ipertensione o altra evidenza di severa retinopatia;
- pregresso trapianto d'organo con l'eccezione di cornea e cute;
- arruolamento in altri studi investigazionali su farmaci;
- gravidanza o allattamento;
- qualsiasi condizione che, a detta dello sperimentatore, abbia potuto compromettere la salute del paziente o la buona riuscita dello studio o impedire al soggetto di possedere i requisiti per partecipare allo studio.

Dose e somministrazione

TVR è stato somministrato alle dosi di 750 mg (2 compresse rivestite da 375 mg) per via orale ogni 8 ore, assieme a del cibo, per una dose totale di 2.250 mg/die. Una volta sospeso il farmaco per ragioni di sicurezza o inadeguata risposta, non è stato ripreso. In aggiunta alla somministrazione di TVR, i pazienti hanno ricevuto le dosi di RBV e pegIFN secondo il seguente schema: vale a dire interferone peghilato alfa 2a alla dose di 180 µg/settimana o interferone peghilato alfa 2b alla dose di 1,5 µg/Kg/settimana, sottocute, e RBV, alle dosi di 800 mg/die per coloro che sono risultati pesare < 65 kg, di 1000 mg per quelli con peso compreso tra 65 e 75 kg, di 1200 mg per quelli con peso corporeo tra 86 e 105 kg e infine di 1400 mg per i pazienti il cui peso è risultato > 105 kg. La RBV è stata somministrata due volte al giorno e, per ottimizzare l'aderenza alle dosi dei farmaci, è stata assunta nelle sue due somministrazioni nello stesso momento di assunzione mattutina e serale del TVR. La somministrazione di

tutta la terapia antivirale assunta durante lo studio è stata riportata nelle CRF. Anche l'utilizzo di farmaci impiegati nella gestione dell'anemia e del *rash* cutaneo, altre terapie concomitanti e la presenza di importati eventi avversi sono stati riportati nelle CRF.

Durante la terapia con TVR sono state evitati tutti i farmaci con basso indice terapeutico che interferiscono sul citocromo CYP3A.

Controlli previsti dallo studio

Esami eseguiti allo *screening* e ai controlli:

- emocromo con emoglobina, globuli bianchi con formula, piastrine;
- esami biochimici comprensivi di sodio, potassio, magnesio, calcio, gamma-glutamyltransferasi, fosfatasi alcalina, bilirubina, creatinina, acido urico, GOT, GPT, glicemia, albumina;
- TSH allo *screening* e alle settimane 4 e 8;
- sierologia per HIV Ab e HbsAg;
- elettrocardiogramma allo *screening*;
- monitoraggio di pressione arteriosa e frequenza cardiaca allo *screening* e durante tutte le visite;
- visita medica con rilievo dell'altezza e del peso corporeo allo *screening* e a tutte le visite.

Valutazioni della sicurezza

La valutazione degli eventi avversi (EA) è stata effettuata utilizzando i criteri stabiliti dalla *Division of AIDS Table for Grading the Severity of Adult and Pediatric Adverse (DAIDS)*, classificando gli eventi avversi in base alla gravità, in quattro livelli:

- grado 1 (G1): sintomi che non causano o causano solo lievi interferenze nelle attività sociali e funzionali del paziente;
- grado 2 (G2): sintomi che interferiscono moderatamente nelle attività sociali e funzionali del paziente;
- grado 3 (G3): sintomi che causano disabilità, impedendo di svolgere le attività sociali e funzionali del paziente;
- grado 4 (G4): sintomi che provocano disabilità, impedendo la cura di se stessi, o che richiedono interventi medici operativi atti a prevenire danni permanenti, disabilità persistenti o la morte.

Nelle CRF sono stati riportati gli EA che si sono verificati nel lasso di tempo compreso tra il primo giorno di somministrazione e il trentesimo giorno dall'assunzione dell'ultima dose di TVR.

EA di particolare interesse sono stati rappresentati da:

- tutti i *rash* cutanei e i casi di anemia a prescindere dal grado di DAIDS o dal legame con il TVR;
- tutti i seguenti, potenzialmente legati al TVR, a giudizio dell'operatore:
 - tutti gli EA, incluse anomalie di laboratorio, con DAIDS grado ≥ 2 ;
 - tutti gli EA (compresi quelli G1), incluse anomalie di laboratorio considerate clinicamente significative;
- tutti gli EA che hanno portato alla sospensione del TVR, a prescindere dal grado DAIDS o dalla relazione con il TVR;
- tutte le gravidanze in pazienti donne e in *partner* di pazienti di sesso maschile;
- speciali situazioni da riportare: overdose, errori di sospetto abuso/uso improprio, esposizione accidentale o impropria al TVR.

Un evento avverso è stato considerato di grado severo (EAS) se:

- ha provocato la morte del paziente;
- ha messo a rischio la vita del paziente;
- ha richiesto il ricovero del paziente o un prolungamento di un ricovero in corso;
- ha provocato disabilità significative o persistenti;
- ha determinato anomalie congenite o difetti alla nascita;
- vi è stato il sospetto di un'infezione trasmessa attraverso il farmaco;
- il medico lo ha considerato clinicamente importante.

In caso di anemia, è stata ridotta sempre la RBV, dal momento che il TVR una volta interrotto non può più essere ripreso. L'utilizzo degli steroidi sistemici ha determinato automaticamente l'interruzione del trattamento.

Valutazione dell'efficacia

I livelli di HCV-RNA sono stati misurati mediante metodica PCR *Real Time* con limite di sensibilità di 15 UI/mL al basale, alle settimane 4, 8, 12, 24, 48, e i risultati utilizzati per stabilire i tassi di SVR nella popolazione in oggetto.

II FASE

(dispensazione del SMV attraverso SSN o nell'ambito di programmi compassionevoli in associazione a SOF+/-RBV ovvero da marzo 2015).

Tutti i soggetti eleggibili hanno ricevuto SMV 150 mg 1 cp al giorno per 12 settimane, in combinazione con SOF 400 mg, 1 cp al giorno per 12 o 24 settimane, +/- RBV (figura 2), in particolare:

- soggetti con severa fibrosi (Metavir F3), genotipo 1 a o 1 b, hanno ricevuto 12 settimane di trattamento. L'aggiunta di RBV è stata suggerita nei pazienti che avevano fallito precedenti cicli di terapia;
- soggetti con cirrosi (Metavir F4), genotipo 1 b, hanno ricevuto 12 settimane di trattamento. La terapia è stata prolungata a 24 settimane in paziente intolleranti alla RBV.

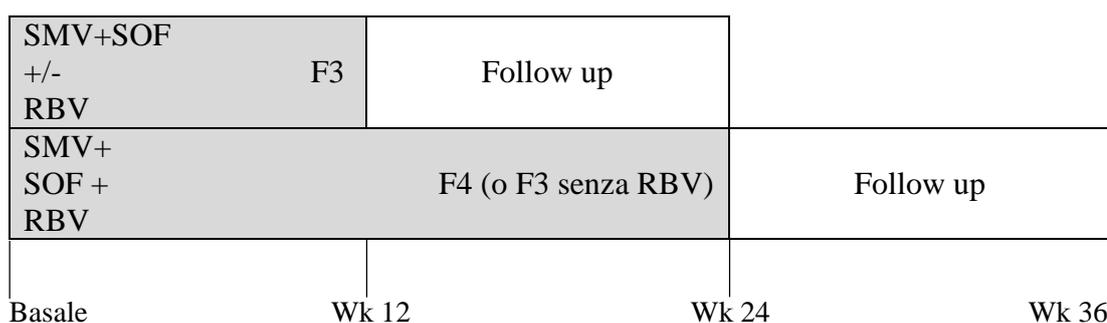


Figura 2

Trattamento di pazienti con SMV e fibrosi F3 o F4

Criteri di inclusione:

- sesso maschile o femminile, di età compresa tra 18 e 80 aa;
- evidenza di infezione HCV, genotipo 1;
- HCV-RNA dosabile;
- fibrosi epatica severa (Metavir F3) o cirrosi (Metavir F4) documentate con biopsia o test non invasivi (fibroscan), effettuati entro i precedenti 18 mesi;
- compenso della malattia (classe di Child Pugh A);
- nelle donne in età fertile gonadotropina corionica sierica o urinaria risultata negativa alla visita di *screening* e prima dell'assunzione della prima dose;

- nei pazienti sessualmente attivi di sesso maschile e femminile l'utilizzo di 2 metodi contraccettivi efficaci dal momento dello screening fino a 7 mesi dopo la sospensione di tutta la terapia;
- consenso informato firmato indicante l'avvenuta comprensione da parte del paziente dello studio e delle procedure e la sua adesione.

Obiettivi

Endpoint primario:

valutazione, nei pazienti cirrotici e con fibrosi avanzata, del profilo di sicurezza della terapia con TVR in combinazione con PegIFN/RBV, confrontato con quello della terapia con SMV-SOF+/-RBV.

Endpoint secondario:

valutazione, nei pazienti cirrotici e con fibrosi avanzata, del profilo di efficacia della terapia con TVR in combinazione con PegIFN/RBV, confrontato con quello della terapia con SMV-SOF+/-RBV nel secondo gruppo.

Raccolta dei dati e analisi statistica

Tutti i dati sono stati trattati in modo confidenziale nel rispetto della *privacy*. I pazienti sono stati identificati nel database attraverso le loro iniziali e la data di nascita. Ogni paziente ha firmato un consenso informato. I casi (n=35) sono stati costituiti dai pazienti consecutivamente trattati con PegIFN/RBV+TVR. I controlli (n=70), selezionati in modo *random* dalla popolazione di pazienti trattati con SMV+SOF+/-RBV, sono stati appaiati per età ± 5 anni, sesso e grado di fibrosi. Nell'analisi statistica, i dati continui sono stati riportati come mediana \pm *range* mentre i dati categorici come frequenze (%). Le variabili continue sono state confrontate con test non-parametrici (Mann Whitney). Le variabili categoriche sono state confrontate utilizzando tabelle di contingenza con test del χ^2 secondo Pearson oppure il Fisher's exact test quando appropriati. Un valore di $P < 0.05$ è stato considerato come statisticamente significativo. L'analisi *intention-to-treat* è stata utilizzata per valutare l'efficacia dei trattamenti antivirali e l'insorgenza degli eventi avversi. La regressione logistica multipla è stata utilizzata per identificare i fattori basali legati alla SVR. Le elaborazioni statistiche sono state effettuate utilizzando il software SPSS 20.0 (SPSS® inc., Chicago, IL, USA) per Windows® XP (Microsoft Corp.).

2.3 RISULTATI

Caratteristiche basali dei pazienti

Sono stati arruolati presso il Policlinico Sant'Orsola-Malpighi di Bologna, 35 pazienti, nel gruppo TVR in un periodo compreso tra maggio 2013 e febbraio 2015.

Da gennaio 2015 a ottobre 2015 sono stati invece arruolati i pazienti nel gruppo SMV; di questi 70 sono stati selezionati come controlli.

Gruppo TVR

Il 54.3% dei pazienti era di sesso maschile (18/35) e la maggior parte dei pazienti risultava essere cirrotica (62,9%; 22/35) mentre l'età mediana era 61 anni (*range* 43-71). Il 17,1 % (6/35) dei pazienti era diabetico mentre l'8.6% % (3/35) aveva una storia di epatocarcinoma. Il 42.1% (8/19) dei paziente, sottoposti a endoscopia presentava, presentava varici esofagee in anamnesi mentre il 2.9 % (1/35) storia di ascite.

Il 25.7% (9/35) dei pazienti era *naive* ed il 22.9%, (8/35) era affetto dal genotipo 1a.

Il livello di HCV-RNA basale era elevato nel 62.9% (22/35) della popolazione, considerando la carica virale elevata se maggiore di 800.000 UI/mL.

Per quanto concerne poi i parametri di laboratorio tutti confermavano indirettamente il compenso dell'epatopatia cronica. In particolare l'emogramma evidenziava soddisfacenti valori di emoglobina (14.3g/dL, *range* 11.9-16.8), di piastrine (132×10^3 /microL, *range* 58-307) e gli indici di protido-sintesi erano nella norma (INR 1.05, *range* 0.95-1.26 e albumina 4.2 g/dL, *range* 3.5-4.7).

La moderata attività epatocitonecrotica, espressa dall'alterazione delle transaminasi (AST 59 U/L, *range* 30-204; ALT 90U/L, *range* 27-352), risultava coerente con l'attiva replicazione virale mentre la bilirubina mediana era 0.64 mg/dL (*range* 0.30-2.67). La creatinina risultava di 0.7 mg/dL (0.43-1.27). Dei 35 pazienti arruolati 31 avevano terminato il trattamento mentre l'11.4% (4/35) dei pazienti non lo conduceva a termine per mancata risposta o EAS, incorsi nel 20% (7/35) del campione. Le caratteristiche generali dei pazienti sono riportate in dettaglio nella tabella 2.

Gruppo SMV

I maschi rappresentavano il 54.3 % (38/70) del campione mentre i cirrotici il 62.9% (44/70). L'età mediana era 65 anni (*range* 45-82). L'11.4 % (8/70) dei pazienti era diabetico mentre il 20% (13/70) aveva un'anamnesi di epatocarcinoma. Il 48.5 %

(16/33) del campione sottoposto a endoscopia, presentava varici esofagee in anamnesi mentre l'11.4% storia di ascite (8/70). Per quello che riguarda poi l'anamnesi di precedenti trattamenti il 47.1% (33/70) dei pazienti era *naïve*. Il 64.3% (45/70) dei pazienti riceveva RBV ed il 22.9% (16/70) era infetto dal sottogenotipo 1a. Il livello di HCV-RNA basale era elevato nel 60% (42/70) della popolazione. L'emogramma evidenziava soddisfacenti valori medi di emoglobina (13.9 g/dL, *range* 10.1-16.7), di piastrine ($125 \times 10^3/\text{microL}$, *range* 30-366) e gli indici di protido-sintesi erano nella norma (INR 1.1, *range* 0.9-1.6 e albumina 4 g/dL, *range* 2.9 -4.7). La moderata attività epatocitocentrica, era espressa dall'alterazione delle transaminasi (AST 56U/L, *range* 19-344; ALT 63 U/L, *range* 22-327) mentre la bilirubina mediana era 0.7 mg/dL (0.34-3.21). La creatinina risultava di 0.74 mg/dL (*range* 0.47-1.96).

Caratteristiche	Gruppo TVR	Gruppo SMV	P
Età (aa)	61 (43-71)	65 (45-82)	0.04
Diabete	17.1 % (6/35)	11.4% (8/70)	n.s.
Varici esofagee	42.1% (8/19)	48.5 % (16/33)	n.s.
Storia di ascite	2.9% (1/35)	11.4 % (8/70)	n.s.
Sesso Maschi	54.3% (18/35)	54.3% (38-70)	n.s.
Naïve	25.7% (9/35)	47.1 (33/70)	0.02
Stadio fibrosi Fibrosi F4	62.9% (22/35)	62.9% (44/70)	n.s.
Genotipo 1 a	22.9 % (8/35)	22.9% (16/70)	n.s.
Storia di HCC	8.6 % (3/35)	20% (13/70)	n.s.
HCV-RNA>800.000 UI/mL	62.9% (22/35)	60% (42/70)	n.s.
Bilirubina (mg/dL)	0.64 (0.30-2.67)	0.7 (0.34-3.21)	n.s.
AST (U/L)	59 (30-204)	56 (19-344)	n.s.
ALT (U/L)	90 (27-352)	63 (22-327)	0.01
Albumina (U/L)	4.2 (3.5-4.7)	4 (2.9-4.7)	0.05
PLT ($n \times 10^3/\text{microL}$)	132 (58-307)	125 (30-366)	n.s.
INR	1.05 (0.95-1.26)	1.1, (0.9-1.6)	n.s.
Hb (g/dL)	14.3 (11.9-16.8)	13.9 (10.1-16.7)	n.s.
Creatinina (mg/dL)	0.70 (0.43-1.27)	0.74 (0.47-1.96)	n.s.

Tabella 2

Caratteristiche dei pazienti nel gruppo TVR e nel gruppo SMV (i parametri sono espressi come mediana + range o come percentuale +n pz/ n tot).

Sicurezza

Gli EA segnalati durante il trattamento sono stati riportati nella tabella 2. Durante l'osservazione il 94.2% (33/35) dei pazienti trattati con TVR manifestavano almeno un qualche EA mentre si sono verificati nel 28.6% (20/70) dei pazienti in trattamento con SMV (p 0.000).

Anche quando stratificati per grado di fibrosi, gli EA erano più frequenti nel gruppo TVR rispetto a quello SMV (F3: 92.3% vs 19.2% p< 0.001, F4 95.5% vs 34.1%, p< 0.001). Quelli severi si sono verificati nel 20 % dei casi (7/35) del gruppo TVR e in nessun paziente del gruppo SMV (p 0.000).

Per quanto riguarda l'incidenza di EAS, non vi era differenza tra gli F3 trattati con TVR e quelli trattati con SMV mentre vi era tra i pazienti con fibrosi avanzata come riportato nella tabella 3:

STADIO	GRUPPO	AE (n/%)	Non AE (n/%)	P
F3	TVR	12 (92.3%)	1 (7.7%)	<0.001
	SMV	5 (19.2%)	21 (80.8%)	
F4	TVR	21 (95.5%)	1 (4.5%)	<0.001
	SMV	15 (34.1%)	29 (65.9%)	
		SAE	Non SAE	P
F3	SMV	1 (7.7%)	12 (92.3%)	n.s.
	TVR	0 (0%)	26 (100%)	
F4	SMV	6 (27.3%)	16 (72.7%)	0.001
	TVR	0 (0%)	44 (100%)	

Tabella 4

Eventi avversi ed eventi avversi di grado severo confrontati per grado di fibrosi.

Non vi erano differenze statisticamente significative, quando gli F3 venivano confrontati con gli F4 all'interno dei singoli gruppi: da sottolineare comunque la tendenza degli EA a stratificarsi nei pazienti con fibrosi avanzata nel gruppo TVR; a causa comunque dell'esiguo numero del campione non è stata raggiunta una significatività statistica (tabella 5):

GRUPPO	STADIO	AE (n/%)	Non AE (n/%)	P
TVR	F3	12 (92,3%)	1 (7,7%)	n.s.
	F4	21 (95.5%)	1 (4.5%)	
	SAE		Non SAE	
	F3	1 (7.7%)	12 (92.3%)	n.s.
	F4	6 (27.3%)	16 (72.7%)	
SMV	AE		Non-SAE	
	F3	5 (19.2%)	21 (80.8%)	n.s.
	F4	15 (34.1 %)	29 (65.9%)	
	SAE		Non-SAE	
	F3	0	26 (100%)	n.s.
	F4	0	44 (100%)	

Tabella 5

Eventi avversi ed eventi avversi gravi confrontati per grado di fibrosi nel gruppo TVR e nel gruppo SMV

Nel gruppo TVR un assistito veniva ricoverato in ambiente specialistico per un quadro di insufficienza respiratoria acuta secondaria a bronchiolite infettiva (documentata con TC torace ad alta definizione, fibrobroncoscopia ed emogasanalisi) con necessità di ossigeno-terapia, trattamento antibiotico endovena e sospensione della terapia antivirale (all'11^a settimana).

Un altro caso di SAE ha riguardato l'ospedalizzazione di una donna a causa di uno scompenso cardiaco destro, associato a tachiaritmie sopraventricolari, in paziente con anamnesi positiva per cardiopatia restrittiva, peraltro stabile nel tempo e per la quale le valutazioni specialistiche pre-trattamento antivirale avevano escluso controindicazioni cardiologiche. Il ricovero occorreva immediatamente dopo il primo trimestre di terapia antivirale ma il trattamento con pegIFN/RBV non veniva sospeso per due motivi; il buon controllo dello scompenso cardiaco con la terapia medica, instaurata durante la degenza e i molteplici fattori di rischio per lo sviluppo di epatocarcinoma: la paziente comunque dopo un iniziale negativizzazione della terapia risultò *relapse* al termine del trattamento.

Gli altri 5 EAS riguardavano tutti casi di anemia, tali da richiedere ospedalizzazione per necessità di emotrasfusione.

Gli unici due casi d'interruzione precoce del trattamento si sono verificati all'11^a settimana: uno riguardava, come scritto, il paziente con il grave evento infettivo, l'altro una paziente, intollerante alla triplice terapia, che aveva sviluppato molteplici eventi avversi ma nessuno di gravità > G2. Nessun paziente ha presentato reazioni cutanee di grado severo. In nessuno dei due gruppi si sono osservati decessi. Nel gruppo TVR i fattori predittivi negativi di EA erano l'utilizzo di RBV e di TVR.

Nel gruppo TVR gli EA più frequenti sono risultati: anemia (77.1%, 27/35) e astenia (62.9%, 22/35), seguite da prurito cutaneo o anale (48.6%; 17/35), disturbi psichiatrici (37.1%, 13/35), dispepsia (31.4%; 11/35), artralgie (22.9%;8/35), secchezza delle mucose (20%; 7/35), dermatopia (8.6%; 3/35). Nel gruppo SMV gli EA più frequenti sono risultati invece l'anemia (14.3%; 10/70) e l'astenia (16.7%; 10/60), seguite in ordine di frequenza da prurito (5.7%; 4/70), disturbi psichiatrici (4.3%; 3/70), dermatopia (2.9; 2/70), artralgie (1.4%; 1/70) e secchezza delle mucose (1.4%; 1/70).

La tabella numero 6 riporta gli EA più frequenti:

EVENTO AVVERSO	Gruppo TVR (%/n)	Gruppo SMV (%/n)	P
Evento avverso grave	20 (7/35)	0 (0/70)	0.000
Eventi avversi	94.2 (33/35)	28.6 (20/70)	0.000
SINGOLI EVENTI AVVERSI			
Dispepsia	31.4 (11/35)	0(0/70)	0.000
Prurito	48.6 (17/35)	5.7 (4/70)	0.000
Anemia	77.1 (27/35)	14.3 (10/70)	0.000
Astenia	62.9 (22/35)	16.7(10/60)	0.000
Secchezza delle mucose	20 (7/35)	1.4 (1/70)	0.002
Dermopatia	8.6 (3/35)	2.9 (2/70)	n.s.
Disturbi psichiatrici	37.1 (13/35)	4.3 (3/70)	0.000
Artralgie	22.9 (8/35)	1.4 (1/70)	0.000

Tabella 6

Elenco degli eventi avversi

L'anemia, l'evento avverso più frequente in assoluto, era significativamente maggiore nei pazienti trattati con TVR laddove non vi erano differenze statisticamente significative nei livelli di emoglobina pre-trattamento tra i due gruppi.

Nel gruppo TVR il 74.3% (26/35) dei pazienti necessitavano infatti della riduzione delle dosi di RBV, il 25.7% (9/35) del supporto trasfusionale e il 28.6% (10/35) del trattamento con fattori di crescita (tabella 7). Non stupisce il dato della sospensione della RBV solo nel 2.9% (1/35) dei casi, dato per altro atteso vista la necessità della combinazione obbligatoria del TVR con RBV per le prime 12 settimane, a differenza di quanto accadeva nel gruppo SMV dove l'utilizzo della RBV era limitato solo ad alcune categorie di pazienti.

Nel gruppo SMV nessun paziente aveva bisogno di supporto trasfusionale, il 13.3% (6/45) di ridurre la RBV laddove prescritta, il 2.2% (1/45) di sospenderla e l'1.4% (1/70) di ricorrere a eritropoietina.

:

ANEMIA	Gruppo TVR %(n)	Gruppo SMV % (n)	p
Totale	77.1 (27/35)	14.3 (10/70)	0.000
Riduzione RBV	74.3 (26/35)	13.3 (6/45)	0.000
Sospensione RBV	2.9 (1/35)	2.2 (1/45)	0.000
Necessità di EPO	28.6 (10/35)	1.4 (1/70)	0.000
Necessità di trasfusione	25.7 (9/35)	0 (0/70)	0.000

Tabella 7

Anemia e provvedimenti terapeutici: differenze tra gruppo TVR e SMV

Per quanto riguarda gli altri EA presi singolarmente tutti erano significativamente aumentati nel gruppo TVR rispetto al gruppo SMV ad eccezione delle dermatopie.

Efficacia

La tabella 8 mostra i dati relativi al numero di soggetti con SVR, confrontando i dati relativi al gruppo SMV e al gruppo TVR, sia complessivamente che stratificando i pazienti per il grado di fibrosi: i pazienti nel gruppo SMV avevano tassi di risposta migliori rispetto al gruppo TVR (91.4% vs 71.4%), non essendovi invece differenze significative in termini di SVR confrontando poi i due gruppi, per quanto riguarda il grado di fibrosi F3.

FIBROSI	GRUPPO	SVR n (%)	Non SVR n (%)	P
Totale	TVR	25 (71.4%)	10 (28.6%)	0.01
	SMV	64 (91.4%)	6 (8.6%)	
F3	TVR	12 (92.3%)	1 (7.7%)	n.s.
	SMV	26 (100%)	0	
F4	TVR	13 (59.1%)	9 (40.9%)	0.002
	SMV	38 (86.4%)	6 (15.6%)	

Tabella 8

Tassi di SVR: confronto cumulativo e stratificato per fibrosi tra gruppo SVR e TVR

Nel gruppo TVR la riduzione delle dosi di RBV non peggiorava comunque i tassi di SVR; anche nel gruppo SMV i pazienti che non la assumevano rispetto a quelli che l'assumevano non peggioravano i tassi di risposta al trattamento antivirale, anche quando stratificati per fibrosi (tabella 9):

FIBROSI	GRUPPO	SVR	Non-SVR	P
F3	SMV - RBV	12/12 (100)	0 (0)	n.s.
	SMV	14/14 (100)	0 (0)	
F4	SMV - RBV	29/33 (87.9)	4/33 (12.1)	n.s.
	SMV	9/11 (81.8)	2/11 (18.2)	

Tabella 9

Gruppo SMV: utilizzo di RBV e tassi di SVR.

Nei singoli gruppi, non vi erano differenze in termini di SVR, stratificando poi la popolazione sulla base del genotipo 1a o 1b e della esposizione o meno a precedenti trattamenti (tabella 10):

GRUPPO	GENOTIPO	SVR n (%)	Non-SVR n (%)	P
TVR	Gen 1 b	21/27 (77.8)	6/27 (22.2)	n.s.
	Gen 1 a	4/8 (50)	4/8 (50)	
SMV	Gen 1 b	50/54 (92.6)	4/54 (7.4)	n.s.
	Gen 1 a	14/16 (87.5)	2/16 (12.5)	
PRECEDENTE TP		SVR	Non-SVR	P
TVR	Naive	5/7 (71.4)	2/7 (28.6)	n.s.
	Experienced	20/28 (71.4)	8/28 (28.6)	n.s.
SMV	Naïve	32/33 (97)	1/33 (3)	n.s.
	Experienced	32/37 (86.5)	5/37 (13.6)	n.s.

Tabella 10

Tassi di SVR in base al genotipo e la pregressa esposizione a terapie antivirali

Sono stati infine confrontati i principali indicatori biochimici nei due gruppi (tabella 11), prima di iniziare il trattamento e a 12 settimane dalla sospensione della terapia, al fine di individuare eventuali miglioramenti nei pazienti che avevano ottenuto l'SVR; Nel gruppo TVR, la bilirubina era l'unico parametro a migliorare significativamente (F3: p 0.04; F4: p 002) mentre nel gruppo SMV era la sola albumina a migliorare (F3: p 0.01; F4: p 001).

PAZIENTI CON SVR								
GRUPPO TVR (mediana/range)					GRUPPO SMV (mediana/range)			
Parametro	Stadio	T0	W12 FU	P	T0	W12 FU	P	
Bilirubina	F3	0.55 (0.38-2.6)	0.38 (0.38-2.87)	0.04	0.70 (0.38-1.4)	0.64 (0.45-1.56)	n.s.	
	F4	0.73 (0.46-1.35)	0.45 (0.30-0.79)	0.02	0.66 (0.34-3.21)	0.59 (0.32-2.21)	n.s.	
INR	F3	1.02 (0.98-1.1)	1.02 (0.97-1.26)	n.s.	1.04 (1.00-1.14)	1.04 (1.00-2.21)	n.s.	
	F4	1.05 (0.97-1.23)	1.07 (0.9-1.15)	n.s.	1.09 (0.90-1.57)	1.12 (1.00-1.38)	n.s.	
Albumina	F3	4.0 (3.5-4.7)	4.3 (2.5-4.7)	n.s.	4.0 (3.3-4.7)	4.4 (3.6-4.8)	0.01	
	F4	4.2 (3.8-4.6)	4.4 (2.5-4.6)	n.s.	3.9 (2.9-4.7)	4.2 (3.5-4.9)	0.01	
Creatinina	F3	0.72 (0.43-1.27)	0.83 (0.6-1.17)	n.s.	0.79 (0.5-1.03)	0.80 (0.58-1.18)	n.s.	
	F4	0.73 (0.59-1.11)	0.79 (0.68-0.97)	n.s.	0.72 (0.47-1.96)	0.75 (0.50-2.9)	n.s.	
Piastrine	F3	171 (112-307)	177 (102-339)	n.s.	171 (79-366)	179 (100-323)	n.s.	
	F4	124 (73-245)	114 (71-252)	n.s.	99 (30-253)	109 (53-270)	n.s.	

Tabella 11

Principali parametri biochimici prima e dopo il trattamento.

2.4 DISCUSSIONE

Rispetto alla terapia con pegIFN/RBV, che per anni ha rappresentato il punto di riferimento nel trattamento dell'epatite C, il TVR ha costituito il capostipite dei DAA ed il primo farmaco ad interferire direttamente con i meccanismi della replicazione virale; con tutti i limiti legati alla necessità di prescrizione in associazione con le formulazioni di interferone peghilato, ha permesso di incrementare in maniera clinicamente significativa i tassi di SVR in una categoria di pazienti particolarmente a rischio di evoluzione e/o complicanze come quella costituita dai pazienti con fibrosi avanzata.

La triplice terapia con TVR-pegIFN/RBV ha rappresentato il “gold standard” di trattamento solo per un periodo di tempo limitato a causa della prescrivibilità limitata in Emilia Romagna al periodo compreso tra maggio 2013 e febbraio 2015.

La messa in commercio con annessa possibilità prescrittiva di vari DAA ha permesso di mettere a punto regimi terapeutici combinati come già accaduto in passato per il virus dell'HIV. La lezione appresa nelle due decadi passate dallo sviluppo dell'*highly active antiretroviral therapy*, suggerisce che il trattamento dell'HCV deve basarsi su una combinazione di farmaci, finalizzata a evitare la comparsa di *escape* virali e prevenire la resistenza. Ciò ha rappresentato una scelta epocale, consentendo di abbandonare i trattamenti a base di interferone e permettendo un guadagno in termini di efficacia e sicurezza.

Il SMV ha costituito un passo in avanti fondamentale rispetto al TVR; la sua combinazione con l'inibitore della RNA polimerasi NS5B è stata una delle prime associazioni di DAA ad essere testate nei pazienti con fibrosi avanzata, affetti da genotipo 1.

Nella nostra esperienza i pazienti trattati con TVR presentavano tassi di SVR del 71.4% sia nella popolazione *naive* che in quella già sottoposta a precedenti trattamenti: tali dati sono in linea con quelli della letteratura dove le percentuali di risposta nei pazienti con fibrosi avanzata sono del 68% nei pazienti *naive*, lievemente peggiori invece quelle globali (57%) probabilmente per una maggiore presenza di pazienti *null responder* ai precedenti trattamenti [17].

Nella nostra casistica, con le riserve legate all'esiguo numero del campione, il genotipo 1a e l'esposizione a precedenti trattamenti, la riduzione della dose di RBV, non hanno

influenzato i tassi di SVR mentre veniva confermata la tendenza dei pazienti con cirrosi a rispondere meno efficacemente rispetto ai pazienti con fibrosi F 3 (p 0.055). Per quanto riguarda la sicurezza il trattamento con TVR era gravato dal 94.2% (33/35) di eventi avversi e dal 20% (7/35) di eventi avversi gravi; il tasso di questi ultimi era in linea con quelli riportati nello studio EAP (16%)[17].

L'evento avverso più frequente in generale e tra quelli gravi è stato rappresentato dall'anemia a causa dell'azione emolizzante combinata esercitata sia dal TVR che dalla RBV ma non ha rappresentato di per sé un ostacolo alla conclusione del trattamento grazie al monitoraggio costante dell'emogramma e alla pronta messa in atto delle misure di supporto.

Gli altri due eventi avversi gravi, un episodio infettivo e uno di scompenso cardiaco sembrano trovare spiegazione più nel concomitante uso dell'interferone che in una presunta tossicità diretta del TVR.

Il SMV è la naturale evoluzione nell'ambito della ricerca scientifica degli inibitori delle proteasi di prima generazione, migliorandone sia il profilo di efficacia che di sicurezza nei pazienti con infezione da genotipo 1.

La combinazione con interferone peghilato e RBV ha permesso di elevare ulteriormente i tassi di SVR: la presenza di un polimorfismo Q80K rappresenta però la discriminante: nello studio clinico QUEST-1, condotto su pazienti *naive*, i tassi di SVR erano del 52% (31/60) nelle persone con polimorfismo, confrontati con l'85% delle persone che non lo avevano [24]. Per tale motivo le principali linee guida internazionali e nazionali sconsigliano questa terapia in pazienti con genotipo 1a e polimorfismo della mutazione q 80 k, specie se già non responsivi a precedenti cicli di terapia.

La combinazione del SMP con SOF e RBV ha rappresentato invece uno dei primi regimi "interferon free" adottati nei pazienti con fibrosi avanzata e genotipo 1 anche se l'esperienza maturata poi con altre combinazioni di DAA, non lo rendono il regime di prima scelta nei pazienti non già responsivi a precedenti trattamenti, specie se genotipo 1a. I dati di SVR riportati in letteratura sono globalmente del 90%, senza differenze per il grado di fibrosi e l'aggiunta della RBV non sembra impattare sui tassi di risposta [22]. La nostra esperienza ha confermato tassi di SVR sovrapponibili (91.4%) all'esperienza internazionale e l'ininfluenza del grado di fibrosi e della presenza della RBV sulle percentuali di risposta.

Complessivamente il regime di trattamento a base di SMV si è rilevato più efficace e sicuro di quello a base di TVR; soltanto nei pazienti con fibrosi F3 il TVR risultava di efficacia non inferiore al SMV.

La presenza di genotipo 1a e l'esposizione a precedenti trattamenti, storicamente due fattori prognostici negativi di risposta, non hanno condizionato nei due gruppi i tassi di SVR, con le riserve legate al numero limitato del campione.

Sempre con i limiti legati al confronto di due popolazioni sottoposte a regimi combinati e differenti di terapia (il primo associato a PegIFN, il secondo a un inibitore dell'NS5B), è evidente il miglioramento del profilo di sicurezza della terapia: in particolare tutti gli eventi avversi, presi sia globalmente che singolarmente, si sono significativamente ridotti. Unica eccezione è stata rappresentata dai tassi di *rash* cutaneo tra i due gruppi, evento avverso potenziale di ambo gli inibitori delle proteasi oltre che della RBV.

L'assenza dell'interferone peghilato ha permesso poi di abbattere significativamente i tassi degli eventi avversi a questo legati come ad esempio i disturbi del tono dell'umore, l'astenia e le artralgie.

Nel gruppo TVR l'alta percentuale di pazienti con astenia (62.9%) è stata coerente con i tassi di anemia (77.1%) come dimostrato dal crollo percentuale di entrambe nel gruppo SMV (anemia 14.3% e astenia 16.7%); anche le percentuali di dispepsia sono speculari e strettamente correlate fra di loro (31.4% nel gruppo TVR vs 0% nel gruppo SMV). Questi eventi avversi, pur non essendo generalmente causa dell'interruzione della terapia antivirale, non vanno sottovalutati dal punto di vista clinico, in quanto possono minare l'aderenza del paziente al trattamento.

L'assenza di eventi avversi di grado severo nel gruppo SMV e i tassi significativamente inferiori di anemia (14.3% vs 77.1 %) tra i due gruppi si sono tradotti poi in un guadagno in termini di terapie di supporto (utilizzo di trasfusioni e fattori di crescita) e ospedalizzazioni.

Il ruolo della RBV, più volte dibattuto, nell'ambito dei regimi liberi da interferone, si mantiene controverso; nel gruppo TVR la sua riduzione non modificava i tassi di efficacia così come la sua assenza non incideva sulle percentuali di SVR nel gruppo SMV. Il suo utilizzo potrebbe essere perciò confinato a pazienti difficile da trattare come quelli cirrotici, genotipo 1a, già non responsivi a precedenti cicli di terapia.

Il miglioramento limitato del grado di funzione epatica nei pazienti che ottenevano una guarigione, tradotto nella riduzione significativa solo dei livelli di bilirubina nel

gruppo TVR e dell'albumina nel gruppo SMV, non deve stupire e trova risposta nell'elevato numero di pazienti con fibrosi avanzata, nel generale quadro di compenso funzionale dell'epatopatia e nel breve periodo di osservazione (12 settimane dalla sospensione del trattamento).

In conclusione i nostri risultati sono in linea con quelli della letteratura. Il SMV combinato con SOF +/-RBV è risultato essere superiore al TVR combinato con PegIFN/RBV nei pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi e questo giustifica la misura di *de-listing* da parte del Sistema Sanitario Nazionale, al fine di garantire la sostenibilità del SMV, con la riclassificazione in classe C del TVR dal maggio 2015. La combinazione di SMV con SOF è risultata più sicura della triplice terapia con TVR; in pazienti con epatopatia compensata (classe A di Child Pugh) non vi sono stati eventi avversi di grado severo e l'attenta selezione delle terapie concomitanti ha impedito che si verificassero interazioni nocive. I dati ottenuti giustificano i regimi terapeutici attualmente vigenti in Italia e approvati dall'AIFA per i pazienti con fibrosi avanzata o cirrosi che prevedono l'utilizzo di SMV in combinazione con SOF +/- RBV, dipendentemente dal genotipo, dallo stadio di malattia o da precedenti trattamenti.

Bibliografia

1. Jacobson IM, et Al. A practical guide for the use of boceprevir and telaprevir for the treatment of hepatitis C. *Journal of Viral Hepatitis*, 2012; 19 (Suppl. 2), 1–26.
2. Pacanowski M, et Al. New Genetic Discoveries and Treatment for Hepatitis C. *JAMA*, 2012; 307- 18, 1921-1922.
3. European Association for the Study of the Liver, EASL Clinical Practice Guidelines: Management of hepatitis C virus infection. *Journal of Hepatology*, 2011; 55, 245–264.
4. Poordad F, et Al. Hepatitis C: current standard of care and emerging direct-acting antiviral agents. *Journal of Viral Hepatitis*, 2012; 19: 449–464.
5. Thompson AJ, et Al. Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus. *Gastroenterology*, 2010;139: 120–129.
6. A. J. Thompson. Genetic Factors and Hepatitis C Virus Infection. *Gastroenterology*, 2012; 142,1335–1339.
7. Webster DP, et Al. Hepatitis C. *Lancet*, 2015; 21; 385 (9973):1124-35.
8. European Association for Study of Liver. EASL Recommendations on Treatment of Hepatitis C, 2015. *J Hepatol*, 2015; 63(1):199-236.
9. Documento di indirizzo dell'Associazione Italiana per lo Studio del Fegato per l'uso razionale di antivirali diretti di seconda generazione nelle categorie di pazienti affetti da epatite C cronica ammesse alla rimborsabilità in Italia. http://www.webaisf.org/media/34581/documento_hcv_15.12.2015.pdf . Documento pubblicato on line in data 17 Dicembre 2014, aggiornamento del 15 Dicembre 2015.
10. Banerjee D, et Al. Review article: safety and tolerability of direct-acting antiviral agents in the new era of hepatitis C therapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016; 43(6): 674-96.
11. Poordad F, et Al. Boceprevir for untreated chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med*, 2011; 364(13): 1195–1206.
12. Holmes JA, et Al. Interferon-free combination therapies for the treatment of hepatitis C: current insights. *Hepat Med*. 2015 Nov 2;7:51-70.

13. Lohmann V, et Al. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 1999; 285(5424): 110– 113.
14. Smith LS, et Al. Telaprevir: An NS3/4A Protease Inhibitor for the Treatment of Chronic Hepatitis C. *Ann Pharmacother*, 2011; 45: 639-48.
15. Zeuzem S, et Al. Telaprevir for Retreatment of HCV Infection. *N Engl J Med*, 2011; 364: 2417-28.
16. Jacobson IM, et Al. Telaprevir for previously untreated chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med*, 2011; 364(25): 2405-16.
17. Colombo M, et Al. Sustained virological response with telaprevir in 1078 patients with advanced hepatitis C: The international telaprevir access program. *Journal of Hepatology*, 2014; 61: 976–983.
18. Pearlman B. Protease inhibitors for the treatment of chronic hepatitis C genotype-1 infection: the new standard of care. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(9): 717-28.
19. Reddy HR, et Al. Simeprevir versus telaprevir with peginterferon and ribavirin in previous null or partial responders with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (ATTAIN): a randomised, double-blind, non-inferiority phase 3 trial. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15: 27–35.
20. Lawitz E, et Al. Simeprevir plus sofosbuvir, with or without ribavirin, to treat chronic infection with hepatitis C virus genotype 1 in non-responders to pegylated interferon and ribavirin and treatment-naive patients: the COSMOS randomised study. *Lancet*, 2014; 384: 1756–1765.
21. OLYISIO®, scheda tecnica; http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2014/20140514128513/anx_128513_it.pdf.
22. González-Grande R, et Al. New approaches in the treatment of hepatitis C. *World J Gastroenterol*. 2016; 22(4): 1421-1432.
23. Lee WM et Al. Evolution of the HALT-C Trial: pegylated interferon as maintenance therapy for chronic hepatitis C in previous interferon nonresponders. *Control Clin Trials*, 2004; 25(5): 472-492.
24. Jacobson IM, et Al. Simeprevir with pegylated interferon alfa 2a plus ribavirin in treatment-naive patients with chronic hepatitis C virus genotype 1 infection (QUEST-1): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2014; 384: 403-13.