

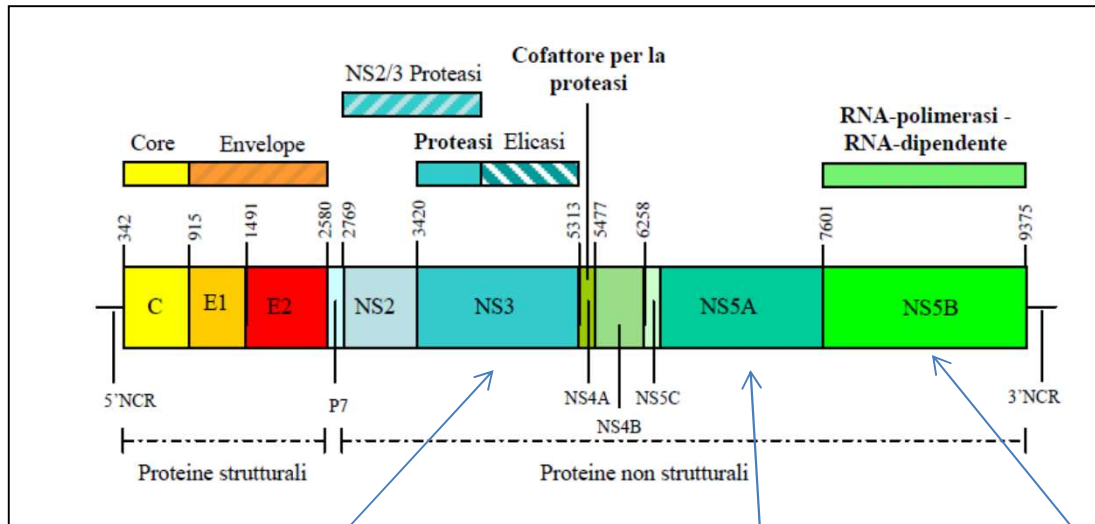
11-14 Novembre 2017

La resistenza ai farmaci ad azione diretta contro HCV: criticità e prospettive

Anna Rosa Garbuglia

Lab Virologia, IRCCS L. Spallanzani, INMI ROMA

HCV e DAA



Attualmente, sono stati approvati **11 farmaci** per il trattamento dell'epatite cronica C, Suddivisi in **3 classi**

INIBITORI NS3

Simeprevir (SMV)
Paritaprevir (PTV)
Grazoprevir (GZR)
Asunaprevir (ASV)

INIBITORI NS5A

Daclatasvir (DCV)
Elbasvir (EBR)
Ledipasvir (LDV)
Ombitasvir (OBV)
Velpatasvir (VEL)

INIBITORI NS5B

Sofosbuvir (SOF)
Dasabuvir (DSV)

HCV e DAA

- L'HCV presenta una ampia distanza genetica dovuta all'assenza di proof-reading della RNA-dependent RNA polimerasi che può generare con una produzione di 100 particelle mutanti / giorno .
- Conseguenza: presenti nella quasispecie virale virioni spontaneamente prodotti resistenti ai DAA

Terminologia attinente alle HCV Resistenza

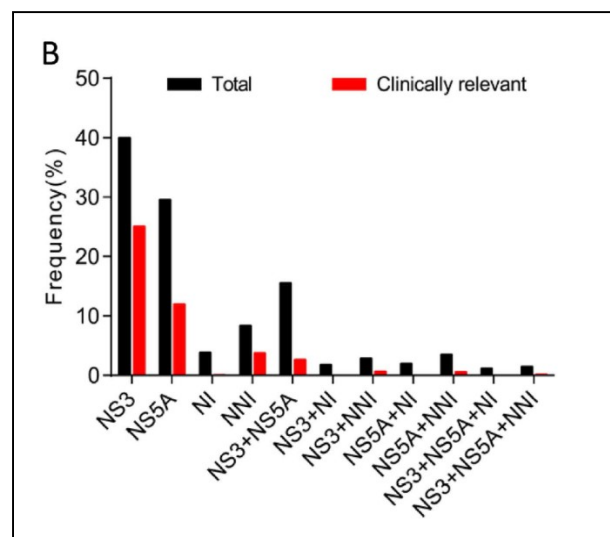
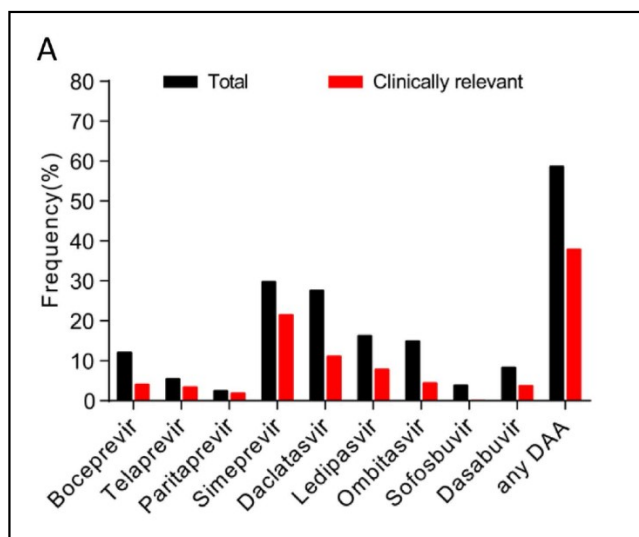
RAV(resistance –associated variants)= variante genetica di un virus meno sensibile ad uno o più farmaci DAA

RAP(resistance associated polymorphism)= tutte le mutazioni identificate nelle posizioni aminoacidiche associate a DAA resistenza

RAS (resistance associated substitution)= mutazioni specifiche associate a resistenza farmaco specifico e genotipi specifico

Qual è la prevalenza delle RAS nell'HCV?

- 1459 sequenze analizzate le RAV rappresentavano il 58.7% della popolazione analizzata (↓ almeno 1 RA)
- NS3: 40% RAV(RAS :21.5% SIMEPREVIR,1.9% PARITAPREVIR);
- NS5A:29.6% RAV (RAS:11.2% Daclatasvir, 7.8% Ledipasvir; 4.4% Ombitasvir.
- NS5B:3.9% RAV (RAP :1.7% Sofosbuvir, 8.4%Dasabuvir)



NS3 protease (180 aa)

Boceprevir	V36	F43	T54	V55	V107	R155	A156	V158	D168	I/V170	M175
	A A G G M M L	S V	A A S S C G	A A I	I I	K K C V V F G	S S T T V V F G	I I	N Y	F A T T V	L
Telaprevir	V36	F43	T54	V55	I132	R155	A156		D168	I/V170	
	A A G G I I M M L L	S	A A S S	A A	V	K K G M T	S F T S V T I V N		N	A	
Simeprevir	Q41	F43		Q80	R109	S122	R155	A156	D168	I/V170	
	R	S V I		K K R R H	K	G A R I R T	K Q K	T V	A A E E H H V V F T	T	
Paritaprevir	V36	F43		V55	Y56		R155	A156	D168		
	A A G G M	L		I H H H			K K T T	T T	A A V E E V V Y K H T		

NS5A Domain1 (213 aa)

Daclatasvir	K/T/Q24	M/M/L/L/F28	P29	Q/R/Q/L30	L31	P32	H/P/T58	E62	A/C92	Y93	//
	H	A F S T M S M T T V G	S X	D G K H E H S G P H Q K R T	I F M F M M M I M V V M V V	L L L L L S X S	D S A R N P S	D	K R	C H H H H N N R N	//
Ledipasvir	K/T/Q24	M/M/L/L/F28		Q/R/Q/L30	L31	P32	S38	H/P/T58	A/C92	Y93	//
	G N R	A T G T		E H L R G K T	M M M M M M V V V V V I	L L L L L F F S S S	D D		K T	C C H H H F H N H N S	//
Ombitasvir	K/T/Q24	M/M/L/L/F28		Q/R/Q/L30	L31		H/P/T58			Y93	//
	A	T F S T V V T V V M	S	R E H	V V V V V F F		D A N S			C H H H H H N N N S	//

Importanti nel trattamento del genotipo **1a**(Q80K), permangono per qualche mese nel plasma.

- GT1a
- GT1b
- GT2
- GT3
- GT4
- GT6

Le resistenze NS5A sono le più frequentemente nei fallimenti terapeutici e sono quelle che permangono maggiormente in **tutti i genotipi (1-6)**

NS5B Polymerase (519 aa)-Nucleotide Analog

Sofosbuvir	L159	T179	S282	M289	V321
	F F F	A	T T T T	I I I L L L	A A A

NS5B Polymerase (519 aa)- Non-nucleoside Analog

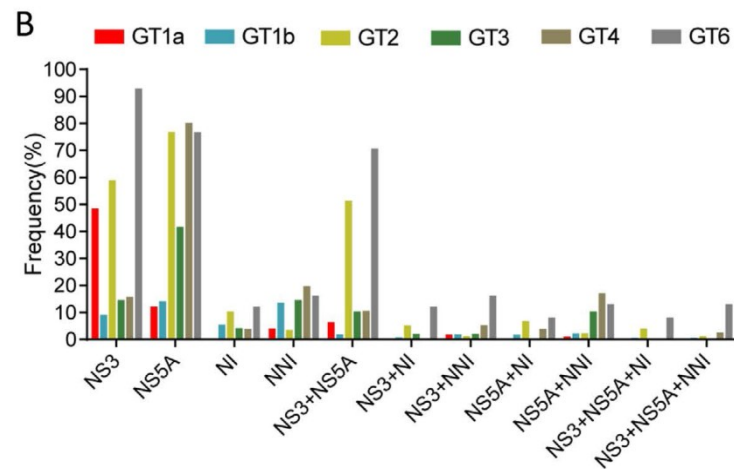
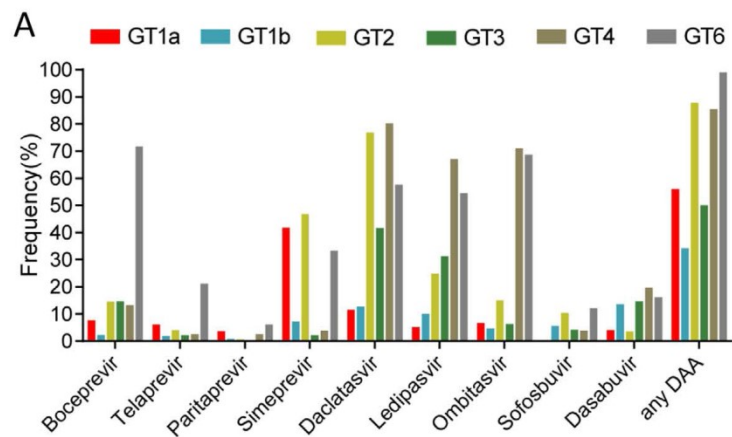
Dasabuvir	//		C316	L320	S368	A395	N411	M414	N444	C445	E446	Y448	C451	A553	G554	S556	D559	Y561	S565	I585
			H H N N N Y Y	F	T T	G	S S	I I T T	K	F	K K Q Q	C C H H	S	I I T T V V	S S	G G G G N N R R	G G N	H H	F	V

- GT1a
- GT1b
- GT2
- GT3
- GT4
- GT6

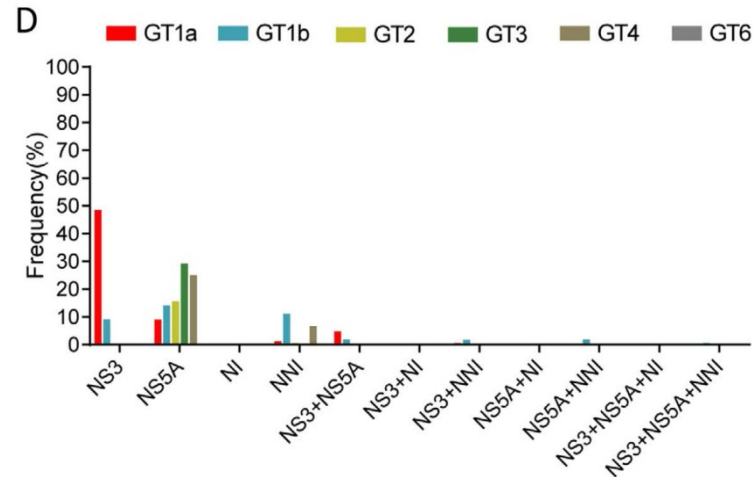
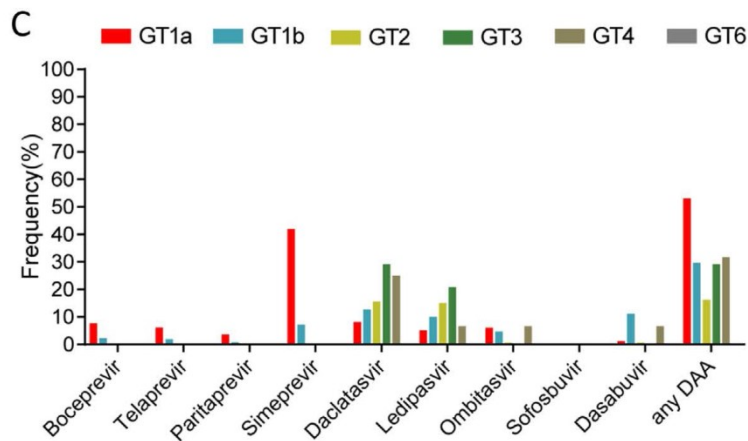
Chen ZW et al, Science Report 2016

Le NS5B RAS conferiscono bassa fitness al virus. Si osservano raramente al T0 e al T fallimento terapeutico scompaiono molto rapidamente (GT1-6).

Chen ZW et al, Science Report 2016

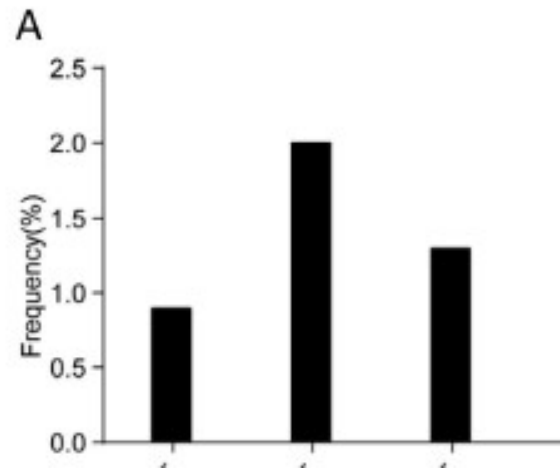


•Le % RAP variano a seconda del genotipo considerato e DAA (DCV-gen2; ombitasvir-gen6)



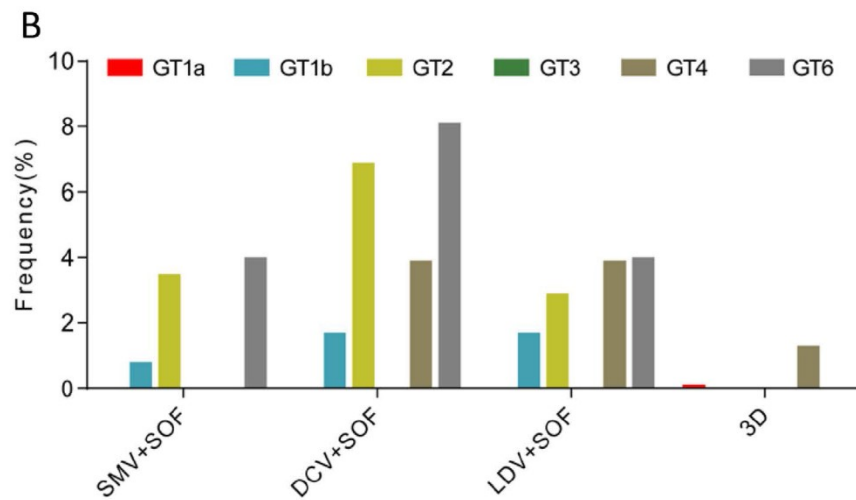
•Se consideriamo le RAS clinicamente rilevanti, il genotipo 1a ha una frequenza del 40% RAS Simeprevir , gen3 27% dei RAS Daclatasvir

Frequenza di mutazioni RAS verso diversi DAA associate

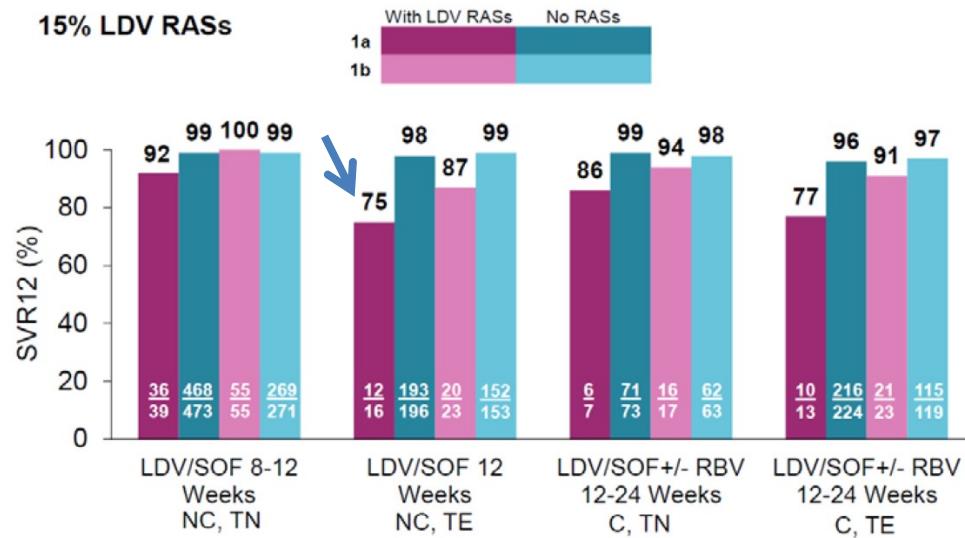


- RAS associate sono rare , soprattutto verso NS3+NS5A+NS5B (<0.5%)

- RAS DCV+SOF sono le più frequenti, in particolare nel gen 2 e gen 6, raro nel gen 3, dove però si osserva un maggior numero di fallimenti terapeutici DCV+SOF



Presenza di RAS e SVR



Perez et al. *Gems*, 2017

L'influenza di RAS sull'efficacia dei farmaci, varia a seconda del genotipo e del farmaco considerato E **DANNO EPATICO**

Genotipo 3: è il genotipo che più alta % di fallimenti. Nei soggetti trattati con **DCV+SOF**, la mutazione Y93H è presente nel 5-10% dei casi al baseline. Nei soggetto cirrotici si aveva il 67% di SVR . Con aggiunta di **RBV** la SVR raggiunge l'**86%**.

Table 2. Fold-Changes in EC₅₀ for Select Resistance-Associated Substitutions for HCV Drugs, by Genotyp

HCV Drug	Fold-Change						
	RASs in HCV Genotype 1a						RASs in 1b
	M28T	Q30R	L31M	L31V	Y93H	Y93N	L31V
Daclatasvir	>100x	>1000x	>100x	>1000x	>1000x	>10,000x	<10x
Elbasvir	20x	>100x	>10x	>100x	>1000x	>1000x	<10x
Ledipasvir	20x	>100x	>100x	>100x	>1000x	>10,000x	>20x
Ombitasvir	>1000x	>100x	<3x	>100x	>10,000x	>10,000x	<10x
Pibrentasvir	<3x	<3x	<3x	<3x	<10x	<10x	<3x
Ruzasvir ^b	<10x	<10x	<10x	<10x	<10x	<10x	<10x
Velpatasvir	<10x	<3x	20x	50x	>100x	>1000x	<10x

...e non tutte le RAS conferiscono lo stesso grado di resistenza verso uno stesso farmaco in genotipi diversi

Table 1. Resistance-Associated Substitutions in the Hepatitis C Virus (HCV) NS5A Protein 5A (NS5A) Gene Associated With Resistance to NS5A Inhibitors, by Ge

	HCV Genotype	
	1a	1b
Resistance-associated substitutions	K24E/R/N	M/L28M/G/T
	M28A/T/G/V	R30H
	Q30R/K/E/H/L/Y/G/T/D/I	L31V/M/F/I
	L31M/V/F	P58S
	H54R	Y93H/N/C/S/R
	H58D/P/R	
	E62D	
	Y93H/N/C/S/F/L	

Table 3. Recommendations for NS5A RAS Testing by Regimen and Clinical Characteristics (Treatment Ex

	HCV Genotype 1a				HCV Genotype 1b			
	TN		TE ^a		TN		TE ^a	
HCV Regimen	NC	C	NC	C	NC	C	NC	C
Elbasvir/grazoprevir ^b	+	+	+	+	-	-	-	-
Ledipasvir/sofosbuvir ^b	-	+/-	+/-	+/-	-	-	-	-
Paritaprevir/ritonavir/ombitasvir ^b plus dasabuvir	-	-	-	-	-	-	-	-
Sofosbuvir plus daclatasvir	-	-	-	-	-	-	-	-
Sofosbuvir/velpatasvir ^b	-	-	-	-	-	-	-	-

In quali casi va eseguito il test di HCV Resistenza ad inizio terapia?

- **NS3-Q80K** va identificata nei soggetti gen **1a** prima della terapia con simeprevir

- **NS5A-Gen 1a**(LDV/SOF): RAS NS5A vanno identificate:

- a) **in soggetti senza cirrosi non naive**. Se sono presenti

- Mutazioni con >100 x Res, il trattamento va prolungato per 12 settimane e aggiunta la RBV.

- b) **Pazienti 1a con cirrosi**, la presenza di mutazione con >100 x Res , il trattamento va prolungato per 24 mesi con RBV

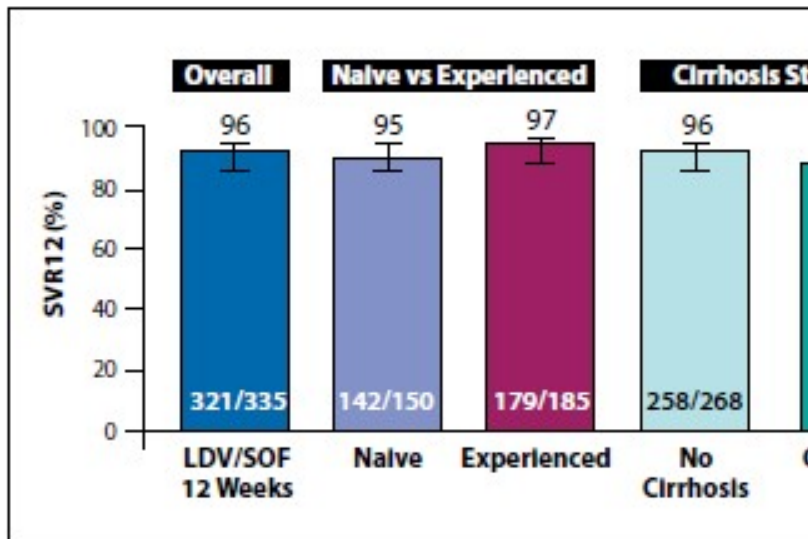
- c) **Nei soggetti gen3 naive cirrotici**. Se è presente la mutazione Y93H il trattamento dovrebbe essere prolungato per 24 settimane
e dovrebbe essere inclusa la RBV

PAZIENTI HIV/HCV coinfetti

- Nei soggetti HIV positivi, il 13 % dei decessi è legato a disfunzioni epatiche . L'infezioni HCV ha un decorso molto più rapido verso l'epatocarcinoma rispetto ai soggetti monoinfetti.
- I pazienti HIV/HCV coinfetti devono essere trattati o ritrattati nel caso di fallimento terapeutico con le persone monoinfette, dopo avere considerato possibili interazioni dei DAA con i farmaci antivirali

(www.hep-druginteractions.org)

- E' stata osservata una riattivazione di HBV in pazienti trattati con DAA in soggetti che al momento dell'inizio terapia erano HBV DNA negativi (tenofovir fumarato o tenofovir alafenamide)(Fabbri G et al BMCID 2017). Il test HBsAg, anti-HBs, anti-Hbc devono essere eseguiti prima di inizio terapia DAA.



- L'SVR è stata associata ad una sostanziale riduzione di mortalità nei pazienti HIV/HCV coinfetti.
- Un innalzamento dell'HCV RNA viral load dopo SVR12 è dovuto frequentemente ad una reinfezione piuttosto che ad un relapse del virus.

Figure 2. SVR12 in HIV/HCV coinfection patients treated with sofosbuvir and ledipasvir.

Quando eseguire i test di HCV Resistenza nei soggetti con fallimento terapeutico Con DAA da ritrattare?

•NS3: NS3 RAS emergono nel 50% dei soggetti trattati (range 25-78%),RAS 155,156, 168 sono le più frequenti. R155K , osservata nel genotipo 1a, non influenza l'attività del grazoprevir. **D168** e **A156** varianti sono clinicamente rilevanti e influenzano l'attività di tutti gli IP , ma avendo scarsa fitness scompaiono molto rapidamente

•NS5A:Nei soggetti con fallimento terapeutico NS5A INIB, si osservano NS5A RAS nel 75-90% dei casi, esse persistono per più di 2 anni, per questo motivo possono influenzare i successivi trattamenti:

1) **Sofosbuvir+velpatasvir**: nei soggetti **Gen3** , se la mutazione **Y93H** è presente la ribavirina dovrebbe essere inclusa nel regime terapeutico

2) Elbasvir/grazoprevir:la determinazione delle mutazioniNS5A RAS deve essere eseguita in soggetti infetti con genotipo 1a. Qualora fossero presenti RAS, il trattamento va prolungato per 16 settimane e aggiunta la RBV. Questo è di particolare rilevanza quando è presente la RAS 28, 30, 31 e 93 .

•NS5B: la ricerca delle NS5B RAS non è consigliata perché queste mutazioni sono rare a bassa fitness, e non hanno alcun impatto in un successivo ritrattamento con SOFOSBUVIR.

Table 1. NS5A RASs according to HCV genotype for first and second lines of treatment.

First treatment	NS5A RASs (NS3 RASs)	Second treatment	Failure	Genotype	Fibrosis
SOF + LDV (12 wk)					
	58D	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F3-F4
	28V-31MV	SOF + SIM (12 wk)	-	4	F2
	No RAS	SOF + DAC + RBV (12 wk)	-	3	F2
SOF + LDV (24 wk)					
	93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F4
	31M-93H-58P	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
SOF + LDV + RBV (12 wk)					
	93H	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
	31M-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F3
	30R-31M-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F3
	31M	SOF + SIM (24 wk)	-	1a	F4
	30T	SOF + OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1a	F2
	28M-31M-93C	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1	F4
SOF + DAC (8 wk)					
	30K	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F3-F4
SOF + DAC (12 wk)					
	31M-93H	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1b	F4
	30S-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	4	F4
	30R-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	4	F4
SOF + DAC (24 wk)					
	30R-31F-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
	93N	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	Failure, RAS: 93N (NS3: 168A)	1a	F4
SOF + DAC + RBV (16 wk)					
	30KN-58P	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F4
OBV + PTV + RTV + RBV (12 wk)					
	28V (NS3 : 56H-168V)	SOF + DAC + RBV (24 wk)	-	4	F3
ASV + DAC (20 wk)					
	24Q-30R-31V-93H-58P	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
ASV + DAC (24 wk)					
	28A-30K	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F4

ASV, asunaprevir; DAC, daclatasvir; DAS, dasabuvir; EBV, elbasvir; GRZ, grazoprevir; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PTV, paritaprevir; RAS, resistance-associated substitution; RBV, ribavirin; RTV, ritonavir; SIM, simeprevir; SOF, sofosbuvir.

•Una corretta valutazione delle RAS, può garantire un successo terapeutico del ritrattamento anche in soggetti con alto grado di fibrosi

Table 1. NS5A RASs according to HCV genotype for first and second lines of treatment.

First treatment	NS5A RASs (NS3 RASs)	Second treatment	Failure	Genotype	Fibrosis
SOF + LDV (12 wk)					
	58D	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F3-F4
	28V-31MV	SOF + SIM (12 wk)	-	4	F2
	No RAS	SOF + DAC + RBV (12 wk)	-	3	F2
SOF + LDV (24 wk)					
	93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F4
	31M-93H-58P	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
SOF + LDV + RBV (12 wk)					
	93H	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
	31M-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F3
	30R-31M-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F3
	31M	SOF + SIM (24 wk)	-	1a	F4
	30T	SOF + OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1a	F2
	28M-31M-93C	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1	F4
SOF + DAC (8 wk)					
	30K	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F3-F4
SOF + DAC (12 wk)					
	31M-93H	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1b	F4
	30S-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	4	F4
	30R-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	4	F4
SOF + DAC (24 wk)					
	30R-31F-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
	93N	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	Failure, RAS: 93N (NS3: 168A)	1a	F4
SOF + DAC + RBV (16 wk)					
	30KN-58P	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F4
OBV + PTV + RTV + RBV (12 wk)					
	28V (NS3 : 56H-168V)	SOF + DAC + RBV (24 wk)	-	4	F3
ASV + DAC (20 wk)					
	24Q-30R-31V-93H-58P	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
ASV + DAC (24 wk)					
	28A-30K	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F4

ASV, asunaprevir; DAC, daclatasvir; DAS, dasabuvir; EBV, elbasvir; GRZ, grazoprevir; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PTV, paritaprevir; RAS, resistance-associated substitution; RBV, ribavirin; RTV, ritonavir; SIM, simeprevir; SOF, sofosbuvir.

•Una corretta valutazione delle RAS, può garantire un successo terapeutico del ritrattamento anche in soggetti con alto grado di fibrosi

Table 1. NS5A RASs according to HCV genotype for first and second lines of treatment.

First treatment	NS5A RASs (NS3 RASs)	Second treatment	Failure	Genotype	Fibrosis
SOF + LDV (12 wk)					
	58D	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F3-F4
	28V-31MV	SOF + SIM (12 wk)	-	4	F2
	No RAS	SOF + DAC + RBV (12 wk)	-	3	F2
SOF + LDV (24 wk)					
	93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F4
	31M-93H-58P	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
SOF + LDV + RBV (12 wk)					
	93H	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
	31M-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	1b	F3
	30R-31M-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F4
	No RAS	SOF + LDV + RBV (24 wk)	-	1a	F3
	31M	SOF + SIM (24 wk)	-	1a	F4
	30T	SOF + OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1a	F2
	28M-31M-93C	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	4	F4
	No RAS	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1	F4
SOF + DAC (8 wk)					
	30K	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F3-F4
SOF + DAC (12 wk)					
	31M-93H	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	-	1b	F4
	30S-93H	SOF + GZR + EBV (16 wk)	-	4	F4
	30R-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	4	F4
SOF + DAC (24 wk)					
	30R-31F-93H	SOF + GZR + EBV + RBV (16 wk)	-	1b	F4
	93N	OBV + PTV + RTV + DAS + RBV (24 wk)	Failure, RAS: 93N (NS3: 168A)	1a	F4
SOF + DAC + RBV (16 wk)					
	30KN-58P	SOF + DAC (24 wk)	-	1a	F4
OBV + PTV + RTV + RBV (12 wk)					
	28V (NS3 : 56H-168V)	SOF + DAC + RBV (24 wk)	-	4	F3
ASV + DAC (20 wk)					
	24Q-30R-31V-93H-58P	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-	1b	F4
ASV + DAC (24 wk)					
	28A-30K	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-	1a	F4

ASV, asunaprevir; DAC, daclatasvir; DAS, dasabuvir; EBV, elbasvir; GRZ, grazoprevir; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PTV, paritaprevir; RAS, resistance-associated substitution; RBV, ribavirin; RTV, ritonavir; SIM, simeprevir; SOF, sofosbuvir.

•Una corretta valutazione delle RAS, può garantire un successo terapeutico del ritrattamento anche in soggetti con alto grado di fibrosi

ASV + DAC (20 wk)	28V (NS3 : 56H-168V)	SOF + DAC + RBV (24 wk)	-
ASV + DAC (24 wk)	24Q-30R-31V-93H-58P	SOF + DAC + SIM (24 wk)	-
ASV + DAC (24 wk)	28A-30K	SOF + SIM + RBV (24 wk)	-

ASV, asunaprevir; DAC, daclatasvir; DAS, dasabuvir; EBV, elbasvir; GRZ, grazoprevir; LDV, ledipasvir; OBV, ombitasvir; PTV, paritaprevir; RAS, resistance-associated substitution; RBV, ribavirin; RTV, ritonavir; SIM, simeprevir; SOF, sofosbuvir.

Table 2. Overview of the main real-world studies and clinical trials on retreatment of patients who failed a previous DAA-based treatment.

Study	Study design	Study population	Study results	Reference
Halfon et al	Retrospective	100 patients	90% SVR12	Halfon et al J. Hepatol 2017

Algoritmo per l'esecuzione del test HCV Resistenza GT1

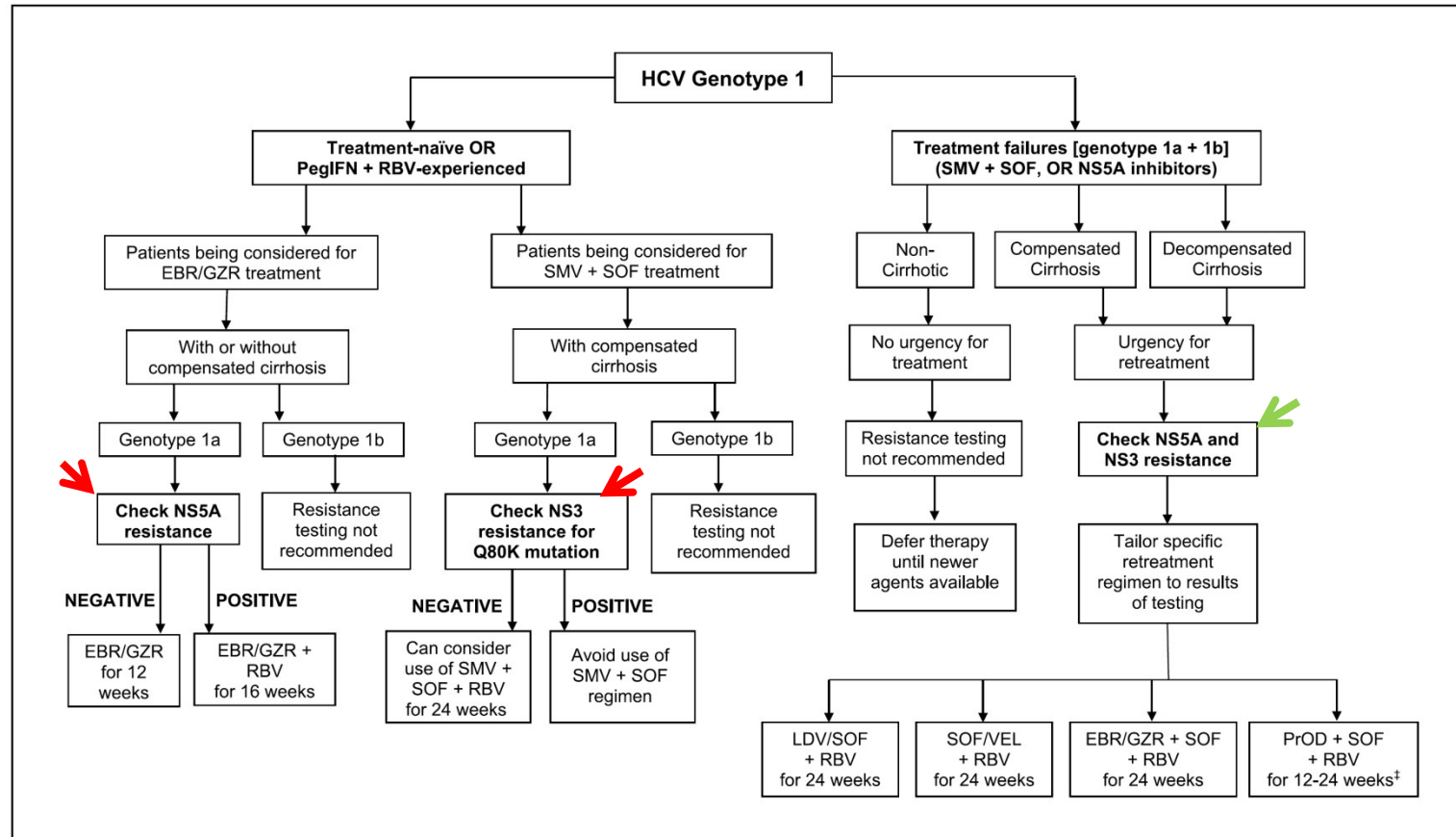


Figure 1. Recommendations for Resistance Testing in HCV Genotype 1 Patients.⁷

EBR = elbasvir; GZR = grazoprevir; HCV = hepatitis C virus; LDV = ledipasvir; NS5A = non-structural protein 5A; NS3 = non-structural protein 3; SMV = simeprevir; SOF = sofosbuvir; PegIFN = pegylated interferon; PrOD = paritaprevir/ritonavir/ombitasvir/dasabuvir; RBV = ribavirin; VEL = velpatasvir.

* = Alternative treatment regimen only.

‡ = 12 weeks in genotype 1a patients without cirrhosis and genotype 1b patients, or 24 weeks in genotype 1a patients with cirrhosis.

Trattamento con Glecaprevir + Pibrentasvir+RBV gen1-6

Table 1B. Prevalence of baseline amino acid polymorphisms.

Genotype	Amino acid polymorphisms*, n/N	
	NS3 only	NS5A only
1a	40/87 (46)	9/87 (10)
1b	10/24 (42)	4/24 (17)
2	3/124 (2)	79/124 (64)
3	22/174 (13)	33/174 (19)
4	1/22 (5)	7/22 (32)
5	0/1(0)	0/1(0)
6	2/11 (18)	4/11 (36)

n, number of patients with baseline polymorphisms in the specific

total number of patients with sequences analyzed.

* Samples were either analyzed by population sequencing (detection threshold ~15%) or next-generation sequencing (using a 15% detection cut-off).

SVR GEN 1 97%

SVR GEN 3 94%

were no virologic failures, resulting in treat SVR12 rate of 100%.

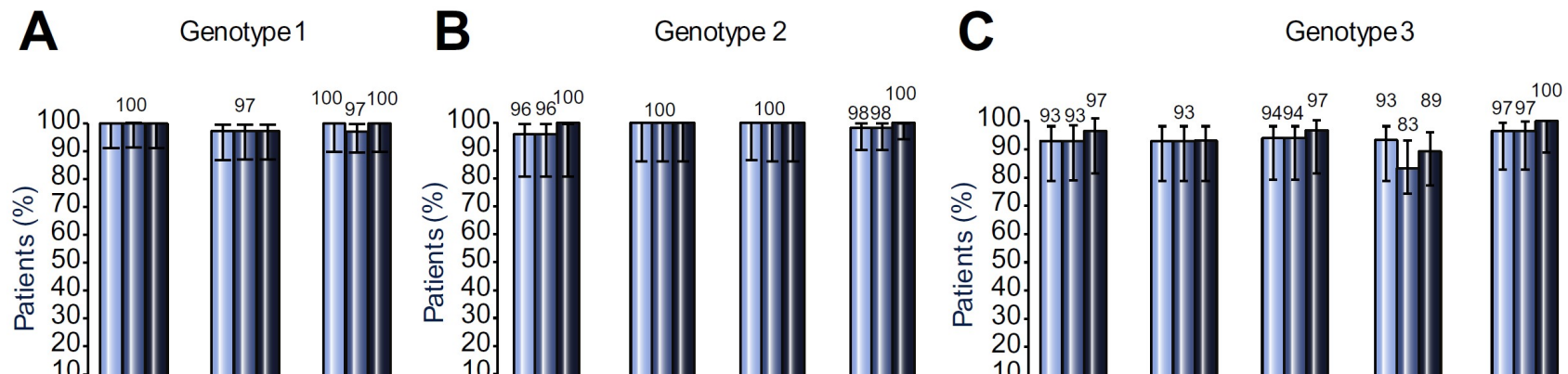


Table 3. Characteristics of patients with breakthrough or relapse, including baseline polymorphisms and treatment-emergent substitutions at the time of virologic failure.

Subtype	Prior Tx history	GLE dose, mg	PIB dose, mg	RBV	Tx duration, wks	Reason for non-response	Timepoint sequenced	HCV variants at resistance-associated amino acid positions*	
								NS3	NS5A
1a	Naïve	200	40	No	12	Relapse	Baseline	None	E62A
							PTW4	None	Q30K, H58D, E62A
3a	PR	200	40	No	12	Breakthrough	Baseline	None	Y93H
							Week 10	Y56H, Q168K	L31F, Y93H
3a	Naïve	200	40	No	12	Relapse	Baseline	Q168R	None
							PTW 8	Q168R	M28K
3a	PR	200	40	No	12	Relapse	Baseline	None	None
							PTW 8	Q168R	Y93H
3a	Naïve	200	120	Yes	12	Breakthrough	Baseline	A166T	A30K
							Week 4	A166T	A30K, L31I, Y93H
3a	PR	200	120	No	12	Relapse	Baseline	None	Y93H
							PTW 4	None	L31F, Y93H
3a	PR	200	120	No	12	Relapse	Baseline	None	None
							PTW 4	None	S24F, M28K
3a	PR	300	120	No	12	Breakthrough	Baseline	A166S	A30K
							Week 6	Y56H, A166S, Q168L	A30K, Y93H
3a	PR	300	120	No	12	Relapse	Baseline	None	Y93H
							PTW 8	None	L31F, Y93H
3a	PR	300	120	No	12	Relapse	Baseline	None	A30K
							PTW 2	Y56H, Q168R	A30K, Y93H

Tx, treatment; GLE, glecaprevir; PIB, pibrentasvir; RBV, ribavirin; NS, non-structural; PR, pegylated interferon plus ribavirin; PTW, post-treatment week.

* Samples were either analyzed by population sequencing (detection threshold ~15%) or next-generation sequencing (using a 15% detection cut-off). A list of the NS3 and NS5A signature amino acid positions analyzed for each genotype is included in the Supplementary material.

Kwo et al J hepatol 2017

449 pazienti con cirrosi.

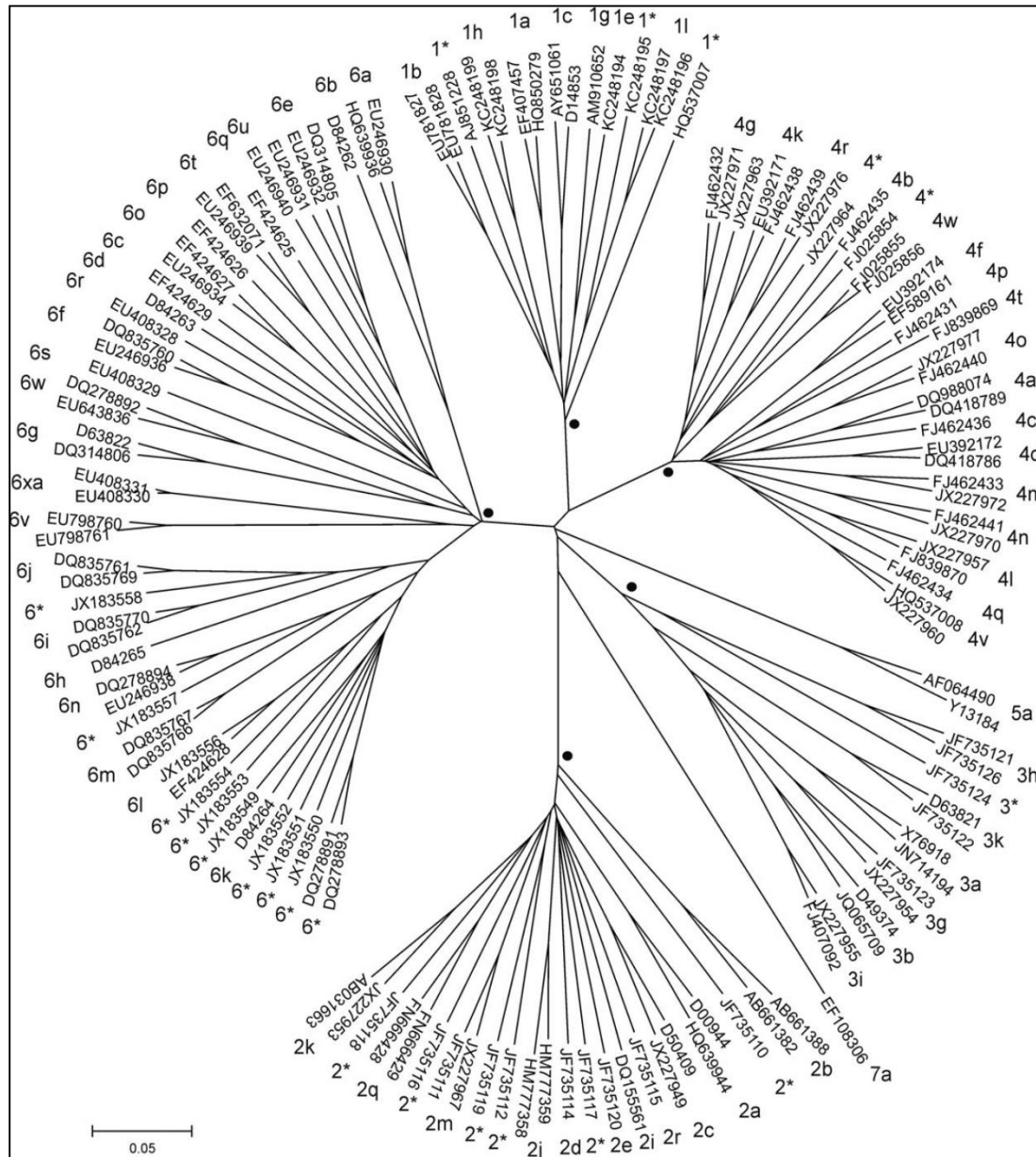
Fallimenti:

-Gen1a (n=1)

-Gen3 (n=9)

- NS5A:** le RAS A30K (7/11), Y93H (9/11) sono le più frequenti associate al fallimento terapeutico.
- NS3:** Importanti sono anche la Y56H e Q168R/K/R

RILEVANZA DELLA CORRETTA GENOTIPIZZAZIONE NELLA GESTIONE DELLE TERAPIE CON DAA



7 genotipi HCV, 6 sono i più diffusi. Essi differiscono tra loro per il 30-35% della loro sequenza nucleotidica, mentre i **67 sottotipi** differiscono tra loro per il 20-25%

GOLD STANDARD per la genotipizzazione: Seq NS5B.

Metodi commerciali CE IVD:

- 1) Real-time (5'UTR, NS5B)
- 2) Reverse Hybridization su matrice solida

Discordanza nella determinazione di genotipi/sottotipi tra metodo LINOLiPa

Limiti degli attuali metodi commerciali:

1. Determinazione dl sottotipo (1a,1b)
2. Infezioni miste
3. Erronea genotipizzazione (1 invece di 6)

Table 1. Summary of concordant and discordant results by HCV genotype and subtype.

HCV genotype (by INNO-LiPA, 5'UTR and core detection)	Patients n	HCV genotype (by sequencing NS3/4A, NS5A and/or NS5B)				HCV subtype (by sequencing NS3/4A, NS5A and/or NS5B)							
		Concordant		Discordant		Concordant		Refined		Discordant		Novel/ mixed	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
1	5,701	5,691	99.8%	10 ^a	0.2%	5,576	97.8%	80	1.4%	35	0.6%	10	0.2%
2	950	921	96.9%	29 ^b	3.1%	485	51.1%	394	41.5%	42	4.4%	29	3.1%
3	1,841	1,840	99.9%	1 ^c	0.1%	1,659	90.1%	174	9.5%	6	0.3%	2	0.1%
4	309	308	99.7%	1	0.3%	18	5.8%	251	81.2%	33	10.7%	7	2.3%
5	37	37	100.0%	0	0.0%	37	100.0%	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
6	107	107	100.0%	0	0.0%	10	9.3%	83	77.6%	9	8.4%	5	4.7%
Total	8,945	8,904	99.5%	41 ^d	0.5%	7,785	87.0%	982	11.0%	125	1.4%	53	0.6%

Concordant: Genotype/subtype result from INNO-LiPA was an exact match to the genotype/subtype determined by sequencing. Discordant: Genotype/subtype result from INNO-LiPA did not match the genotype/subtype determined by sequencing. Refined: The category of genotype/subtype from INNO-LiPA (e.g. 4a/c/d or 6c-l) was correct but not as specific as the genotype/subtype determined by sequencing. Novel/Mixed: The genotype/subtype could not be specifically determined by sequencing and was interpreted to indicate a novel or mixed subtype.

^a 6/6 INNO-LiPA genotype 1 discordant samples tested by full genome sequencing were confirmed to be genotype 6.

^b 16/17 INNO-LiPA genotype 2 discordant samples tested by full genome sequencing were confirmed to be genotype 2-genotype 1 recombinants and 1/17 was confirmed to be genotype 7.

^c The INNO-LiPA genotype 3 discordant sample tested by full genome sequencing was confirmed to be genotype 1.

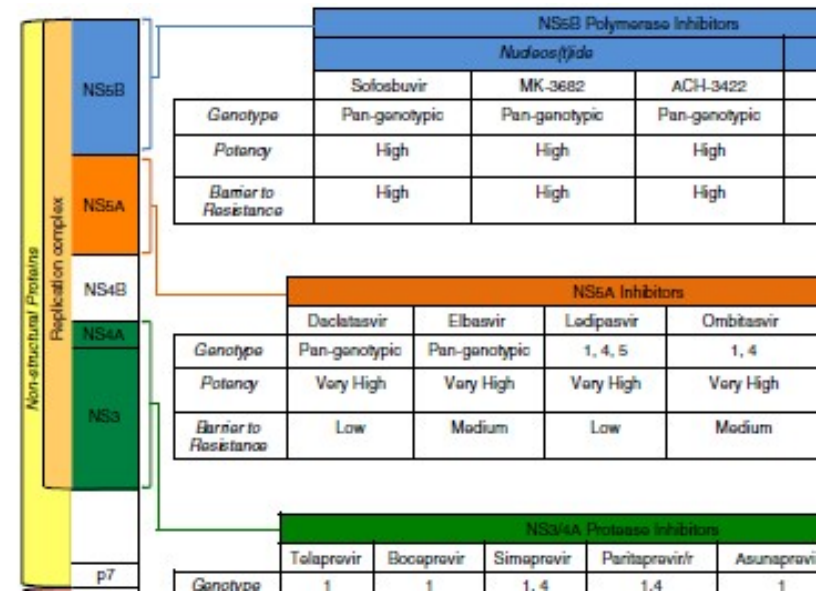
^d 4/41 samples had inconclusive INNO-LiPA results and were additionally genotyped using TRUGENE HCV 5'NC kit (Siemens Healthcare Diagnostics).

Studio di genotipi indeterminati con metodo Abbott

Patient code	HCV RNA	Date of collection	Abbott RealTime HCV Genotype II	DS	UDPS
Pt 12	2.25E+06	17/05/2013	1	1b	1b
Pt 49-59 a	7.72E+05	31/03/2014	1	3h	3h
Pt 49-59 b	4.53E+05	20/06/2014	1	3h	3h
Pt 108	5.63E+03	26/02/2015	1	1b	1b
Pt 29	1.58E+04	02/11/2013	1	1b	1b
Pt 53	1.70E+06	29/04/2014	1	1a	1a
Pt 77	6.77E+06	15/09/2014	1	3h	3h
Pt 133	2.63E+06	10/06/2015	1	1e	1e+1a
Pt 8	7.06E+06	15/02/2013	1	1a	1a
Pt 10	1.50E+05	13/05/2013	1	1b	1b
Pt 13	2.31E+05	03/06/2013	1	1a	1a
Pt 14	9.12E+06	12/06/2013	1	1a	1a
Pt 17	6.87E+04	06/07/2013	1	1b	1b
Pt 22	1.88E+05	31/08/2013	1	1b	1b
Pt 23	7.90E+06	13/09/2013	1	1a	1a
Pt 141	5.71E+03	07/08/2015	1	1b	1b
Pt 142	4.49E+04	07/08/2015	1	1b	1b
Pt 55	6.49E+06	15/05/2014	1a+4	1a	NR
Pt 16-	6.26E+05	02/07/2013	1+4	4m	4m
Pt 16-50 b	1.21E+06	01/04/2014	1+4	4m	4m
Pt 89-	6.10E+06	24/10/2014	1+4	4d	4d
Pt 89-114 b	2.77E+06	10/03/2015	1a+4	4d	4d+1a
Pt 54-	4.94E+06	02/05/2014	1a+3	1a	1a
Pt 54-127 b	2.68E+06	12/06/2015	1a+3	1a	1a
Pt 81	6.27E+06	29/09/2014	1a+3	1a	1a
Pt 44	3.93E+06	25/02/2014	1a+4	1a	1a
Pt 104	1.14E+06	04/02/2015	1a+4	4d	4d
Pt 128	5.25E+05	17/06/2015	1a+4	1a	1a
Pt 92	1.96E+05	04/12/2014	1b+3	1b	1b
Pt 18	3.72E+04	05/08/2013	1b+2	1b	1b
Pt 97	1.31E+05	19/12/2014	1b+2	1b	1b
Pt 115	5.32E+05	17/03/2015	1b+4	1b	1b
Pt 76	2.83E+06	12/09/2014	3+4	3a	3a
Pt 46	1.04E+05	20/03/2014	3+4	3a	3a
Pt 41	2.15E+06	15/01/2014	ind	2c	2c
Pt 56	6.17E+03	24/05/2014	ind	4d	4d
Pt 68	2.53E+05	28/07/2014	ind	3a	3a+3h
Pt 84	7.57E+04	02/10/2014	ind	2c	2c
Pt 94	1.01E+04	10/12/2014	ind	6n	6n
Pt 126	1.83E+05	24/04/2015	ind	2c	2c
Pt 102	8.92E+04	02/02/2015	ind	3a	3a
Pt 103	3.97E+06	02/02/2015	ind	3a	3a
Pt 123	3.11E+06	09/05/2015	ind	2c	2c

- Spesso il genotipo 1 non sottotipizzato, risulta essere un genotipo 3h, sia con Sanger che con UDPS.
- Le coinfezioni possono essere identificate correttamente solo con UDPS

Efficacia dei nuovi DAA



Metodi di determinazione delle HCV resistenze

Kit COMMERCIALI PER il monitoraggio delle HCV DR:

- **DEEPCHEK® ASSAY** (NS3, NS5A, NS5B , CE-IVD software solo per genotipi **1a e 1b**)
- **Vela Sentosa ASSAY** (NS3, NS5A, NS5B, CE-IVD solo per i genotipi **1a ed 1b**, non fa monitoraggio delle mutazioni correlate al SOFOSBUVIR)

-

le HCV DR vengono monitorate prevalentemente con RT-PCR home-made.

- NS3: I set di primers sono generalmente genotipo specifici* (aa 1-180)
- NS5A: I set di primers sono generalmente genotipo specifici* (aa1-150)
- NS5B: I set di primers sono possono essere utilizzati per i genotipi 1-6 (aa120-600)

*Per i sottotipi dei genotipi 4 e 6 si deve procedere spesso con primers sottotipo specifici

Come individuare le RAS in una sequenza Sanger?

- Si devono considerare le mutazioni che rappresentano almeno il 15% della popolazione virale.

Sito G2P: <http://hcv.geno2pheno.org/index.php>

Lontok E, Harrington P, Howe A, Kieffer T, Lennerstrand J, Lenz O, McPhee F, Mo H, Parkin N, Pilot-Matias T, Miller V. Hepatitis C virus drug resistance-associated substitutions: State of the art summary. *Hepatology*. 2015 Nov;62(5):1623-32. doi: 10.1002/hep.27934. Epub 2015 Jul 30. Review. PMID:26095927

Sarrazin C. The importance of resistance to direct antiviral drugs in HCV infection in clinical practice. *J Hepatol*. 2016 Feb;64(2):486-504. doi: 10.1016/j.jhep.2015.09.011. Epub 2015 Sep 26. Review. PMID:26409317

- Anche se per genotipi rari come:

1e, 1g, 1h,
4l, 4m, 4r, 4t,
6f, g, h, o, p, q, r

non vi sono dati certi sulle RAS associate ai nuovi DAA

I

HCV RESISTENZA e **controlli** di qualità



Soltanto Gt1a, NS3



Validazione Nazionale GRT HCV VIRONET-C

Sono stati esaminati: GT1-4, NS3, NS5A, NS5B

Partecipano 22 Centri Italiani

Conclusioni

- La determinazione dell'HCV RESISTENZA va eseguita in casi specifici al T0 del 1° trattamento
- Nei soggetti con fallimento terapeutico HCV RESISTENZA va eseguita sempre prima del ritrattamento (NS3, NS5A)
- Risultati incerti del genotipo vanno confermati con metodo Sanger e le infezioni miste con NGS

Grazie per
l'attenzione