



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Del Farmaco

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE FARMACOLOGICHE

INDIRIZZO: FARMACOLOGIA MOLECOLARE E CELLULARE

CICLO XXVI

**WARFARIN E PEG-IFN/RBV:
SVILUPPO DI TEST FARMACOGENETICI
PER LA PERSONALIZZAZIONE DELLA TERAPIA FARMACOLOGICA**

Direttore della Scuola: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Coordinatore di Indirizzo: Ch.mo Prof. Pietro Giusti

Supervisore Interno: Ch.mo Prof. Eugenio Ragazzi

Supervisore Esterno: Dott. Dino Paladin

Dottorando: Elisabetta Bugin

Anno Accademico 2012/2013

Indice

RIASSUNTO	1
ABSTRACT	6
1. INTRODUZIONE	9
1.1. DEFINIZIONE di FARMACOGENETICA.....	9
1.2. BIOMARCATORI MOLECOLARI	10
1.3. TECNICHE DI GENOTIPIZZAZIONE.....	12
1.3.1. METODI DI SCREENING DIRETTI	12
1.3.2. METODI DI SCREENING INDIRETTI.....	14
1.4. LINEE GUIDA SUI TEST GENETICI	15
1.5. TEST GENETICI DI INTERESSE COMMERCIALE	20
1.6. WARFARIN.....	20
1.6.1. PROSPETTIVE FUTURE	25
1.6.2. FATTORI PREDITTIVI PRETRATTAMENTO	26
1.6.3. RUOLO DELLA GENETICA NELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA.....	29
1.6.4. VALORE PROGNOSTICO DEL DATO GENETICO	39
1.6.5. ALGORITMI FARMACOGENETICI	40
1.6.6. TEST FARMACOGENETICI	47
1.7. IL VIRUS DELL'EPATITE C.....	49
1.7.1. STORIA E TASSONOMIA.....	49
1.7.2. STRUTTURA VIRALE	50
1.7.3. CICLO REPLICATIVO VIRALE	53
1.8. INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C	54
1.8.1. EPIDEMIOLOGIA	54
1.8.2. STORIA NATURALE.....	55
1.9. TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HCV.....	57
1.9.1. INTERFERONE	59
1.9.2. RIBAVIRINA.....	64
1.9.3. MECCANISMI MOLECOLARI DI EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DA PARTE DEL VIRUS HCV	69
1.9.4. AGENTI ANTIVIRALI DI NUOVA GENERAZIONE	69
1.9.5. PROSPETTIVE FUTURE	76
1.9.6. FATTORI PREDITTIVI PRETRATTAMENTO	79

1.10.	GENETICA DELL'OSPITE NELL'INFEZIONE DA HCV	82
1.10.1.	GENE IL28B	82
1.10.2.	GENE ITPA.....	91
2.	SCOPO DELLA RICERCA.....	97
3.	MATERIALI E METODI.....	99
3.1.	RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI	99
3.2.	PROGETTAZIONE DEI PRIMERS.....	102
3.3.	AMPLIFICAZIONE DI SEQUENZE SPECIFICHE DI DNA MEDIANTE PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	105
3.4.	SEQUENZIAMENTO DEL DNA	109
3.5.	REVERSE LINE BLOT	110
3.6.	AB WARFARIN TYPE STRIP READER	118
4.	RISULTATI	121
4.1.	PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20	121
4.2.	STUDIO DI COMPATIBILITÀ.....	130
4.3.	STUDIO DI STABILITÀ	134
4.4.	AB WARFARIN STRIP READER V1.0.0.....	134
4.5.	MARCATURA CE IVD	139
4.6.	PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20	142
4.7.	ANALISI DI CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO.....	150
4.8.	STUDIO DI COMPATIBILITÀ.....	154
4.9.	STUDIO DI STABILITÀ	158
4.10.	MARCATURA CE IVD	159
5.	CONCLUSIONI	163
5.1.	GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20	163
5.2.	GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20	165
6.	BIBLIOGRAFIA	169
	COMUNICAZIONI ORALI E POSTER	183
	APPENDICE A	185
	APPENDICE B	191

RIASSUNTO

L'attività di ricerca ha avuto come obiettivo quello di sviluppare due test diagnostici di interesse commerciale, utili a predire il dosaggio di farmaci utilizzati in ambito clinico (Warfarin e PEG-IFN/Ribavirina), per i quali si rende necessaria la personalizzazione della terapia ed è raccomandato eseguire il test genetico.

Il Warfarin (Coumadin®) è uno degli anticoagulanti più largamente utilizzati in clinica per la prevenzione e il trattamento di eventi trombotici, il cui utilizzo si associa però a dei rischi molto gravi per la salute del paziente a causa sia dell'indice terapeutico molto ristretto sia dell'ampia variabilità individuale nella risposta al farmaco. Questi aspetti rendono necessaria la personalizzazione della terapia, attualmente ottenuta a posteriori, con aggiustamenti posologici in base a misurazioni seriali dell'INR. Durante le fasi iniziali della terapia, tuttavia, è particolarmente elevato il rischio di eventi trombotici o emorragici dovuti rispettivamente a sotto- e sovra-dosaggio farmacologico. Recentemente numerosi studi di associazione genome-wide hanno messo in luce il ruolo chiave di alcuni polimorfismi nei geni CYP2C9 (rs1799853 e rs1057910), CYP4F2 (rs2108622) e VKORC1 (rs9923231) nell'influenzare l'efficacia anticoagulante del farmaco modificandone sia la farmacocinetica che la farmacodinamica. La conoscenza del profilo genetico permette di prevedere un rischio differenziale di manifestare reazioni avverse e quindi di personalizzare il dosaggio del farmaco, orientandosi verso dosaggi minori nel caso di pazienti che presentino le varianti alleliche *2 e *3 del gene CYP2C9 o siano omozigoti A/A per il polimorfismo rs9923231 nel gene VKORC1.

L'utilità di associare alla prescrizione del farmaco un test genetico è stata sottolineata anche dall'FDA che nel 2010 ha revisionato il foglietto illustrativo del farmaco inserendo una tabella con i dosaggi (mg/die) raccomandati di farmaco per raggiungere un INR terapeutico sulla base del dato genetico. L'obiettivo di questo studio è stato quindi quello di sviluppare un test per l'identificazione dei più significativi polimorfismi associati alla risposta clinica al Warfarin e di preparare la documentazione necessaria per poter marcare il kit come dispositivo diagnostico *in vitro* commercializzabile nella Comunità Europea. A tal scopo si è proceduto effettuando un'attività di benchmarking per valutare i sistemi già presenti nel mercato e successivamente definendo la metodica del test. Considerando l'utilità che deriverebbe dall'analisi simultanea di tutte le varianti alleliche di interesse, si è deciso di sviluppare un test farmacogenetico basato sulla metodica *Reverse Line Blot* che combina una multiplex PCR ad un saggio di ibridazione su strip mediante oligonucleotidi sequenza-specifici adesi ad un supporto di membrana. Per garantire l'amplificazione univoca delle sequenze *target*, è stato utilizzato un approccio SSP-PCR (*Sequence Specific Primer – PCR*), la cui efficienza e specificità sono state valutate mediante sequenziamento diretto. Per la detection su strip di ciascun polimorfismo sono state poi progettate due sonde ASO (*Allele-Specific Oligonucleotide*), la cui funzionalità è stata valutata su campioni informativi per i polimorfismi indagati e precedentemente genotipizzati con un metodo di riferimento. Questa prima fase di definizione del prototipo si è conclusa con la messa a punto delle condizioni sperimentali del saggio, relative ai protocolli di amplificazione in multiplex e di rivelazione su strip.

Tale fase ha richiesto un notevole impegno tecnico per superare alcuni dei limiti tecnici sulla costruzione degli oligonucleotidi, imposti dalle sequenze altamente omologhe dei citocromi e per la difficoltà di riuscire a individuare le giuste condizioni sperimentali che consentono di

discriminare in modo univoco, specifico e sensibile, sequenze che differiscono tra loro di una singola base (sequenza *wild-type* Vs. sequenza polimorfica). La fase successiva è stata quella di definire la sensibilità analitica del metodo e le performance del test, analizzando 125 campioni precedentemente genotipizzati da un laboratorio di riferimento (Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova), mediante sistema in Real-Time (TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay, Life Technologies). Le prove effettuate con concentrazioni scalari di DNA di partenza hanno permesso di definire una sensibilità analitica di 0,5 ng di DNA/μl e un *range* di quantità ottimale di DNA di partenza che va da 10 ng/μl a 100 ng/μl, sebbene il test garantisca un risultato corretto anche per quantità di DNA pari a 500 ng/reazione. Inoltre, tutti i 125 campioni analizzati in fase di validazione sono stati correttamente genotipizzati; per ciascuno dei polimorfismi indagati: rs1799853 (c.430 C>T, Cys144Arg, CYP2C9*2), rs1057910 (c.1075 A>C, Ile359Leu, CYP2C9*3), rs2108622 (c.1297 C>T, Val433Met, CYP4F2*3) e rs9923231 (c.-1639 G>A, VKORC1) il dispositivo ha fornito un risultato concorde al 100% al dato ottenuto con il metodo di riferimento ed è stato possibile calcolare un valore di sensibilità e specificità diagnostica del 100%, esprimibile anche come accuratezza del 100%, ossia numero di genotipizzazioni corrette sul totale delle genotipizzazioni effettuate (osservato/atteso). Ai fini della marcatura CE IVD, è stata valutata la stabilità dei reagenti a intervalli di tempo regolari di 1 mese per 14 mesi e le prove condotte hanno permesso di definire una *shelf life* di 12 mesi; da studi di compatibilità effettuati variando le mix di amplificazione e i supporti su cui vengono fatte aderire le sonde è emerso, inoltre, che il dispositivo risulta compatibile con tre tipi di master mix di amplificazione disponibili in commercio e due tipologie di materiali usati per il blotting delle *probes* (una membrana in nylon e membrana in nitrocellulosa).

Per facilitare l'interpretazione dei risultati, il kit è stato implementato con un software interpretativo conforme ai requisiti della norma IEC 62304 – “Medical Device Software – Software Life Cycle Processes” e rispondente alle esigenze di rendere automatico e ripetibile il processo di lettura e interpretazione del risultato della strip e di archiviare i risultati in un format stampabile.

Il test sviluppato in questo lavoro di dottorato, GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 (AB ANALITICA), è stato notificato al Ministero della Salute, è stato marcato come dispositivo diagnostico *in vitro* CE IVD e può pertanto essere commercializzato. Il dispositivo rappresenta uno dei sistemi più completi per la personalizzazione della terapia in pazienti con disturbi tromboembolici e in cura con Warfarin. Nessuno dei sistemi presenti nel mercato, infatti, analizza il polimorfismo rs2108622 C>T nel gene CYP4F2 che, però, soprattutto per la popolazione caucasica è associato in modo statisticamente significativo ad un incremento del dosaggio di anticoagulante, necessario per raggiungere un INR terapeutico; lo SNP rs2108622 spiega in media circa il 10% delle differenze di dosaggio osservate tra i portatori della variante CYP4F2 c.1297 T e i soggetti CYP4F2 c.1297 C/C e si conferma il terzo locus genico in ordine di importanza come predittore di risposta terapeutica al Warfarin e ai suoi derivati.

L'epatite C cronica (CHC) è una delle maggiori cause di cirrosi epatica ed epatocarcinoma. Nel corso degli anni la terapia dell'epatite C ha subito una notevole evoluzione che ha portato a definire come *Standard of Care* (SOC) la combinazione di Interferone Peghilato e Ribavirina (PEG-IFN/RBV, duplice terapia).

L'efficacia di tale associazione, tuttavia, è elevata (80%) nei casi di infezione da HCV di genotipo 2-3, ma non supera il 50% nei casi di infezione da HCV di genotipo 1. Grazie anche alla migliore

comprensione dei meccanismi molecolari di replicazione virale e dei meccanismi patogenetici dell'infezione, negli ultimi decenni sono stati sviluppati agenti antivirali di nuova generazione da utilizzarsi in pazienti intolleranti alla terapia standard oppure da usarsi in combinazione con PEG-IFN e Ribavirina (triplice terapia) per aumentare l'efficacia della SOC, ridurre la durata e la tossicità e facilitare la *compliance* del paziente.

Sia nel caso della duplice che della triplice terapia, però, il numero e la gravità delle reazioni avverse non sono trascurabili (anemia e neutropenia gravi, disturbi a carico del sistema nervoso centrale, reazioni di ipersensibilità) e hanno determinato un notevole interesse nell'identificazione di fattori prognostici in grado di predire l'efficacia della terapia. La probabilità di risposta alla terapia antivirale dipende in primis dal genotipo virale, ma sono emersi significativi anche fattori dell'ospite, sia clinici che genetici.

In particolare, numerosi studi hanno evidenziato un'associazione statisticamente significativa tra i polimorfismi rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B e il tasso di SVR (*Sustained Virological Response*) identificando nel gene IL28B uno dei più importanti predittori pretrattamento di risposta alla terapia. È stato riportato che pazienti con genotipo rs12979860-CC e rs8099917-TT rispondono più efficacemente alla terapia antivirale rispetto agli eterozigoti o agli omozigoti rs12979860-TT e rs8099917-GG (tassi di SVR da due a tre volte maggiori). Il polimorfismo rs12979860 è correlato anche alla probabilità di clearance spontanea del virus, che è tre volte maggiore nei portatori della variante protettiva rs12979860-C e alla cinetica di declino virale durante la terapia; indipendentemente dall'etnia, i pazienti CC mostrano un'elevata riduzione dei livelli di RNA virale nel siero che si riflette in più alti tassi di RVR (*Rapid Virological Response*) ed EVR (*Early Virological Response*) rispetto a quelli osservabili in pazienti con genotipo rs12979860-CT o -TT. Da diverse evidenze scientifiche, inoltre, è emersa una correlazione tra il rischio di manifestare anemia emolitica cronica indotta da Ribavirina e due polimorfismi (rs1127354 e rs7270101) nel gene ITPA che codifica per l'inosina trifosfatasi, un enzima coinvolto nell'idrolisi di nucleotidi tri- e difosfato. Sia nel caso del gene IL28B che del gene ITPA, la conoscenza del dato genotipico può indirizzare quindi il clinico nella scelta del regime più adatto e fornisce un'informazione aggiuntiva per valutare meglio il rapporto rischio/beneficio del trattamento rispetto al non trattamento.

Con questo studio ci si è quindi proposti di sviluppare un test farmacogenetico per la discriminazione allelica delle varianti genetiche associate alla resistenza al trattamento antivirale (duplice o triplice terapia) e al rischio di manifestare anemia emolitica indotta da Ribavirina. Scopo di questo lavoro è stato anche quello di confermare tali correlazioni nel campione di pazienti analizzati in questo studio.

Il test si basa sulla metodica del *Reverse Line Blot* e prevede una prima fase di amplificazione in multiplex delle regioni a cavallo dei polimorfismi di interesse, una seconda fase di rivelazione colorimetrica su strip e infine una fase di interpretazione dei dati.

Per assicurare un appaiamento univoco dei *primers* al genoma, ciascun oligo è stato progettato ed analizzato in silico utilizzando *tools* bioinformatici di allineamento con il genoma, come "blat" (UCSC) e ClustalW, escludendo così dalle regioni candidate quelle contenenti SNPs, SINE, LINE o altri elementi ripetuti e tutte le regioni per le quali esistano sequenze con percentuali di identità superiori al 95%. Per quanto riguarda il gene IL28B, in particolare, la presenza di un blocco ripetuto, localizzato sullo stesso cromosoma circa 15000 nucleotidi più a monte, con omologia di sequenza estremamente elevata alla regione di interesse, ha portato a scegliere un approccio SSP-

PCR (*Sequence-Specific Primer PCR*) come metodo di elezione per aumentare la specificità della reazione di amplificazione.

Una volta messo a punto il protocollo di amplificazione, si sono settate le condizioni sperimentali del saggio RLB andando a valutare l'influenza di diversi parametri sperimentali (quantità e tipologia delle *probes*, temperatura, tipologia delle soluzioni di ibridazione e di lavaggio, tempi di incubazione) sulle performance del saggio, in termini di sensibilità analitica e specificità diagnostica. Il prototipo è stato quindi validato e a tal scopo sono stati analizzati 160 campioni precedentemente genotipizzati con sistemi di riferimento in Real Time (TaqMan Allelic Discrimination Assay, Life Technologies, LightMix in vitro diagnostics kit IL28B, LigthMix rs7270101 ITPA e LigthMix rs1127354 ITPA, Roche). Dai dati raccolti è stato possibile definire una sensibilità analitica di 0,5 ng/μl e un'accuratezza del test del 100%; per ciascuno dei campioni analizzati, infatti, i polimorfismi rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B e rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA sono stati correttamente identificati e genotipizzati dal dispositivo in esame, in accordo al dato ottenuto con il metodo di riferimento. In prospettiva di marcare il kit CE IVD, è stata poi valutata la stabilità dei reagenti e dalle prove effettuate finora è stato possibile definire una *shelf life* di 8 mesi, da implementare con i dati derivanti dal completamento delle prove di stabilità a 14 mesi, come indicato nel relativo piano di stabilità. Le prestazioni del dispositivo sono state analizzate anche variando i reagenti di amplificazione oppure il supporto su cui sono adese le sonde sequenza-specifica, mantenendo inalterati tutti gli altri parametri sperimentali; anche in tal caso, i risultati ottenuti in ciascuna prova sono stati del tutto equiparabili a quelli ottenuti con i reagenti usati in fase di validazione. Visti e considerati gli ottimi risultati ottenuti, il test sviluppato in questo lavoro di dottorato, GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 (AB ANALITICA), è stato notificato al Ministero della Salute ricevendo la marcatura come dispositivo diagnostico *in vitro* CE IVD e può pertanto essere commercializzato.

L'utilizzo di un saggio mPCR/RLB per l'identificazione dei polimorfismi nei geni IL28B e ITPA risulta essere un metodo rapido e altamente specifico che trova spazio in ambito diagnostico per la genotipizzazione dei pazienti in corso di terapia con agenti antivirali standard e di nuova generazione (PEG-IFN/RBV, Boceprevir, Telaprevir). Attualmente, inoltre, il dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 è l'unico kit sul mercato ad analizzare insieme tutti i polimorfismi più significativi per predire la risposta alla terapia antivirale dell'epatite C cronica e il rischio di reazioni avverse, pertanto rappresenta l'approccio più completo per la personalizzazione della terapia in pazienti con epatite C cronica.

Per 52 dei campioni analizzati è stato possibile ottenere i dati clinici relativi ai parametri biochimici ed ematologici e all'*outcome* terapeutico. Il 63% dei soggetti presentava un'infezione a carico dei genotipi virali 1-4 più difficili da trattare e la terapia si è dimostrata efficace (raggiungimento della SVR, negativizzazione dell'RNA virale nel siero a 24 settimana dalla fine del trattamento) nel 27% dei pazienti con infezione da HCV GT 1-4 e nel 74% dei soggetti con infezione da HCV GT 2-3, riflettendo quanto riportato in letteratura. Nel campione analizzato la maggior parte dei pazienti, indipendentemente dal genotipo virale, era portatore in eterozigosi di almeno uno dei due polimorfismi del gene IL28B, rs12979860 e rs8099917 (27% dei pazienti era rs12979860-CC, mentre il 56% e il 17% era C/T o T/T; il 40% dei pazienti era rs8099917-TT, il 48% T/G e il 12% G/G). La valutazione dei polimorfismi in relazione alla risposta alla terapia non ha mostrato alcuna correlazione significativa. Su 14 soggetti rs12979860-CC, il 57 % ha raggiunto l'SVR, mentre il 43% non è riuscito a eradicare il virus e tale situazione di sostanziale equilibrio si è riscontrata anche nel gruppo di soggetti rs8099917-TT; nel 52% dei casi, infatti, la terapia ha

determinato il raggiungimento della risposta virologica sostenuta, mentre nel 48% dei casi si è registrato un fallimento terapeutico.

L'analisi di correlazione genotipo-fenotipo nel sottogruppo di pazienti indagati (N=52) ha messo in luce, invece, un'associazione tra la riduzione media dei livelli di emoglobina e l'aplotipo definito dalle varianti polimorfiche rs7270101-C e rs1127354-A del gene ITPA. Nei pazienti che presentavano un'attività ITPasica inferiore al 30% rispetto al basale, predetta su base genetica, la riduzione media di Hb è stata inferiore al 5% nelle prime 4 settimane di trattamento e non ha superato il 15% nell'arco delle 24 settimane, mentre nei soggetti con il 100% di attività enzimatica (rs7270101-AA e rs1127354-CC), il declino di Hb ha raggiunto quasi il 20% fin dal primo mese di trattamento. Il calo di emoglobina nei pazienti con attività enzimatica ridotta al 60% rispetto al *wild-type* (gruppo 60% ITPA) ha assunto nel tempo un andamento intermedio. I pazienti con deficit enzimatico severo (gruppo $\leq 30\%$ ITPA) risultano quindi protetti dalla riduzione di Hb indotta da Ribavirina e tale associazione è stata confermata anche dall'analisi statistica, condotta effettuando un confronto multiplo a gruppi tra le tre classi di rischio (100% ITPA, 60% ITPA e $\leq 30\%$ ITPA), in relazione ai livelli di emoglobina dopo 4, 12 e 24 settimane di trattamento (Dunnett's Multiple Comparison Test, 100% ITPA Vs. 30% ITPA a 4 settimane: $p < 0.001$ con $\alpha = 0.05$, a 24 settimane: $p < 0.05$ con $\alpha = 0.05$).

ABSTRACT

The aim of this study was the development and the validation of two pharmacogenetic tests for determination of the personalized dosage of drugs used in clinical settings (Warfarin and PEG-Interferone/Ribavirin) in which genetic testing is necessary and recommended.

Warfarin (Coumadin®) is a widely prescribed anticoagulant used for treatment and prevention of thrombotic disorders. Although highly efficacious, Warfarin's narrow therapeutic index and wide inter-individual variability in dose response make its dosing difficult.

The standard procedure to define the personalized dose is an iterative process that can take weeks or months and exposes the patients to an increased risk of over- or underanticoagulation and thus to serious side effects like thromboembolism or bleeding. The anticoagulation effect of the Coumadin® drug therapy is influenced by combination of genetic and non-genetic factors, which account for more than half of the inter-individual variation in Warfarin doses required to achieve a therapeutic level of anticoagulation or therapeutic INR (*Prothrombin International Normalized Ratio*). Since 2011, the FDA requires the product label to include a recommended daily Warfarin dose (mg/day) for therapeutic INR, which is to be based on the genotypes of *CYP2C9* and *VKORC1*. In addition, Genome-Wide Association Studies (GWAS) have confirmed that *CYP2C9*, *VKORC1* and *CYP4F2* are the main genetic factors determining the effective Warfarin dose in Caucasians. Therefore, knowledge of the genetic profile provides a means to assess the differential risk of adverse reactions and allows the personalization of the therapy, e.g. lowering the dosage for patients with the alleles *CYP2C9* *2 and *3 or that are homozygous for the A-allele (A/A) of the rs9923231 polymorphism in the *VKORC1* gene.

The goal of this study was to develop an innovative genotyping system assessing the gene polymorphisms that mainly determine the clinical response to Warfarin. Four polymorphisms were investigated: rs9923231 in the *VKORC1* gene, rs1799853 and rs1057910 in the *CYP2C9* gene and rs2108622 in the *CYP4F2* gene. To evaluate already available systems and decide on the method to be used for the test we performed a benchmarking of the tests present in the market.

The genotyping is performed using a multiplex PCR in combination with a Reverse Line Blot hybridization assay (mPCR/RLB). To ensure specific amplification the test uses the SSP-PCR (*Sequence Specific Primer* PCR) approach. The high specificity of this PCR method was confirmed by direct sequencing. The test identifies and differentiates SNPs using ASO probes (*Allele Specific Oligonucleotide*) that recognize the different alleles. The hybrid formed between the amplified target DNA sequence and the complementary probes is detected by a colorimetric reaction using biotin-streptavidin and alkaline phosphatase.

In the first part of the study several parameters like assay temperature, typology of hybridization and washing solutions, incubation time and probe design were analyzed in order to assess their influence on the assay's performance. Next, the amplification protocol was defined and the conditions of the RLB assay were set up. The kit prototype was then validated on 125 samples, which had been previously genotyped with a standard method (TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay, Life Technologies), and the analytical sensitivity of the assay was determined. All tested samples were accurately genotyped (100% diagnostic specificity and sensitivity) and the method efficiently worked in a broad range of DNA concentrations. Sensitivity tests demonstrated that the method developed in this study, provided reliable results within a DNA concentration range of 1 ng/reaction to 500 ng/reaction. The shelf life of the reagents was determined to be at least twelve months. In addition, the assay was shown to work on/with the following

combinations of probe support materials (a nylon membrane and a nitrocellulose blotting membrane) and PCR master mixes (three commercial available master mixes). A software was developed that automates and facilitates interpretation of the RLB (strip) patterns.

After completion, the system, GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 (AB ANALITICA), was notified to the *Ministero della Salute* and was CE IVD marked for commercialization in the European Community.

As this system is the only assay on the market that analyzes the *CYP4F2* gene in combination with the *CYP2C9* and the *VKORC1* gene, it represents the most complete approach for determining the genetic factors influencing Warfarin dosage in Caucasians.

The Hepatitis C virus (HCV) infection is a major health problem with more than 170 million infected individuals worldwide (2-2.5% of the world's population).

Approximately 30% of the infections are cleared spontaneously, whereas 40% of the patients develop a chronic infection that can lead to cirrhosis, hepatocellular carcinoma and end-stage liver disease. The current standard of care is a combination treatment with pegylated interferon (PEG-INF) and Ribavirin (RBV), but its efficacy and tolerability are limited. Many efforts have been made to identify the factors that influence host resistance to HCV infection and treatment outcome. Several Genome-Wide Association Studies (GWAS) have demonstrated independently that variations in the *IL28B* (Interleukin 28B) gene are strongly associated with spontaneous clearance of the virus, early viral kinetics and with the varying PEG-INF/RBV therapy response in different populations. Particularly, polymorphism *IL28B* rs12979860 influences the prospect of recovery from an HCV infection. Patients homozygous for allele rs12979860-C show a two- to threefold higher SVR (*Sustained Virological Response*) rate compared to persons with a non-CC genotype when undergoing Peg-INF/RBV treatment, have a higher probability of spontaneous clearance of the virus and, during therapy, display a stronger reduction of virus RNA levels, which is reflected in higher RVR (*Rapid Virological Response*) and EVR (*Early Virological Response*) rates.

Other studies reported an association of certain functional variants of the ITPA (Inosine Triphosphatase) protein with the reduction of hemoglobin during Peg-INF/RBV therapy. These allelic variants of the *ITPA* gene decrease the enzymatic activity of ITPA, thus protecting from RBV-induced anemia. The aim was to develop an innovative system to genotype the most significant genetic polymorphisms important for the prediction of treatment response and risk of adverse reactions in patients infected with HCV. Four polymorphisms were investigated in this study: rs12979860 and rs8099917 in the *IL28B* gene and rs7270101 and rs1127354 in the *ITPA* gene.

Human genomic DNA was extracted from peripheral blood using an automated system (EZ1, Qiagen). Genotyping of the genetic variants was performed combining multiplex PCR with a Reverse Line Blot hybridization assay (mPCR/RLB). For amplification (PCR) of the target sequences, biotinylated primers were used. The primers were designed and analyzed *in silico* using bioinformatics alignment tools like "blat" (UCSC) and ClustalW, excluding genomic sequences that contain SNPs, SINES/LINES or other repetitive elements and all primer binding sites that show a sequence similarity of more than 95% with other genomic sequences. Due to the fact that a sequence that is highly homologous to the target region in *IL28B* gene is located on the same chromosome 15.000 bp upstream, the SSP-PCR approach was adopted in order to ensure a high specificity of the amplification. To evaluate the efficacy of the SPP-PCR, the amplification products were analyzed by direct sequencing. Subsequently, the protocol for the multiplex amplification was set up. Probes recognizing the different alleles of each investigated SNP (two ASO, *Allele*

Specific Oligonucleotide, per SNP) were designed and their specificity analyzed under varying experimental conditions. This allowed estimation of the effect of parameters like temperature and time of incubation on the assay performance. The analytical sensitivity of the assay was determined using a range of DNA concentrations between 0.5 ng/μl and 200 ng/μl. The diagnostic specificity of the test was assessed analyzing 160 samples of a known genotype.

The test provided a result within a DNA concentration of 1 ng/reaction to 400 ng/reaction and all tested samples were accurately genotyped. This underlines the reliability and specificity of the assay. The shelf life of the reagents was determined to be at least eight months and the compatibility of the assay with other amplification master mixes or probe supports (membranes) was tested. The system, GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 (AB ANALITICA), was notified to the *Ministero della Salute* and CE IVD marked for commercialization in the European Community.

RLB is a convenient way to identify up to 8 targets in 20 individual specimens simultaneously. It is more flexible and less costly than DNA microarrays while providing the same specificity and sensitivity. The system developed in this study, GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE, code 04-47A-20 (AB ANALITICA), allows analysis of the most important host genetic factors influencing the efficacy of the Peg-INF/RBV therapy and determining the risk of RBV-induced anemia. It is the only assay on the market that analyzes *ITPA* and *IL28B* polymorphisms together and therefore represents the most complete approach for determining the genetic constitution in regard to the *IL28B* and the *ITPA* gene for personalized management of patients with Hepatitis C.

A genotype-phenotype correlation analysis was performed to evaluate the association between *IL28B* and *ITPA* polymorphisms and the therapy outcome in a sub-group of patients (N=52). Genetic analysis of the *IL28B* polymorphism rs12979860 revealed that 27% of the patients carried the C/C genotype, whereas 56% and 17% carried the C/T and the T/T genotype, respectively. The T/T genotype of the *IL28B* polymorphism rs8099917 was in 40% of patients, whereas 48% carried T/G and 12% the G/G.

No association was found between variants of the *IL28B* polymorphisms and SVR rates: 57% of patients with *IL28B* rs12979860-CC and 52% with *IL28B* rs8099917-TT achieved SVR and 43% and 48%, respectively, failed to clear the HCV virus.

For analysis of the influence of *ITPA*, the patients were subdivided into the following three groups: *normal ITPase activity* (100% *ITPA*), *mild ITPase deficiency* (60% *ITPA*- 60% *ITPase activity*) and *moderate to severe ITPase deficiency* ($\leq 30\%$ *ITPA*, $\leq 30\%$ *ITPase activity*). These groups reflected the individual *Composite ITPase Deficiency Variable* based on the genotypes of the *ITPA* polymorphisms rs7270101 and rs1127354. Patients with normal *ITPase activity* were compared to the groups of patients with *mild ITPase deficiency* and *moderate to severe ITPase deficiency* by statistical analysis. The results showed that the predicted *ITPase deficiency* correlated to a reduction of median Hb levels at 4, 12 and 24 weeks of treatment. A statistically significant difference was observed between the groups with *normal ITPase activity* and *moderate to severe ITPase deficiency* ($\leq 30\%$ *ITPA*) at 4 and 24 weeks (Dunnett's Multiple Comparison Test: T4, $p < 0.0001$; T24, $p < 0.0451$). This clearly shows that patients with an at least by 70% decreased *ITPase activity* are protected from anemia throughout the treatment.

1. INTRODUZIONE

1.1. DEFINIZIONE di FARMACOGENETICA

Per farmacogenetica (abbreviazione PGt) si intende lo studio delle variazioni nelle caratteristiche del DNA in relazione alla risposta ai farmaci (dal documento “Note for guidance on definitions for genomics, pharmacogenetics, genomic data and sample coding categories”). La farmacogenetica è una sottocategoria della farmacogenomica (PGx) la quale si occupa anche delle caratteristiche dell’RNA correlate alla risposta farmacologica. L’interesse sempre maggiore per questa disciplina deriva dalla variabilità inter-paziente nella risposta ai farmaci che limita la possibilità di prevedere l’esito terapeutico di un determinato farmaco: la maggior parte dei pazienti avrà un miglioramento senza o con lievi ed accettabili effetti avversi, alcuni non risponderanno per nulla, altri mostreranno gravi effetti avversi da richiedere la sospensione del farmaco. Questa variabilità nella risposta è dovuta ad una combinazione di fattori: costituzionali (età, sesso, funzioni renale ed epatica etc.), ambientali (dieta, interazione tra farmaci) e genetici (sovra- o sotto- espressione di determinati target molecolari, varianti alleliche associate a livelli ridotti o elevati di attività enzimatica, varianti funzionali di canali ionici o trasportatori etc.,) che interagiscono tra loro nel determinare la risposta al farmaco.

Lo sviluppo di questa branca della farmacologia generale è stato promosso e accelerato dalla notevole quantità di informazioni riguardanti il genoma umano, divenute accessibili all’intera comunità scientifica al completamento del Progetto Genoma Umano. Gli sviluppi in campo bioinformatico hanno poi reso possibile organizzare, elaborare e catalogare l’immensa quantità di dati derivanti dal sequenziamento del genoma umano in *database* e in *tools* bioinformatici di facile utilizzo, rendendo queste informazioni accessibili e fruibili. In ultima istanza l’affermarsi della medicina personalizzata è stato possibile grazie allo sviluppo di nuove tecniche diagnostiche (*microarray*, sequenziamento) altamente sensibili, specifiche e poco costose, in grado di analizzare in tempi brevi milioni di polimorfismi (STRs, *Short Tandem Repeats*; SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*; CNV, *Copy Number Variations*) collegati alla suscettibilità ad una certa malattia (Alzheimer o schizofrenia) piuttosto che al profilo individuale di risposta ad un farmaco (geni coinvolti nell’assorbimento, nel metabolismo e nell’escrezione di una sostanza) [1].

L’FDA (*Food and Drug Administration*) ha redatto e aggiorna trimestralmente l’elenco dei “*valid genomic biomarkers in the context of approved drug label*” cioè biomarcatori genomici ritenuti validi ai fini delle informazioni per l’uso dei farmaci. I biomarcatori genomici vengono classificati, in relazione all’utilizzo clinico dei relativi test, in tre livelli: test obbligatorio, test raccomandato e test informativo. Tra i test genetici obbligatori vi è per esempio quello che valuta l’espressione dell’EGFR in riferimento alla somministrazione del farmaco Cetuximab. Un test raccomandato è, invece, la genotipizzazione degli SNPs rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 e del polimorfismo rs9923231 nel gene VKORC1 per la somministrazione del Warfarin.

La portata del cambiamento che la farmacogenetica può indurre nella terapia è davvero ampia dato che per nessun farmaco può essere esclusa a priori l’influenza, più o meno marcata, di fattori genetici sulla sua efficacia e sicurezza individuale. Questo è valido soprattutto per quei farmaci con una banda terapeutica ristretta o per i quali la posologia varia moltissimo da paziente a paziente (es. Coumadin®); in tal caso, infatti, diventa di fondamentale importanza poter disporre

di un test genetico che a priori possa predire la risposta al farmaco e che quindi permetta di individuare la dose efficace per ogni individuo. Il razionale dell'introduzione dei test genetici nella pratica clinica è che da un lato è possibile valutare a priori il rischio di eventi avversi e quindi di evitare di somministrare farmaci o dosi troppo elevate di farmaci che potrebbero danneggiare il paziente; dall'altro si somministra al paziente la terapia più efficace evitando quindi sia la perdita di tempo collegata alla scelta di regimi terapeutici inadatti, sia ricadute psicologiche negative sul paziente stesso dovute all'inappropriatezza della terapia prescritta. Non bisogna dimenticare, infatti, che ogni anno negli USA si verificano più di 2 milioni di casi di reazioni avverse al farmaco, che negli Stati Uniti ed in Europa rappresentano la quarta causa di morte. Gli effetti collaterali gravi costituiscono un problema clinico ma anche economico rilevante, esasperato dal fatto che i farmaci sviluppati fino ad oggi non tengono conto delle singole individualità dei soggetti bensì della popolazione media, per cui funzionano per la maggioranza della popolazione ma risultano inefficaci se non addirittura tossici per una buona parte della stessa. Alla luce di quanto riportato emerge sicuramente che la farmacogenetica ha consentito la trasformazione della medicina tradizionale in medicina molecolare, cambiamento di certo legato anche al progresso delle tecniche e tecnologie delle analisi genetiche e degli strumenti diagnostici [2].

1.2. BIOMARCATORI MOLECOLARI

Un *biomarcatore molecolare* per definizione è una caratteristica misurabile del DNA e/o dell'RNA, che è stato dimostrato essere indicatrice di un processo biologico normale, patologico e/o di risposta alla terapia. Ne sono esempi gli SNPs, gli aplotipi, le modificazioni del DNA come la metilazione, i riarrangiamenti citogenetici e anche i livelli di espressione dell'RNA o dei microRNA. Nel corso degli anni, si è assistito ad un'evoluzione molto rapida sia del tipo di marcatori molecolari utilizzati per effettuare indagini di mappaggio su tutto il genoma (GWS, *Genome-Wide Search*), sia delle tecnologie impiegate per la loro analisi.

I primi marcatori ad essere utilizzati sono stati nel 1975 gli RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), polimorfismi biallelici che differiscono per la presenza o assenza di un sito di riconoscimento per uno specifico enzima di restrizione. Gli RFLP presentano un'ereditarietà mendeliana e sono sia numerosi che ben distribuiti in tutto il genoma; il fatto però di richiedere tempi di analisi abbastanza lunghi ha determinato la loro sostituzione con le sequenze minisatellite o VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Le VNTR, utilizzate fin dal 1985, sono corte sequenze ripetute in tandem di DNA (10-100 bp), caratterizzate sia dalla presenza di molti alleli che da un'elevata eterozigosi nella popolazione; la loro distribuzione non omogenea nel genoma e la dimensione notevole degli alleli (da poche centinaia a diverse kb) hanno costituito però un limite al loro utilizzo tanto da determinare il passaggio all'uso delle sequenze microsatelliti. I microsatelliti sono sequenze costituite da ripetizioni di-, tri- e tetra- nucleotidiche e, a differenza delle precedenti, offrono una copertura omogenea del genoma mantenendo anche un elevato grado di informatività. Grazie inoltre all'automatizzazione della tecnica di analisi dei microsatelliti stessi mediante l'impiego di specifici fluorofori coniugati ai *primer* di PCR e di sequenziatori automatici a tecnologia fluorescente per la separazione e lettura delle diverse varianti, è stato possibile aumentare notevolmente il numero di marcatori microsatelliti analizzati, passando da un minimo di 100 ad un massimo di 900, valore che consente di raggiungere una distanza media tra marcatori di circa 1 cM.

Il recente progresso della genomica ha messo in luce, inoltre, come una parte rilevante della variabilità tra individui (più del 90%) sia da attribuirsi a polimorfismi a singolo nucleotide: i cosiddetti SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*). Gli SNPs sono variazioni di sequenza del DNA che si verificano quando è alterato un solo nucleotide della sequenza genomica. Sebbene in principio gli SNPs possano essere polimorfismi di-, tri- o tetra-allelici, questi ultimi nell'uomo sono estremamente rari tanto che oramai con il termine di SNPs ci si riferisce a marcatori esclusivamente biallelici. Tali polimorfismi, presentando solo due alleli, risultano poco informativi, tuttavia sono molto utili in genetica perché hanno l'enorme vantaggio di essere molto numerosi e di distribuirsi in modo omogeneo nel genoma, garantendo una copertura non solo nelle sequenze intergeniche dove sono molto densi, ma anche in quelle intrageniche. L'esistenza, inoltre, di numerose tecniche in grado di rilevarli, dal sequenziamento diretto a sistemi basati sulla PCR, e l'implementazione di queste in supporti innovativi come *chip* ed *array* hanno reso possibile l'analisi automatizzata e ad alta processività di questi marcatori, tanto che in pochi anni il numero di SNPs genotipizzabili in un singolo esperimento è salito da 6000 a più di un milione.

Lo sviluppo così veloce delle tecnologie di genotipizzazione degli SNPs risiede nell'importanza che gli SNPs hanno assunto in ambito genetico in questi ultimi anni. In qualità di marcatore molecolare, infatti, essi permettono di valutare la presenza e l'estensione del *Linkage Disequilibrium* all'interno delle popolazioni, consentendo quindi di analizzare la composizione genetica di una popolazione nonché le relazioni filogenetiche tra popolazioni diverse. Oltre a questo ambito di applicazione vi è anche quello del mappaggio di geni responsabili di malattie mendeliane mediante analisi di *linkage* GWS (*Genome Wide Search*) in singole famiglie e in ultima istanza quello degli studi di associazione GWAS (*Genome Wide Association Study*) per valutare la predisposizione che alcune varianti geniche conferiscono ad una patologia multifattoriale in campioni di tipo caso-controllo o per stimare la probabilità di manifestare un determinato tratto fenotipico essendo portatore di uno specifico aplotipo [3]. Gli studi GWAS, infatti, analizzando milioni di SNPs, permettono di effettuare una vera e propria scansione dei polimorfismi dell'intero genoma, andando a individuare correlazioni tra determinati loci e alcuni tratti fenotipici di interesse. Se i risultati di correlazione ottenuti in uno studio, vengono poi confermati replicando l'analisi in un gruppo maggiore di pazienti, si può arrivare alla definizione di un nuovo marcatore molecolare. Attualmente i database pubblici (dbSNP) contengono circa 27 milioni di SNPs, 10 milioni dei quali sono stati validati ("rs" SNPs). Gli SNPs costituiscono il 90% delle variazioni di sequenza umane e rivestono un ruolo cruciale come fattori predittivi di rischio nei confronti di certe malattie multifattoriali. Anche se la maggior parte delle variazioni nel genoma umano sono sinonime e non hanno dunque effetto sulla regolazione dell'espressione di geni o sulla loro funzione, in alcuni casi, gli SNPs presenti nelle regioni codificanti (cSNPs) e regolatorie dei geni possono alterare la funzione genica, determinando variazioni nelle caratteristiche individuali, come ad esempio una differente suscettibilità ad una malattia o una differente risposta ai farmaci. Sempre più studi confermano l'associazione tra gli SNPs e la risposta a farmaci, in particolare antineoplastici e immunosoppressivi, pertanto l'approfondimento delle conoscenze nell'ambito della farmacogenetica potrà permettere di migliorarne l'efficacia e la tollerabilità garantendo una personalizzazione delle terapie farmacologiche, specialmente quelle a maggior rischio tossico.

1.3. TECNICHE DI GENOTIPIZZAZIONE

Negli ultimi anni si è assistito ad un rapido sviluppo sia delle tecniche che degli strumenti volti ad indagare il profilo mutazionale di geni con un ruolo chiave nello sviluppo di alcune patologie ad alta incidenza o mortalità come tumori, patologie neurodegenerative e malattie cardiovascolari e infettive. Attualmente accanto alle procedure "home made" si stanno affiancando un numero sempre maggiore di kit commerciali basati su procedure standardizzate e appropriati controlli. In generale le tecniche utilizzate per lo screening diagnostico o per la discriminazione allelica vengono suddivise in metodi diretti e indiretti a seconda che siano in grado di identificare in modo preciso il tipo di mutazione o ne mettano semplicemente in luce la presenza senza individuarne la natura.

1.3.1. METODI DI SCREENING DIRETTI

a. Sequenziamento

Il *sequenziamento* del prodotto di PCR secondo il metodo di Sanger è un metodo di screening diretto che consente di conoscere in modo puntuale la successione in basi di un tratto genomico amplificato mediante PCR. Mentre in passato il sequenziamento veniva condotto con l'ausilio di isotopi radioattivi, attualmente la marcatura più utilizzata è quella che prevede l'utilizzo di terminatori di catena (*big dye terminators*) rappresentati dai quattro dideossinucleotidi marcati con molecole fluorescenti. Il sequenziamento diretto è la tecnica sicuramente più diffusa e rappresenta il gold standard per evidenziare mutazioni puntiformi o *frameshift*, tuttavia non è quella in assoluto più sensibile; difficilmente una mutazione può essere evidenziata se presente in meno del 20% delle molecole di DNA analizzate.

b. Pyrosequencing

Il *pyrosequencing* è sicuramente la tecnica più innovativa ed è un metodo di sequenziamento del DNA, realizzato appositamente per studiare gli SNPs o mutazioni puntiformi. Il metodo del pyrosequencing si basa sul dosaggio del pirofosfato liberato in seguito all'attacco di un dNTP al filamento polimerizzato.

La tecnologia pyrosequencing rappresenta una promettente tecnologia, ampiamente affidabile, altamente sensibile e facilmente implementabile nella routine clinica di laboratorio anche per la sua semplicità di utilizzo e per la rapidità di esecuzione complessiva dei test (1 giorno)[4].

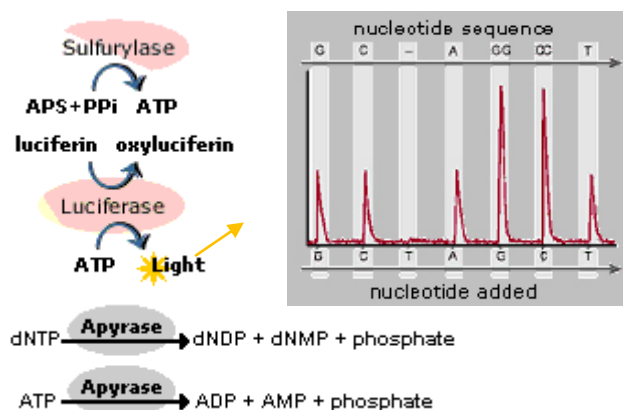


Fig. 1.1: Schema del metodo di sequenziamento del DNA mediante Pyrosequencing.

c. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Questa metodica identifica sostituzioni nucleotidiche e piccole delezioni o inserzioni e consiste nell'amplificazione del DNA mediante PCR utilizzando oligonucleotidi/*primers* complementari sia alla sequenza normale che a quella mutata/polimorfica. Per ogni campione si eseguono pertanto due amplificazioni, una con *primers* che riconoscono la sequenza *wild type* ed un'altra con *primers* complementari alla sequenza mutata o polimorfica di modo che in presenza di mutazioni/SNP allo stato omozigote l'amplificazione avverrà solo con la seconda coppia di *primers* e viceversa, mentre i soggetti eterozigoti per la mutazione amplificheranno il loro DNA in entrambe le condizioni. Una variante di questa tecnica è rappresentata dalla "ARMS multipla" che utilizza più *primers*, in un'unica reazione, in grado di amplificare più regioni genomiche e quindi di indagare più mutazioni contemporaneamente. Questa tecnica è utilizzata correntemente per l'analisi molecolare della talassemia e della fibrosi cistica.

d. Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

La *Real Time PCR* rappresenta un'evoluzione della tecnica PCR end-point rispetto alla quale consente di effettuare un'analisi oltre che qualitativa anche quantitativa del DNA di partenza e di ridurre le manipolazioni post-amplificazione. Il termine Real Time deriva dal fatto che tale metodo misura l'amplificazione durante la fase esponenziale della PCR, quando cioè l'efficienza di amplificazione è influenzata minimamente dalle variabili di reazione, permettendo di ottenere risultati molto più accurati rispetto alla PCR tradizionale end-point in cui la valutazione viene effettuata al termine della reazione di amplificazione. La PCR Real-Time può essere effettuata con due differenti chimiche di reazione; la prima vede l'utilizzo di coloranti fluorescenti che si intercalano in modo aspecifico nella doppia elica del DNA amplificato, la seconda vede invece l'utilizzo di sonde fluorescenti specifiche per il tratto di DNA da amplificare. L'utilizzo di sonde sequenza-specifiche viene sfruttato nelle indagini di discriminazione allelica per identificare polimorfismi di sequenza, così come per la tipizzazione di virus e batteri.

e. Reverse Dot Blot (RLB)

Il "*Reverse Dot Blot*" o "*Reverse Line Blot*" (RLB) è una tecnica molto versatile che permette la caratterizzazione molecolare di un'ampia gamma di disordini e patologie a base genetica o virale; attraverso questa metodologia è possibile, infatti, effettuare lo screening di mutazioni geniche, la genotipizzazione di polimorfismi di sequenza come SNP o piccole inserzioni/delezioni e anche la tipizzazione virale. Il saggio RLB si basa sull'ibridazione specifica tra oligonucleotidi sintetici o *probes* adesi ad un supporto di nylon o nitrocellulosa e una regione genomica precedentemente amplificata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Le *probes* hanno in genere una lunghezza che va dai 20 ai 30 nucleotidi e vengono immobilizzate sul supporto sfruttando o l'irradiazione UV oppure il legame covalente con il supporto; nel primo caso si usano sonde con una coda di poli-T lunga in genere 30nt, mentre nel secondo caso è necessario utilizzare un supporto carico o positivamente o negativamente e delle sonde coniugate con dei gruppi chimici specifici (ad esempio gruppi carbossilici o ammine primarie) che, in seguito ad attivazione chimica, reagiscono con la membrana. Per poter evidenziare l'ibridazione tra l'amplificato e la sequenza complementare dell'oligonucleotide, l'amplificazione è condotta utilizzando dei *primers* coniugati a biotina che, al termine dell'ibridazione, viene riconosciuta e legata da un complesso streptoavidina-fosfatasi alcalina. In ambiente alcalino e in presenza di un substrato cromogeno (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, BCIP e nitroblu tetrazolio cloruro, NBT), l'enzima catalizza la

reazione di idrolisi del BCIP, determinando la formazione di un intermedio colorato che riduce l'NTB in NTB formazano, un composto di colore blu intenso che si deposita sul supporto formando dei "dots" o delle "lines" a seconda della tecnica utilizzata per spottare le sonde sul supporto. Il saggio RLB è completamente automatizzabile grazie alla disponibilità nel mercato di diversi strumenti sia per la dispensazione delle sonde sulla membrana che per le fasi di ibridazione e rivelazione colorimetrica; in aggiunta è possibile avvalersi di software interpretativi che leggono il pattern di bande evidenziabile sulla membrana e ne forniscono un risultato di facile interpretazione. Oltre a questi aspetti, molti altri fattori rendono tale metodo particolarmente adatto ad essere usato in ambito diagnostico; primi fra tutti la semplicità di esecuzione, la velocità (<4h) e l'elevata sensibilità e specificità. Amplificando in multiplex più regioni genomiche è poi possibile analizzare simultaneamente più target molecolari e su più individui contemporaneamente [5].

1.3.2. METODI DI SCREENING INDIRECTI

a. High Resolution Melting (HRM)

L'analisi HRM è utilizzata come metodo di screening per la detezione, in amplificati genomici, di mutazioni nucleotidiche, polimorfismi e differenze epigenetiche. Il metodo HRM risulta particolarmente adatto ad effettuare analisi di genotipizzazioni (gene-scanning) su larga scala, in quanto è in grado di caratterizzare campioni di acido nucleico, con estrema accuratezza e in tempi rapidi. La tecnica si basa sull'analisi della curva di melting o di dissociazione di prodotti di amplificazione, dalla cui particolare sequenza dipende la forma e l'andamento della curva stessa. Analizzando quindi il profilo di dissociazione del dsDNA, al variare della temperatura, diventa possibile discriminare e caratterizzare sequenze di DNA che differiscono anche per una singola base. Rispetto ad altri metodi molto laboriosi o costosi, l'HRM non richiede la costruzione di *primers* allele-specifici o sonde sequenza-complementari ma si serve di marcatori intercalanti fluorescenti (SYBR® Green 1, SYTO® 9, Eva Green™ etc.) utilizzati comunemente nel sistema di Real Time PCR; la tecnica risulta pertanto facilmente implementabile nei laboratori diagnostici già esistenti e la semplicità operativa del metodo la renderà sicuramente il principale strumento di analisi molecolare.

b. Analisi Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP)

L'SSCP è una tecnica dotata di buona sensibilità (>85%), semplicità di esecuzione e basso costo che permette di valutare la presenza di mutazioni puntiformi di cui non è nota a priori la localizzazione, in una sequenza di DNA precedentemente amplificata. La metodica consiste in una corsa elettroforetica di prodotti di PCR e si basa sul principio che brevi frammenti di DNA (di lunghezza < 300bp), a singolo filamento e in condizioni non denaturanti, assumono differenti conformazioni tridimensionali dipendenti da interazioni intramolecolari che a sua volta sono funzione della loro sequenza nucleotidica. Siccome dalla conformazione e dalle dimensioni di una molecola, dipende la sua mobilità elettroforetica, frammenti genici che differiscono anche di una base soltanto presenteranno profili di migrazione elettroforetica differenti, se sottoposti ad un campo elettrico su un gel di poliacrilammide non denaturante. Sebbene apparentemente molto semplice e intuitiva, l'SSCP presenta dei limiti che ne hanno ridotto l'applicabilità su larga scala; la capacità, infatti, di evidenziare differenze nucleotidiche tra due sequenze di DNA è fortemente

dipendente da una serie di parametri strumentali come la concentrazione di acrilamide del gel, la potenza applicata agli elettrodi, la temperatura e la forza ionica, per cui è necessario standardizzare la procedura operativa per ogni tipo di sequenza analizzata prima di poter procedere allo screening mutazionale.

c. Analisi di RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

In biologia molecolare con il termine RFLP si indicano quei polimorfismi, quindi quelle variazioni nella sequenza del DNA, relativi alla presenza di specifici siti di restrizione tali per cui, in seguito alla digestione del DNA con specifiche endonucleasi di restrizione, risulta un pattern di frammenti di differenti lunghezze che può essere utilizzato per distinguere gli individui tra loro.

La procedura di analisi degli RFLP prevede che i frammenti di DNA, ottenuti dalla digestione con uno o più enzimi di restrizione, vengano separati in gel d'agarosio mediante elettroforesi e infine visualizzati ai raggi X sfruttando l'ibridizzazione con delle sonde marcate con radioisotopi, le cosiddette RFLP *probes*, complementari a uno o più frammenti di DNA.

In campo medico-diagnostico la procedura ha vaste applicazioni, dai test di paternità fino alla diagnosi dei portatori di geni malattia, sebbene la laboriosità della metodica e la necessità di impiegare sonde radiomarcate abbiano limitato notevolmente il suo utilizzo su larga scala. Per ovviare a tali inconvenienti, si sono sviluppate delle varianti dell'RFLP caratterizzate da maggior rapidità di esecuzione e sensibilità. Una di queste è la *Cleaved Amplified Polymorphic Sequence* (CAPS) in cui si supera il problema dell'isolamento di una quantità sufficiente di DNA, antepoendo alla digestione enzimatica l'amplificazione della sequenza di interesse. La tecnica però può anche essere sfruttata come metodo di screening di mutazioni, scegliendo per esempio un'endonucleasi di restrizione che riconosca una sequenza presente nella forma *wild type* e non nelle varianti alleliche del gene, in modo che dal pattern di frammenti ottenuti dalla digestione della sequenza di interesse amplificata, sia possibile dedurre lo stato mutazionale del gene.

La tecnica in ogni caso rappresenta un metodo di screening indiretto pertanto è necessario affiancarla ad un metodo diretto, quale il sequenziamento, per identificare con precisione il tipo di mutazione che ha determinato la perdita del sito di restrizione. Un ulteriore limite della metodica riguarda l'applicabilità limitata in quanto solo quei geni le cui mutazioni note cadono in corrispondenza di un sito di restrizione possono essere analizzati.

1.4. LINEE GUIDA SUI TEST GENETICI

Per *test genetico* si intende l'analisi a scopo clinico di DNA, RNA, cromosomi, proteine, metaboliti o altri prodotti genici per evidenziare genotipi, mutazioni, polimorfismi, fenotipi o cariotipi correlati a patologie ereditabili umane oppure utili a predire la risposta o la resistenza ad un farmaco.

Lo sviluppo dei test genetici attraversa in generale tre stadi di ricerca; il primo stadio riguarda l'identificazione della correlazione tra una determinata alterazione genetica ed una data patologia. Nel secondo stadio sperimentale viene verificata l'accuratezza del test nell'evidenziare l'alterazione genetica (validità analitica) e lo specifico fenotipo ad esempio una malattia o la predisposizione ad una patologia oppure la sensibilità ad un farmaco (validità clinica). La validità analitica di un test genetico è data dalla sua specificità e dalla sua sensibilità. La specificità

analitica corrisponde alla proprietà del metodo di determinare esclusivamente il marcatore bersaglio per il quale è stato destinato e quindi rappresenta la capacità del metodo di discriminare fra diversi componenti di un sistema. La sensibilità analitica corrisponde, invece, al limite di rilevazione del metodo cioè alla più piccola quantità di marcatore bersaglio che può essere determinata con precisione. La validità clinica è determinata dalla sensibilità clinica, dalla specificità clinica e dal valore predittivo positivo. La sensibilità clinica o diagnostica corrisponde alla percentuale di campioni che sono positivi al test sul totale dei campioni che effettivamente contengono l'analita che il test vuole ricercare e indica la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato positivo in presenza del marcatore bersaglio; un elevato valore di sensibilità clinica indica quindi la presenza di pochi "falsi negativi". La specificità clinica o diagnostica corrisponde alla percentuale di campioni che sono negativi al test sul totale dei campioni che effettivamente non contengono l'analita che il test vuole ricercare e indica la probabilità che il dispositivo fornisca un risultato negativo in assenza del marcatore bersaglio; un valore elevato di specificità clinica indica quindi la presenza di pochi "falsi positivi". Il valore predittivo positivo è la probabilità che un individuo risultato positivo al test abbia effettivamente la patologia in esame. La validazione analitica di un nuovo metodo richiede che esso venga confrontato con il metodo considerato *gold standard* o di riferimento per quell'indagine che il test intende effettuare. La validazione richiede determinazioni ripetute al fine di valutare la riproducibilità e la ripetibilità del test e anche prove in cieco di campioni già codificati, cioè campioni che fungono da controllo positivo e negativo e per i quali sia già nota l'alterazione che si intende analizzare. Il terzo stadio sperimentale, infine, è quello della valutazione dell'utilità clinica del test genetico per l'individuo e la collettività. L'utilità clinica viene valutata considerando le implicazioni mediche del test, l'esistenza e l'efficacia di interventi/cure cui sottoporre gli individui positivi al test, il rapporto costo-beneficio e le ricadute etico-sociali dell'introduzione del test nella pratica clinica. E' quindi importante analizzare l'impatto clinico del test cioè stabilire i benefici e i rischi associati sia ai risultati positivi che a quelli negativi e valutare se il test può comportare un miglioramento sul piano clinico sia a scopi preventivi che terapeutici (ad esempio scelta della cura più efficace).

Sia la validità analitica che la validità e l'utilità clinica debbono essere valutate all'interno di protocolli sperimentali soggetti al controllo degli organi di consulenza scientifica del Ministero della Sanità.

In particolare, per poter essere immessi sul mercato e per poter circolare nella Comunità Europea i test diagnostici devono rispettare ed adempiere una serie di requisiti essenziali di sicurezza e di efficacia descritti nella direttiva 98/79/CE, recepita dal D.Lgs.332/2000 e riguardanti non solo i dispositivi in sé ma anche il loro sistema produttivo.

I requisiti generali sono rivolti alla sicurezza intrinseca del dispositivo medico-diagnostico *in vitro* e riguardano:

- 1) *la sicurezza e la salute dei pazienti e utilizzatori;*
- 2) *l'analisi del rischio;*
- 3) *la minimizzazione dei rischi connessi con l'utilizzo;*
- 4) *la valutazione delle prestazioni in termini di sensibilità analitica, sensibilità diagnostica, specificità analitica, specificità diagnostica, esattezza, ripetibilità e riproducibilità (performance);*
- 5) *l'inalterabilità delle caratteristiche delle prestazioni sia in relazione all'utilizzo che durante il trasporto e l'immagazzinamento (stabilità);*

I requisiti relativi alla progettazione e alla fabbricazione sono dedicati agli aspetti tecnologici e sono divisi in otto gruppi di norme:

- 1) *caratteristiche chimiche e fisiche*, relative alla qualità dei materiali impiegati per la produzione del dispositivo;
- 2) *infezione e contaminazione microbica*, riporta i requisiti relativi alla sterilità e al suo mantenimento applicabili ai dispositivi, agli ambienti di lavoro e all'imballaggio;
- 3) *caratteristiche relative alla fabbricazione e all'ambiente*, elenca i rischi che devono essere previsti o eliminati in fase di progettazione e di fabbricazione del dispositivo;
- 4) *dispositivi costituiti da strumenti o apparecchi con funzioni di misura*, riguardano la precisione ed accuratezza delle apparecchiature con funzione primaria di misurazione analitica;
- 5) *protezione contro le radiazioni*, riguarda i requisiti previsti per i dispositivi destinati ad emettere radiazioni;
- 6) *requisiti per i dispositivi medici collegati a, o dotati di, una fonte di energia* come software o sistemi elettronici (rischi elettromagnetici, elettrici, meccanici e termici);
- 7) *requisiti per i dispositivi per test autodiagnostici*, previsti per assicurare la facilità di utilizzo del dispositivo e la riduzione del rischio di errori da parte di utilizzatori profani;
- 8) *informazioni fornite dal fabbricante*, sezione dedicata all'etichettatura (del dispositivo, dei flaconi, delle scatole di una entità o di un insieme di componenti) e ai manuali di istruzioni per l'uso, per un corretto utilizzo sia dei reagenti che dello strumento, che accompagnano il dispositivo.

Ogni dispositivo deve essere corredato delle informazioni necessarie per garantire un'utilizzazione appropriata e sicura e per identificare il fabbricante [nome o ragione sociale e indirizzo del fabbricante, indicazioni per identificare il dispositivo e il contenuto della confezione, codice del lotto o numero di serie, data di scadenza espressa in anno/mese/(giorno) entro in cui il dispositivo può essere utilizzato senza riduzione delle prestazioni, condizioni specifiche di conservazione e/o manipolazione (T °C, esposizione alla luce, maneggiabilità del prodotto) per garantire la stabilità del prodotto, dicitura che indichi l'uso in vitro del dispositivo (IVD), precauzioni e/o avvertenze come simboli di pericolo, simboli rischio chimico/radioattivo/biologico, appropriate frasi di rischio e di sicurezza].

Per soddisfare i requisiti tecnici il fabbricante può applicare norme armonizzate (art.6 del D.Lgs. 332/2000) la cui applicazione è volontaria ma che comunque conferiscono presunzione di conformità ai requisiti essenziali fissati dalla direttiva.

Considerando nello specifico i dispositivi medico-diagnostici in vitro, questi possono essere divisi in quattro categorie:

- 1) *dispositivi medico-diagnostici in vitro appartenenti all'allegato II – elenco A*;
sono compresi i reagenti e i prodotti reattivi per la determinazione di alcuni gruppi sanguigni e per la rilevazione di infezioni da HIV 1 e 2, HTLV I e II e da epatiti B, C e D.
- 2) *dispositivi medico-diagnostici in vitro appartenenti all'allegato II – elenco B*;
sono compresi una varietà di reagenti e di prodotti reattivi compresi i materiali per la determinazione di certi gruppi sanguigni, degli anticorpi anti-eritrocitari, del marcatore PSA, dei gruppi tissutali DR, A, B per la diagnosi di fenilchetonuria, per la diagnosi di

infezioni da rosolia, toxoplasma, citomegalovirus e clamidia e per il rischio di trisomia 21; sono inclusi anche i test di autodiagnosi per la misurazione del glucosio nel sangue.

- 3) *dispositivi medico-diagnostici in vitro per test autodiagnostici*; qualsiasi dispositivo predisposto dal fabbricante per essere usato da persone non esperte.
- 4) *tutti i dispositivi medico-diagnostici in vitro non compresi nell'allegato II e non destinati a test autodiagnostici*; sono compresi un grande numero di prodotti che non presentano un danno diretto al paziente.

L'immissione nel mercato dei dispositivi dell'allegato II (A e B) richiede una certificazione da parte di Organismi Notificati (enti pubblici o privati, abilitati all'interno di uno Stato Membro) designati ed autorizzati a svolgere attività di certificazione nell'ambito della direttiva.

Per gli altri tipi di dispositivi il fabbricante stesso può dichiarare e garantire che i prodotti soddisfano le disposizioni della direttiva predisponendo la documentazione tecnica relativa al dispositivo su progettazione, fabbricazione, analisi dei rischi e dati di valutazione delle prestazioni. Nello specifico le informazioni da riportare nella documentazione tecnica per valutare la conformità di un IVD ai requisiti essenziali riportati nell'Allegato I del decreto legislativo 332/2000 sono descritte nell'allegato III sezione 3. In generale la documentazione (dichiarazione CE di conformità) deve includere:

- 1) *nome e indirizzo del fabbricante*;
- 2) *identificazione del dispositivo* (nome, marca, modello, numero di lotto, serie);
- 3) *descrizione del prodotto* (*intended use* o destinazione d'uso, caratteristiche funzionali, tipologia di appartenenza in base alla norma vigente, modelli e varianti previste, compatibilità e/o eventuali altri dispositivi e/o accessori);
- 4) *documentazione del sistema qualità* (disposizioni adottate dal fabbricante per garantire il sistema di qualità documentate sotto forma di strategie e di procedure scritte quali programmi, schemi, manuali e rapporti riguardanti la qualità);
- 5) *informazioni di progetto del dispositivo* (materie prime, caratteristiche specifiche delle prestazioni e limiti dei dispositivi e metodi);
- 6) *informazioni sul metodo di fabbricazione* (schema e descrizione delle tecnologie utilizzate, specifiche dei componenti e dei materiali e procedure dei controlli di qualità);
- 7) *corrispondenza tra i requisiti essenziali e i documenti nel dossier*;
- 8) *risultati dell'analisi del rischio e azioni intraprese per minimizzare il rischio*;
- 9) *dati adeguati di valutazione delle prestazioni* (supportati da informazioni su metodi di riferimento, materiali di riferimento, valori di riferimento conosciuti, esattezza e unità di misure utilizzate, dati ottenuti o da studi svolti in ambiente clinico o da riferimenti bibliografici);
- 10) *etichette e manuali di istruzione per l'uso* (materiali e modalità di confezionamento e imballaggio, documentazione allegata, esemplari delle etichette per ciascun prodotto);
- 11) *sterilizzazione* (descrizione del processo e validazione);
- 12) *validazione dei processi* (metodi di validazione di particolari processi);
- 13) *risultati degli studi di stabilità*;

Una volta redatta la dichiarazione di conformità CE ai requisiti essenziali (allegato I) in base all'allegato III della direttiva 98/79/CE, in cui si dichiara che il prodotto soddisfa le disposizioni della direttiva, il fabbricante può marcare CE IVD il prodotto e immetterlo in commercio.

Riguardo ai test farmacogenetici in particolare, la FDA ha redatto delle linee guida specifiche per regolamentare le sottomissioni e le notifiche premarket di test farmacogenetici e genetici. La maggior parte dei test farmacogenetici fornisce informazioni che coadiuvano il medico nella scelta del regime terapeutico (tipologia e dosaggio di un farmaco) più adatto per il paziente e generalmente si basano sull'analisi di polimorfismi/mutazioni implicati nell'attività catalitica di enzimi coinvolti nel metabolismo di farmaci o analiti esogeni. I test genetici invece servono a confermare un sospetto patologico e si applicano a individui a rischio di sviluppare o che si sospetta abbiano una certa patologia o condizione.

Per ciascun test che si intende immettere nel commercio è necessario fornire alcune informazioni:

- 1) *intended use* (descrizione del marker che il test deve misurare, l'utilità di misurare quel marker e la popolazione a cui il test si rivolge);
- 2) *indicazioni d'uso* (test predittivo o prognostico per una patologia, per il follow-up post trattamento, test per valutare la sensibilità/resistenza ad un farmaco, test per valutare la risposta al trattamento);
- 3) *metodologia impiegata* (strumentazione richiesta per condurre il test, composizione e layout delle piattaforme di indagine es. *probes* o arrays, sequenza di *probes*, *primers* o oligonucleotidi usati, condizioni di ibridazione, lavaggio etc, componenti del saggio come buffers, enzimi, fluorofori e reagenti, metodi di estrazione del DNA, *range* delle concentrazioni di DNA ottimali di partenza per eseguire il saggio, controlli forniti o richiesti, metodi usati per garantire la specificità delle *probes* ed evitare il fenomeno della cross-reattività tra sonde, stabilità e riproducibilità del saggio);
- 4) *interpretazione dei risultati*;
- 5) *limitazioni del saggio e controlli di qualità*;
- 6) *performance*;
- 7) *validità clinica (falsi positivi e negativi)*;
- 8) *rappporto rischio-beneficio*;

Il test richiede sempre una validazione analitica al fine di valutare le performance del saggio.

Deve essere specificato il materiale di partenza; pertanto vanno valutati diversi metodi di estrazione del DNA e va indicato il metodo che garantisce sia le migliori performance che la massima riproducibilità in termini di risultati del test. Le prestazioni del test devono essere valutate in presenza di concentrazioni elevate di DNA di partenza e deve anche essere determinato il limite di rilevabilità del test al fine di stabilire il *range* di concentrazioni di DNA che garantisce dei risultati riproducibili e accettabili. Va determinata la precisione del test in termini di ripetibilità (stesso giorno, sito, operatore, lotto e strumenti) e riproducibilità (tra sedute, giorni, siti, operatori, lotti e strumenti) per assicurarsi di rilevare tutte le possibili fonti di variabilità del saggio e va valutata la stabilità del test cioè l'intervallo di tempo entro cui il saggio mantiene inalterate le sue caratteristiche. E' necessario dimostrare l'abilità del test di differenziare accuratamente e in modo riproducibile genotipi, alleli o mutazioni usando le concentrazioni iniziali di DNA minime e massime riportate nel manuale d'uso. La robustezza del test va anche valutata variando le concentrazioni dei reagenti e/o le condizioni di ibridazione o di amplificazione al fine di ottimizzare il saggio e di conoscere le condizioni che minimizzano o causano cross-reattività e/o cross-ibridazioni aspecifiche tra *probes* e DNA. Infine vanno specificati i limiti del test sia analitici che clinici per esempio il numero e i tipi di mutazioni/polimorfismi/alleli indagati. Se il test si

correda di strumenti o software, ne vanno specificate le caratteristiche e il funzionamento (come assegna i valori o le variabili che tiene in considerazione, come e con che frequenza va calibrato, sorgenti di errore); inoltre, sia gli strumenti che i software vanno validati per assicurarne il loro corretto funzionamento. Naturalmente nel caso di test farmacogenetici o genetici, l'FDA raccomanda di validare il saggio eseguendo degli studi che confrontano i risultati ottenuti con il dispositivo medico, con quelli ottenuti con un metodo di riferimento o gold standard o in aggiunta con un altro dispositivo medico ben caratterizzato; nel caso in cui la popolazione testata fosse rappresentativa della popolazione sulla quale il test è destinato ad essere usato i dati di validazione possono essere riportati come sensibilità e specificità clinica.

1.5. TEST GENETICI DI INTERESSE COMMERCIALE

Attualmente grande interesse è rivolto a test genetici in grado di predire la risposta ai farmaci al fine di personalizzare la terapia, diminuendo il rischio di effetti avversi e riducendo i costi legati alla gestione clinica dei pazienti. Un esempio è dato dai test per predire il dosaggio di farmaci anticoagulanti di tipo cumarinico (Warfarin) oppure per l'individuazione del regime terapeutico più appropriato in pazienti con epatite C cronica (Interferone, Ribavirina, Agenti DAAs).

1.6. WARFARIN

Il Warfarin è il principio attivo di un farmaco commercialmente noto come Coumadin®, marchio registrato della Bristol-Myers Squibb Company. Il farmaco è indicato per la profilassi e il trattamento della trombosi venosa e dell'embolia polmonare, per la profilassi delle complicazioni tromboemboliche associate alla fibrillazione atriale (AF), alla cardiopatia reumatica e/o all'impianto di protesi valvolari cardiache e per ridurre il rischio di eventi ischemici e tromboembolici sistemici, in seguito a un evento primario di infarto del miocardio, che potrebbero risultare in complicazioni tromboemboliche gravi e fatali.

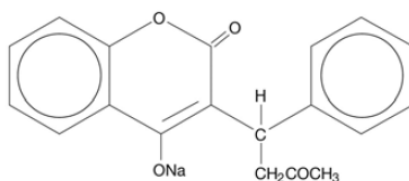


Fig. 1.2: formula chimica strutturale del Warfarin (C₁₉H₁₅NaO₄).

FARMACODINAMICA

Il Coumadin® (Warfarin sodium) limita la sintesi, Vitamina K - dipendente, dei fattori della coagulazione II, VII, IX e X e delle proteine anticoagulanti C e S attraverso l'inibizione della subunità C1 dell'enzima VKORC1 (*Vitamin K Epoxide Reductase Complex Subunit*) deputato al turnover della Vitamina K dalla forma ossidata a quella ridotta (attiva). La Vitamina K è un

cofattore dell'enzima GGCX (γ -Glutamyl Carbossilasi) che catalizza la carbossilazione post-traduzionale, a livello di residui di acido glutammico, dei fattori della coagulazione, determinando la formazione di residui di acido γ -carbossiglutammino essenziali per l'attività biologica e l'attivazione dei fattori stessi. Come cofattore, la vitamina K agisce nella sua forma ridotta e una volta ossidata viene rigenerata dall'enzima VKORC1, pertanto il Warfarin, agendo da antagonista competitivo della vitamina K ossidata e inattivando l'enzima VKORC1, limita la disponibilità di Vitamina K ridotta determinando una riduzione nel tasso di produzione dei fattori della coagulazione funzionalmente attivi. Gli effetti anticoagulanti del farmaco si apprezzano in genere dalle 24 alle 72 ore dopo la somministrazione e perdurano da 2 a 5 giorni in modo dipendente dall'emivita dei fattori stessi: 60 ore per il fattore II, 4-6 ore per il fattore VII, 24 ore per il fattore IX, 48-72 ore per il fattore X e 8-30 ore per le proteine C e S.

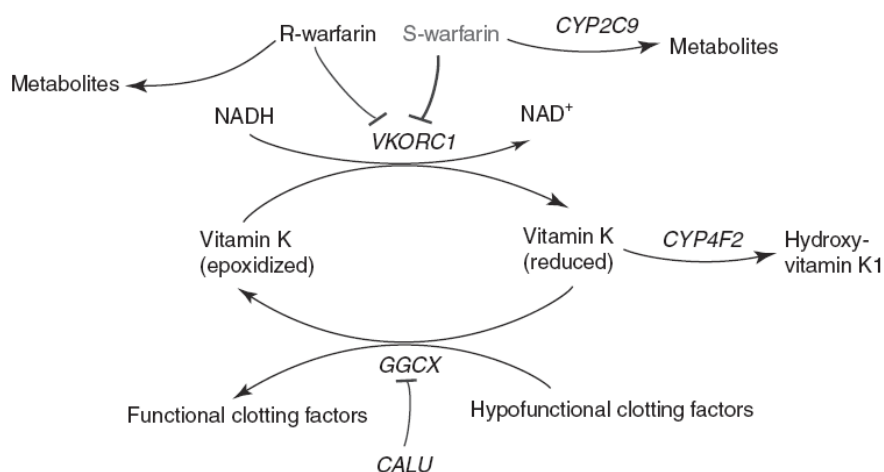


Fig. 1.3: il Coumadin[®] viene somministrato come una miscela racemica di due enantiomeri: la forma S e la forma R. La forma S, maggiormente attiva, è metabolizzata principalmente dal citocromo P450-2C9. L'effetto farmacologico del farmaco è mediato dall'inibizione dell'enzima VKORC1 che a sua volta limita la formazione di Vitamina K in forma attiva (ridotta) necessaria alla carbossilazione dei fattori della coagulazione II, VII, IX e X. La dieta può influenzare la coagulazione aumentando l'intake di Vitamina K; inoltre, sono noti alcuni polimorfismi nel gene *CYP4F2* che diminuiscono l'attività dell'enzima CYP4F2 e quindi promuovono un accumulo di vitamina K ridotta [6].

FARMACOCINETICA

Chimicamente il Warfarin si presenta sotto forma di una miscela racemica degli enantiomeri S e R. La forma S risulta da 3 a 5 volte più potente della forma R, sebbene sia anche metabolizzata più velocemente (l'emivita della forma S è ridotta del 50% rispetto alla forma R, 21-43 ore Vs. 37-89 ore). Il Warfarin è essenzialmente assorbito completamente in seguito alla somministrazione orale con un picco di concentrazione intorno alle 4 ore. Il volume di distribuzione apparente è di circa 0.14 L/Kg e circa il 99% del farmaco si trova legato alle proteine plasmatiche. L'eliminazione del farmaco avviene essenzialmente per metabolismo; il Warfarin è convertito in metaboliti idrossilati dagli enzimi del citocromo P-450 microsomiali e in metaboliti ridotti (alcoli) da reductasi epatiche. Diversi isoenzimi del CYP450 sono coinvolti nella clearance del farmaco tra cui CYP2C9, 2C19, 2C8, 2C18, 1A2 e 3A4; l'enantiomero S è metabolizzato principalmente dal CYP2C9 a 7-idrossiWarfarin mentre la forma R è metabolizzata dal CYP1A2 e CYP3A4. Studi di radiomarcatura

hanno dimostrato che più del 92% del farmaco somministrato *per os* è escreto con le urine nelle forme idrossilate o ridotte.

FARMACOGENETICA

Differenti varianti polimorfiche dell'enzima CYP2C9 (CYP2C9*2 e CYP2C9*3) sono responsabili di una modulazione *in vivo* dell'attività anticoagulante del Warfarin e di una ridotta clearance dello stereoisomero S del farmaco. Le varianti CYP2C9*2 e *3 si caratterizzano per una diminuita attività enzimatica *in vitro*, pertanto i pazienti portatori di queste varianti in omo- o eterozigosi (*2*2, *3*3, *2*3) presentano un rischio maggiore di andare incontro a eventi emorragici in seguito a terapia anticoagulante con farmaci cumarinici; la frequenza allelica di tali varianti nella popolazione caucasica è approssimativamente dell'11% e 7% rispettivamente per la variante *2 e *3. Altre varianti alleliche del gene CYP2C9 (*5, *6 e *11 nelle popolazioni di origine africana e *5, *9 e *11 nella popolazione caucasica) si associano sempre a una ridotta attività enzimatica ma mostrano delle frequenze alleliche molto basse (MAF ~ 0.5%) e sono quindi trascurabili ai fini clinici. Sono stati correlati ad un maggior rischio emorragico anche altri polimorfismi nel gene *VKORC1*; il polimorfismo rs9923231 in posizione c.-1639 G>A, in particolare, influenza l'efficienza trascrizionale del promotore del gene *VKORC1* determinando una riduzione dell'espressione genica che si riflette in un aumentato rischio di eventi emorragici e in una maggiore sensibilità al farmaco nei pazienti portatori in omozigosi dello SNP. Infine, il polimorfismo rs2108622 nel gene *CYP4F2* è stato correlato ad un aumentato rischio protrombotico in quanto si associa a una ridotta concentrazione microsomiale della proteina P450 4F2 e di conseguenza ad una maggiore biodisponibilità di Vitamina K ridotta.

INDICAZIONI TERAPEUTICHE

Il dosaggio del Coumadin® e la durata del trattamento devono essere individualizzate per ciascun paziente in accordo all'INR individuale, allo scopo terapeutico e alle condizioni cliniche del paziente. In genere viene somministrata una dose iniziale di 3-5 mg/die, basandosi sulla dose di mantenimento media della popolazione; sulla base della risposta coagulativa del paziente, valutata misurando l'INR, la dose iniziale viene progressivamente aggiustata fino a definire la dose di mantenimento che a seconda dei casi può variare in un *range* da 4 a 80 mg/settimana.

Tromboembolismo Venoso (incluso DVT *deep venous thrombosis* e PE *pulmonary embolism*)

Il dosaggio del farmaco va ottimizzato per raggiungere e mantenere un INR target di 2,5 (2<INR<3) per tutta la durata del trattamento (3 mesi in caso di DVT o PE secondari a un fattore di rischio, tempi prolungati in caso di episodi trombotici ricorrenti). Studi condotti in pazienti con sostituzione valvolare cardiaca hanno dimostrato che l'utilizzo del farmaco evita il verificarsi di eventi trombotici in un periodo di tempo maggiore rispetto all'aspirina in combinazione con pentossifillina o dipiridamolo.

Fibrillazione Atriale (AF)

In pazienti con AF non valvolare ed ad elevato rischio di infarto (con precedenti attacchi ischemici o embolia sistemica o due dei seguenti fattori di rischio: età maggiore a 75 anni, funzionalità del ventricolo sinistro severamente compromessa, storia di ipertensione o diabete mellito) è

raccomandato un trattamento anticoagulante con Warfarin protratto nel tempo. Lo stesso per pazienti con AF e stenosi mitralica; in caso di pazienti con AF e valvole cardiache meccaniche l'INR target può essere maggiore e il regime terapeutico può prevedere la somministrazione di aspirina a seconda del tipo di valvola o di altri fattori di rischio. Cinque studi clinici prospettici e randomizzati, condotti su 3711 pazienti con AF non reumatica, hanno valutato l'effetto del Warfarin dimostrando una sostanziale riduzione del rischio di eventi tromboembolici sistemici dal 60% all' 86%.

Tab. 1.1: studi clinici sull'utilizzo del Warfarin in pazienti con AF non reumatica.

Study	N		PT Ratio	INR	Thromboembolism		% Major Bleeding	
	Warfarin-Treated Patients	Control Patients			% Risk Reduction	p-value	Warfarin-Treated Patients	Control Patients
AFASAK	335	336	1.5-2.0	2.8-4.2	60	0.027	0.6	0.0
SPAF	210	211	1.3-1.8	2.0-4.5	67	0.01	1.9	1.9
BAATAF	212	208	1.2-1.5	1.5-2.7	86	<0.05	0.9	0.5
CAFA	187	191	1.3-1.6	2.0-3.0	45	0.25	2.7	0.5
SPINAF	260	265	1.2-1.5	1.4-2.8	79	0.001	2.3	1.5

*All study results of warfarin vs. control are based on intention-to-treat analysis and include ischemic stroke and systemic thromboembolism, excluding hemorrhagic stroke and transient ischemic attacks.

Infarto Miocardico

Gli individui con infarto miocardico sono pazienti ad alto rischio a cui è raccomandato un trattamento con Warfarin (talora assieme ad Aspirina $\leq 100\text{mg}/\text{die}$, anche se tale associazione deve essere attentamente e individualmente valutata in relazione al rapporto rischio/beneficio) per almeno 3 mesi. Lo studio randomizzato WARIS (*The Warfarin Re-Infarction Study*), condotto in doppio cieco su 1214 pazienti trattati da 2 a 4 settimane con Warfarin in seguito ad un evento infartuale (INR compreso tra 2,8 e 4,8) ha valutato la mortalità e il numero di infarti e di eventi cerebrovascolari dopo trattamento. Al termine dei 37 mesi di *follow-up* è stato possibile valutare la riduzione del rischio del 24, 34 e 54%.

CONTROINDICAZIONI

La somministrazione di Coumadin® è controindicata in donne in gravidanza in quanto il farmaco può risultare teratogeno; oltrepassa, infatti, la barriera placentare e può causare embriopatie, fetotossicità, malformazioni congenite ed emorragie fetali fatali, esponendo quindi ad un aumentato rischio di aborto spontaneo o mortalità fetale.

Altri rischi associati all'uso del Warfarin sono: fenomeni emorragici, discrasie sanguigne, maggiore tendenza a sanguinamenti in caso di ulcere dei tratti gastrointestinale, genitourinario o respiratorio, di endocarditi batteriche, pericarditi, aneurismi cerebrali ed emorragie cerebrali, eclampsia, preeclampsia ed ipertensione maligna. Il rischio di eventi emorragici è più elevato nel primo mese di trattamento e tra i fattori predisponenti l'emorragia rientrano in particolare un INR > 4.0 o INR molto instabili, età ≥ 65 , anamnesi di sanguinamenti gastrointestinali, ipertensione, patologie cerebrovascolari, gravi malattie cardiache, anemia, insufficienza renale, neoplasie, traumi, concomitante assunzione di altri farmaci, terapia anticoagulante di lunga durata e

omozigosi per alcuni polimorfismi genetici nei geni coinvolti nel metabolismo del farmaco. In tutti i casi sopracitati e in caso di cambiamenti nell'alimentazione o nell'assunzione di farmaci concomitante al Coumadin® si consiglia un monitoraggio dell'INR da eseguire a intervalli di tempo ravvicinati nonché un aggiustamento posologico mirato ed una durata della terapia adeguata alle condizioni cliniche del paziente.

Una reazione avversa relativamente rara (<0.1%) ma molto grave è rappresentata dalla necrosi e/o cancrena tissutale; la necrosi può conseguire a una trombosi locale e nei casi più gravi può determinare la sospensione della somministrazione di Coumadin®.

La terapia anticoagulante può causare anche una destabilizzazione delle placche aterosclerotiche che si accompagna a un aumentato rischio di rilascio di emboli lipidici di colesterolo; a seconda del tessuto interessato dall'embolia i segni e i sintomi possono variare in un ampio *range* di manifestazioni sebbene gli organi maggiormente interessati siano i reni seguiti da pancreas, milza e fegato. La formazione di microemboli a livello dei tessuti molli del piede è causa di una sindrome distinta nota come sindrome della dita porporine ("*Purple Toes Syndrome*") che costituisce motivo di interruzione della terapia anticoagulante.

L'utilizzo di Warfarin può accompagnarsi a reazioni avverse minori come disturbi gastrointestinali (nausea, vomito, diarrea, dolore addominale, flatulenza), reazioni di ipersensibilità o allergia (orticaria, reazioni anafilattiche), disturbi epatobiliari (epatiti, aumento degli enzimi epatici nel siero) e del tratto respiratorio, eruzioni cutanee, alopecia e dermatiti.

È sconsigliabile l'uso di Coumadin® in pazienti con HIT o HITTS (*Heparin-induced Thrombocytopenia* o *Heparin-induced Thrombocytopenia with Thrombosis Syndrome*) in quanto la sostituzione dell'eparina con il Warfarin è stata associata a cancrena venosa degli arti inferiori e ischemia.

Altri fattori clinici associati ad un aumentato rischio di eventi avversi in seguito alla terapia anticoagulante comprendono disfunzioni epatiche che possono influenzare sia la sintesi dei fattori della coagulazione che il metabolismo del Warfarin, infezioni o alterazioni della flora intestinale che influenzano l'assorbimento della vitamina K, ipertensione, vasculite, diabete mellito e deficit di proteina C o S; il Warfarin riduce la sintesi sia di proteina C che di proteina S, pertanto i pazienti che presentano deficit ereditario o acquisito (epatopatia, infezioni gravi, coagulazione intravascolare disseminata, uso di contraccettivi orali, chemioterapia oncologica, intervento chirurgico) di proteina C o S presentano un rischio più elevato di andare incontro a necrosi cutanea dopo somministrazione di Warfarin.

Alcuni farmaci, inoltre, possono dare delle interazioni farmacologiche alterando la farmacocinetica o la farmacodinamica del Warfarin. I meccanismi farmacocinetici interessati sono principalmente l'induzione enzimatica (carbamazepine, fenobarbital etc.), l'inibizione enzimatica (amiodarone, fluconazolo, voriconazolo, fluvastatina e fluvoxamina) e la riduzione del legame alle proteine plasmatiche come l'albumina (sulfamidici). Da un punto di vista farmacodinamico invece alcuni farmaci interagiscono con il Coumadin mediante sinergismo (anticoagulanti: dabigatran o eparina, agenti anti-piastrinici: aspirina, clopidogrel, agenti anti-infiammatori non steroidei: diclofenac, ibuprofene, naprossene, inibitori del re-uptake della serotonina: fluvoxamina, paroxetina, sertralina etc.), antagonismo competitivo o causando alterazioni del pathway metabolico della Vitamina K. Inibitori degli enzimi CYP2C9, 1A2 e/o 3A4 potenziano l'effetto del Warfarin mentre induttori dei medesimi enzimi riducono l'effetto del Warfarin. Altri fattori che agiscono sull'INR determinandone un aumento sono diarrea, disturbi epatici, astenia, deficienza

di Vitamina K (aumentato INR), mentre un aumentato *intake* di Vitamina K o la resistenza ereditaria al Warfarin si associano ad un diminuito INR.

1.6.1. PROSPETTIVE FUTURE

Il Warfarin è uno degli anticoagulanti orali più utilizzati in Europa e in Nord America nella prevenzione e nella terapia di fenomeni tromboembolici; ogni anno, infatti, si contano circa 30 milioni di prescrizioni e 2 milioni di nuovi pazienti iniziano la terapia anticoagulante con Coumadin®. Diversi aspetti, tuttavia, rendono il Warfarin un farmaco di non semplice utilizzo in ambito clinico. Il Warfarin, infatti, presenta un ristretto indice terapeutico che si riflette in un *range* limitato tra la dose terapeutica e la dose tossica; gli effetti avversi sono gravi e non reversibili e concentrazioni di farmaco subterapeutiche si associano a complicazioni serie e potenzialmente fatali; la risposta terapeutica varia poi notevolmente considerando pazienti diversi e a volte anche lo stesso paziente ed inoltre, interazioni multiple con altri farmaci e con gli alimenti possono determinare variazioni anche ampie dell'effetto anticoagulante pur mantenendo costante la dose del farmaco. Questi aspetti rendono necessario un continuo monitoraggio terapeutico dello stato coagulativo del paziente attraverso misurazioni seriali dell'INR e fanno della TAO (*Terapia Anticoagulante Orale*) una terapia difficile da attuare e seguire regolarmente sia per il medico che per il paziente.

Recentemente, è entrato in commercio un nuovo farmaco antitrombotico, il Pradaxa® con un meccanismo di azione differente rispetto al Warfarin e ai principali farmaci della categoria (enoxaparina e aspirina). Il principio attivo di Pradaxa è il dabigatran etexilato, un profarmaco di piccole dimensioni che una volta metabolizzato per idrolisi a livello epatico agisce da inibitore competitivo e reversibile della trombina (Fattore II) e impedisce l'aggregazione piastrinica indotta dalla trombina. Diversi studi (RE-MODEL e RE-NOVATE e RE-LY) hanno dimostrato e confermato l'efficacia antitrombotica di Pradaxa nella profilassi del tromboembolismo venoso in seguito a chirurgia ortopedica e in pazienti con fibrillazione atriale mentre uno studio di fase II, che ha messo a confronto il dabigatran etexilato con il Warfarin in 252 pazienti sottoposti a sostituzione di valvola meccanica, ha registrato un numero maggiore di sanguinamenti e di eventi tromboembolici con dabigatran etexilato rispetto a Warfarin. Dal marzo 2008, anno in cui l'EMA (*European Medicine Agency*) ha approvato la commercializzazione del farmaco nell'Unione Europea, l'impiego di Pradaxa è limitato a pazienti che rientrano in determinate categorie di rischio; le indicazioni terapeutiche dell'utilizzo di Pradaxa® sono la prevenzione primaria di episodi tromboembolici (TEV, Tromboembolismo Venoso) in pazienti adulti sottoposti a chirurgia sostitutiva elettiva totale dell'anca o del ginocchio e la prevenzione di ictus ed embolia sistemica in pazienti adulti con fibrillazione atriale non valvolare con uno o più fattori di rischio (precedente ictus, attacco ischemico transitorio o embolia sistemica, frazione di eiezione del ventricolo sinistro <40%, insufficienza cardiaca sintomatica ≥2, età ≥75 anni, età ≥65 anni e diabete mellito, coronaropatia o ipertensione). Sicuramente il Pradaxa®, rispetto al Coumadin, presenta numerosi vantaggi come la pronta rapidità di azione e l'assenza di interazioni con gli alimenti; il dabigatran, inoltre, non richiede un monitoraggio continuo dell'attività anticoagulante e non causa una riduzione dei livelli di proteina C e S prevenendo così la comparsa, in soggetti carenti di tali proteine su base ereditaria o acquisita, di necrosi cutanea. Tuttavia il dabigatran non è privo di interazioni farmacologiche (ad esempio con gli inibitori della P-glicoproteina) e pur presentando

un'efficacia comparabile a quella del Warfarin si associa ad un aumentato rischio di effetti avversi di tipo non emorragico (soprattutto gastrointestinali come dispepsia) che pongono fondamentale un'accurata sorveglianza delle condizioni cliniche del paziente in cura con Pradaxa®. Tutt'oggi poi il Pradaxa, così come e i NOACs (*New Oral Anticoagulants*) che agiscono come inibitori diretti dei fattori della coagulazione (es. Rivaroxaban o Apixaban) non hanno un antidoto la cui efficacia sia stata comprovata in clinica e questo è di particolare rilevanza in pazienti con ridotta clearance del farmaco come soggetti anziani o con insufficienza renale. Per tale farmaco, inoltre, i dati sull'efficacia e la sicurezza sono ancora limitati in confronto al Warfarin o ad altri anticoagulanti. Ulteriori dati post-marketing saranno quindi di grande utilità per definire con maggiore confidenza gli ambiti di utilizzo di Pradaxa in clinica; per ora, considerando anche i costi legati all'utilizzo del nuovo anticoagulante (3000 dollari/anno rispetto ai 48 dollari/anno del Warfarin) la TAO con Coumadin rappresenta il regime terapeutico di elezione per pazienti ad alto rischio tromboembolico.

1.6.2. FATTORI PREDITTIVI PRETRATTAMENTO

L'*outcome* della terapia anticoagulante è il mantenimento dell'INR (*International Normalized Ratio*) all'interno di una *range* stabilito che va da 2.0 a 3.0. L'INR è un indice normalizzato che dà una misura del tempo necessario affinché il sangue coaguli. L'INR si esprime come il rapporto tra il tempo di protrombina del paziente (PT_{paziente}) e il tempo di protrombina di riferimento ($PT_{\text{riferimento}}$) elevato alla potenza del fattore ISI (*International Sensitivity Index*), che tiene conto della variabilità esistente tra lotti diversi dei reagenti usati per fare l'analisi, per il sistema analitico utilizzato. L'uso dell'INR è da preferirsi rispetto al PT in quanto è un indice standardizzato e permette quindi di confrontare e paragonare risultati di laboratori differenti.

Nel caso del Warfarin il *range* terapeutico è molto ristretto e per $INR \geq 4$ e $INR \leq 2$ i pazienti sono esposti rispettivamente a un aumentato rischio di sanguinamento e di eventi trombotici. Un'ulteriore limite della TAO (Terapia Anticoagulante Orale) è data dal fatto che esiste un'ampia variabilità inter-individuale nella risposta al trattamento che rende necessaria una personalizzazione della terapia al fine di ottimizzare la posologia e determinare per ciascun paziente la dose di farmaco efficace.

Attualmente la terapia con Warfarin prevede una fase iniziale di induzione che termina al raggiungimento dell'INR terapeutico e una fase successiva di mantenimento in cui l'INR viene mantenuto stabile. Ad oggi però non esiste una dose iniziale standard che consenta il raggiungimento dell'INR terapeutico nel 100% dei casi e la dose di mantenimento ottimale per ciascun paziente viene raggiunta a posteriori attraverso aggiustamenti posologici successivi, sulla base della risposta del paziente misurata come scostamento dal valore bersaglio di INR; a seconda dei casi la dose iniziale in genere varia dai 5 ai 10mg/die, mentre la dose di mantenimento può variare in un *range* che va da 3 a 9mg/die. Durante tutta la durata della terapia, inoltre, è essenziale monitorare l'INR a intervalli di tempo regolari, più ravvicinati nella fase di induzione e successivamente ogni 1-4 settimane. Nelle fasi iniziali della terapia il rischio di sovra o sottodosaggio del farmaco è comunque molto elevato; è noto, infatti, che la probabilità di reazioni avverse durante le fasi iniziali della terapia è 10 volte maggiore di quella riscontrabile dopo 12 mesi di trattamento e che più del 20% dei pazienti in cura con Coumadin® viene ricoverato per emorragie entro sei mesi dall'inizio della terapia anticoagulante e nei casi più gravi

va incontro a morte. Al fine di migliorare la gestione clinica del paziente sono stati condotti numerosi studi con l'obiettivo sia di identificare fattori predittivi di risposta che di valutare l'impatto di diversi fattori clinici e genetici sulla variabilità dose-risposta del Warfarin.

I principali fattori di variabilità si sono dimostrati essere l'età che contribuisce per un 7% alla variabilità totale, il peso (9%), polimorfismi genetici nel gene *VKORC1* (23%) e nel gene *CYP2C9* (15%) e medicazioni, patologie concomitanti e altri fattori minori (44%) [7].

L'età può influire nella capacità di metabolizzare il farmaco, pertanto a pazienti di età superiore ai 60 anni è consigliabile ridurre la dose di carico e di mantenimento per ottenere un INR terapeutico. Tenendo conto della distribuzione delle varianti alleliche *VKORC1**3 e *CYP2C9**2 -*3, dosi iniziali e/o di mantenimento minori devono essere considerate anche per pazienti di origine asiatica. L'azione del farmaco può essere influenzata anche dalla dieta che può alterare l'assunzione di Vitamina K e dalla concomitante somministrazione di altri farmaci che possono indurre o inibire gli enzimi che metabolizzano il Warfarin.

La capacità predittiva di modelli di dosaggio basati su dati clinici e demografici in genere si attesta sul 25%, mentre con l'aggiunta del dato genetico relativo alle varianti alleliche dei geni *CYP2C9* e *VKORC1* la percentuale sale al 60%; inoltre, incrementando il numero di polimorfismi indagati (per esempio varianti alleliche dei geni *CYP4F2* e *GGCX*) la capacità predittiva si avvicina al 73% [8].

Tab. 1.2: fattori clinici e demografici associati alla dose di Warfarin [9]

Variable	Effect on warfarin Dose	P value
Demographic variables		
Age, per decade	-13%	<.0001
BSA, per SD	+15%	<.0001
White (compared to African-American) race	-15%	0.003
Female (compared to male) sex	-12%	0.007
Clinical variables		
Target INR, per 0.5 increase	+17%	0.02
Creatinine clearance, per SD	+10%	0.002
Amiodarone	-24%	0.007
Number of drugs that raise INR, per drug	-5%	0.06
Simvastatin	-12%	0.07

BSA = body surface area; SD = standard deviation;
INR = international normalized ratio.

L'utilizzo del dato genetico nella pratica clinica non è ancora del tutto consolidato sebbene sempre più studi evidenzino l'importanza della conoscenza del profilo genetico per una corretta gestione del paziente e siano disponibili in rete anche numerosi algoritmi di dosaggio che predicono la dose ottimale per ciascun paziente combinando assieme le variabili ad oggi note per influenzare l'efficacia del farmaco [10][11].

L'FDA, inoltre, nel 2007 ha approvato una revisione del foglietto illustrativo del farmaco, sottolineando l'opportunità e l'utilità di utilizzare il dato genetico per predire la dose iniziale di farmaco necessaria a raggiungere un INR terapeutico e nel 2010 ha ulteriormente aggiornato il

foglietto illustrativo inserendovi una tabella con i dosaggi (mg/die) raccomandati per raggiungere l'INR terapeutico sulla base del genotipo VKORC1 e CYP2C9 (Tab. 1.3).

Tab. 1.3: tre range di dosaggi di mantenimento giornalieri raccomandati (mg/die) se noto il dato genetico.

VKORC1	CYP2C9					
	*1/*1	*1/*2	*1/*3	*2/*2	*2/*3	*3/*3
GG	5-7 mg	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg
AG	5-7 mg	3-4 mg	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg
AA	3-4 mg	3-4 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg	0.5-2 mg

Un altro dato a favore dell'implementazione della farmacogenetica in ambito clinico è derivato dalla conclusione di uno studio comparativo, The Medco-Mayo Warfarin Effectiveness Study, condotto dal 2007 al 2009 su 896 pazienti per valutare se la conoscenza del profilo genetico del paziente fosse realmente in grado di fornire un'informazione aggiuntiva al clinico e avesse un impatto favorevole sull'*outcome* clinico. I risultati dello studio hanno evidenziato che il tasso di ricoveri ospedalieri per eventi tromboembolici era inferiore del 43% nel gruppo di pazienti genotipizzati rispetto al gruppo di controllo dimostrando quindi la sostanziale utilità dell'uso dei test genetici prima di iniziare la terapia anticoagulante orale [12].

Non bisogna poi dimenticare che in media più del 50% della popolazione globale è portatrice di almeno una delle varianti alleliche del gene CYP2C9 (CYP2C9*2, CYP2C9*3) o del gene VKORC1 (VKORC1 c. -1639 G>A) [13]; considerando anche la variante CYP4F2*3, il 53% di Americani di origine africana (AA) e ben l'87-95% di Asiatici, Caucasic, Ispanici e AJ (Ashkenazi Jewish) ha almeno due delle varianti descritte (VKORC1, CYP2C9 e/o CYP4F2*3), pertanto risulta evidente che la personalizzazione della terapia su base genetica oltre che possibile è perlomeno necessaria per ridurre al minimo gli eventi avversi e garantire al paziente la terapia migliore [14]

Tab. 1.4: frequenze alleliche specificate per etnia [13].

	CYP2C9*2 (T)	CYP2C9*3 (C)	VKORC1 3673 (A)
Reported in the Literature:			
Asian ⁴⁻⁶	0%	1.5 - 2.8%	89.9 - 91.4%
Black ^{7,8}	5.2%	1%	8.8 - 9.5%
Hispanic ⁹⁻¹²	4.8 - 12%	3 - 6.0%	45%
White ^{3,4,7,8,13-15}	10.5 - 13.1%	5.8 - 8.4%	37.1 - 43%

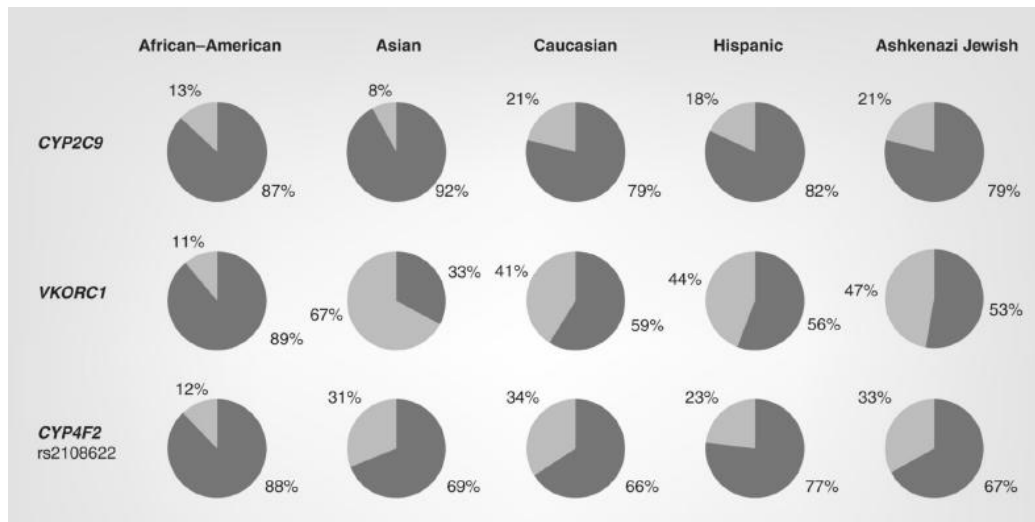


Fig. 1.4: frequenza allelica combinata delle varianti del gene CYP2C9 associate a una diminuita attività enzimatica (*2, *3, *5, *6, *8, *11) dell'enzima P450-2C9 e frequenze alleliche delle varianti VKORC1 c.-1639 G>A (rs9923231) e CYP4F2*3 (rs210822) in diversi gruppi etnici. La frequenza della variante *wild-type* è rappresentata in colore grigio scuro, mentre le frequenze delle varianti alleliche sono rappresentate in grigio chiaro [14].

1.6.3. RUOLO DELLA GENETICA NELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

Gran parte della variabilità inter-individuale osservata nella dose terapeutica di Warfarin ha base genetica ed è imputabile a polimorfismi genici che influenzano l'efficacia anticoagulante del farmaco modificandone sia la farmacocinetica che la farmacodinamica.

I polimorfismi genici più significativi in tal senso sono gli SNPs: rs9923231 nel gene VKORC1, rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 e infine rs2108622 nel gene CYP4F2.

1.6.3.1. VKORC1

VKORC1 è un gene di 11kb, localizzato nel braccio corto del cromosoma 16 in posizione p11.2 che codifica per la subunità 1 del complesso della vitamina K epossido reduttasi (VKOR), enzima responsabile del turnover della vitamina K dalla forma ossidata (vitamina K 2,3 epossido) alla forma ridotta e funzionalmente attiva. Dal momento che l'enzima VKORC1 rappresenta il bersaglio molecolare del Warfarin diversi studi hanno concentrato l'attenzione su questa proteina al fine di elucidare i possibili meccanismi farmacodinamici alla base dell'ampia variabilità inter-individuale nel rapporto dose-risposta, osservato nei pazienti che intraprendono una terapia a base di farmaci cumarinici. Differenti mutazioni non sinonime sono state identificate in pazienti resistenti al Warfarin ma non nella popolazione generale, suggerendo l'ipotesi che variazioni geniche nella regione codificante del gene siano estremamente dannose ed escludendo quindi la possibilità che esse siano in qualche modo collegate alla diversa sensibilità al farmaco osservata nei pazienti in cura con Warfarin [15]. Rieder e colleghi hanno condotto uno studio per determinare se polimorfismi nelle regioni non codificanti del gene potessero contribuire quindi alla variabilità nella dose di mantenimento con Warfarin arruolando un totale di 554 pazienti. Il DNA di 186 pazienti di origine europea è stato analizzato mediante sequenziamento a livello della

regione promotoriale (5kb), intergenica (4,2kb) e 3'UTR (2kb). I 10 SNPs più comuni (MAF > 5%) sono stati genotipizzati in campioni di DNA depositati di diversa origine etnica (americani di origine europea, africana e asiatica) e, infine, i 4 SNPs risultati più significativi sono stati utilizzati per definire degli aplotipi di rischio [16].

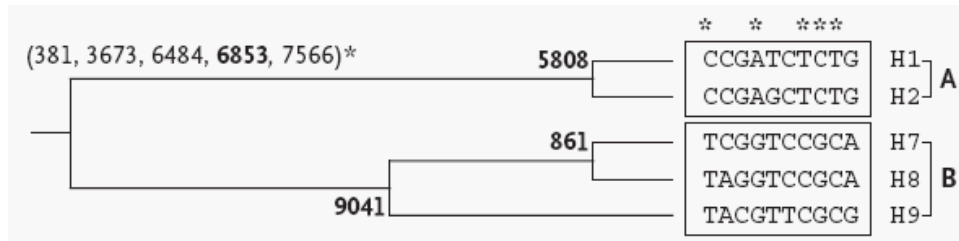


Fig. 1.5: aplotipi comuni (H1, H2, H7, H8 e H9) identificati sulla base del genotipo degli SNPs in posizione 381, 861, 2653, 3673, 5808, 6009, 6484, 6853, 7566 e 9041 della sequenza di riferimento del gene *VKORC1* (GenBank AN: AY587020). Gli asterischi indicano gli SNPs in *linkage disequilibrium*, fortemente associati alla dose di mantenimento di Warfarin ($P < 0.001$), mentre gli SNPs evidenziati in **grassetto** sono stati utilizzati per discriminare tra i diversi rami e per distinguere i gruppi di aplotipi A e B.

Dei 9 aplotipi (H1-H9) dedotti dai 10 SNPs più comuni, solo 5 mostravano una frequenza superiore al 5% e sono stati quindi presi in considerazione nell'analisi. Tra questi, gli aplotipi H1, H2, H7 e H9 sono risultati essere correlati in modo statisticamente significativo ($P \leq 0.05$) al dosaggio di farmaco: in particolare gli aplotipi H1 e H2 sono risultati associati ad una dose di farmaco minore mentre gli aplotipi H7 e H9 sono risultati associati a dosaggi maggiori di Warfarin. Stratificando i pazienti per i gruppi di aplotipi A/A, A/B e B/B è stato possibile quindi desumere la dose di mantenimento attesa di Warfarin, pari a 6.2 ± 0.3 mg/die nel caso dei soggetti B/B, 4.9 ± 0.2 mg/die nei portatori degli aplotipi A/B e 2.7 ± 0.2 mg/die nei pazienti A/A.

La correlazione tra i polimorfismi del gene *VKORC1* e il dosaggio del farmaco può essere spiegata anche a livello cellulare considerando i livelli di espressione genica di *VKORC1*; saggi di quantificazione dell'mRNA hanno infatti dimostrato che i livelli di *VKORC1* mRNA sono maggiori di circa tre volte negli individui B/B rispetto ai soggetti A/A ($P < 0.05$).

Tab. 1.5: relazione tra la variante allelica *VKORC1* c. -1639 G>A e l'espressione genica [7].

Haplotype	<i>VKORC1</i> (-1639G>A)	
	Enzyme production	Nomenclature
BB	Low (higher warfarin dose)	Normal, Wild
AB	Medium	Heterozygote
AA	High (lower warfarin dose)	Homozygote

Il valore predittivo degli aplotipi H1, H2, H7, H8 e H9 è particolarmente elevato nelle popolazioni di origine europea e asiatica dove i cinque aplotipi rendono conto rispettivamente del 96% e del 99% di tutti gli aplotipi presenti; nelle popolazioni di origine africana la distribuzione degli aplotipi è molto più diversificata ed eterogenea e i gruppi di aplotipi A e B hanno una frequenza complessiva del 62% (14% per il gruppo predittivo di una dose bassa e 49% per il gruppo predittivo di una dose alta di Warfarin). Gli SNPs in posizione 381, 3673 (c.-1639 G>A), 6484 (c.173

+ 1000 C>T), 6853 e 7566, oltre ad essere in LD, sono risultati poi i polimorfismi maggiormente predittivi, in grado di spiegare circa il 25%-30% della variabilità inter-individuale nella dose-risposta al Warfarin. Considerando che tale valore scende al 10% nel caso delle varianti alleliche del gene *CYP2C9*, *VKORC1* rappresenta sicuramente il più importante fattore genetico nell'influenzare la risposta al Warfarin e nel predire l'*outcome* terapeutico.

I risultati riportati da Rieder sono stati confermati anche da numerosi altri studi che hanno dimostrato l'influenza dei polimorfismi localizzati nelle regioni non codificanti del gene *VKORC1* nella risposta individuale al Warfarin [10][11][17]. Tuttavia, sebbene i polimorfismi di *VKORC1* spieghino dall'11% al 32% della variabilità nella dose efficace di farmaco nella popolazione bianca e asiatica, negli afroamericani tale percentuale scende al 4%-10%. Per tale ragione, Limdi e colleghi hanno valutato il valore predittivo di una serie di polimorfismi del gene *VKORC1* (-1639G>A, 1173C>T, 497T>G, 1542G>C, 2255C>T e 3730G>A) in una corte multietnica di 4886 pazienti (1103 asiatici, 670 neri, 3113 bianchi) con l'obiettivo di individuare i polimorfismi che maggiormente influenzano l'effetto anticoagulante del Warfarin nelle diverse etnie. Tutti e sei gli SNPs si trovano in LD (*Linkage Disequilibrium*, R^2) e in particolare gli SNPs rs9923231 (c.-1639 G>A) e rs9934438 (c. 173 + 1000 C>T) mostrano un forte LD in tutti i gruppi etnici considerati ($R^2 = 0.97$ in asiatici, $R^2 = 1.00$ nei neri e $R^2 = 0.99$ nei bianchi) [18]

Da analisi univariate e multivariate, condotte considerando fattori clinici e il genotipo *CYP2C9*, i polimorfismi rs9923231 e rs9934438 sono poi risultati equamente informativi e in grado di spiegare circa il 4% di variabilità nella dose-risposta al Warfarin nella popolazione nera, un 18,4% in quella asiatica e più del 22% di variabilità nei bianchi. L'aggiunta degli SNPs 497T>G, 1173C>T e 1542G>C in modelli predittivi di dosaggio basati su dati clinici e genetici come l'algoritmo IWPC (The International Warfarin Pharmacogenetics Consortium) che prende in considerazione il polimorfismo rs9923231, il genotipo *CYP2C9*, l'età, l'altezza e il peso ha permesso di aumentarne la capacità predittiva di solo lo 0.3%-1%; allo stesso modo l'incorporazione degli aplotipi di *VKORC1* in modelli predittivi di dosaggio non ha migliorato in modo significativo la predizione della dose di farmaco efficace in asiatici, bianchi e neri rispetto allo SNP rs9923231 da solo, dimostrando il sostanziale valore del polimorfismo nello spiegare gran parte della variabilità inter-individuale nel dosaggio del Warfarin nelle diverse etnie.

Tab. 1.6: frequenza allelica del polimorfismo rs9923231 (*VKORC1* c. -1639 G>A) in diverse popolazioni [14].

Allele	African-American [†] (n = 600)		Asian (n = 204)		Caucasian (n = 212)		Hispanic (n = 202)		Ashkenazi Jewish [‡] (n = 1004)	
	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI
VKORC1										
g.-1639G	0.892	0.867–0.917	0.333	0.269–0.398	0.594	0.528–0.660	0.564	0.496–0.633	0.533	0.490–0.576
g.-1639A	0.108	0.083–0.133	0.667	0.602–0.731	0.406	0.340–0.472	0.436	0.367–0.504	0.467	0.424–0.510

Tab. 1.7: frequenze genotipiche per la variante VKORC1 c. -1639 G>A [14].

VKORC1 g.-1639G>A genotype	Observed (expected [†]) frequency (%)				
	African-American [‡] (n = 300)	Asian (n = 102)	Caucasian (n = 106)	Hispanic (n = 101)	Ashkenazi Jewish [§] (n = 260)
G/G	80.3 (79.5)	22.5 (11.1)	36.8 (35.3)	30.7 (31.8)	29.2 (28.4)
G/A	17.7 (19.3)	21.6 (44.4)	45.3 (48.2)	51.5 (49.2)	48.1 (49.8)
A/A	2.0 (1.2)	55.9 (44.4)	17.9 (16.5)	17.8 (19.0)	22.7 (21.8)

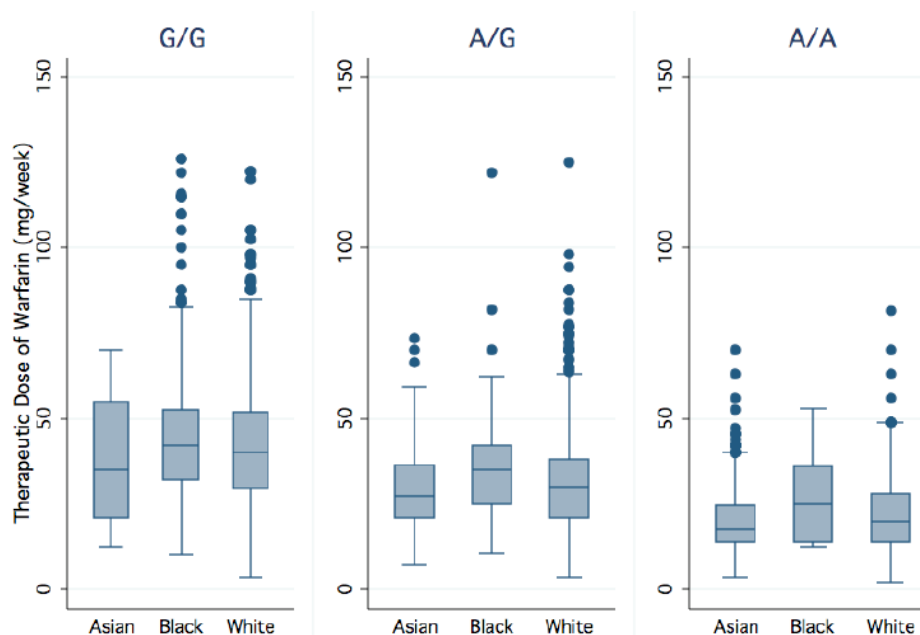


Fig. 1.6: dosi terapeutiche di Warfarin stratificate per etnia e genotipo VKORC1 (SNP rs9923231 c. -1639 G>A). La MAF (Minor Allele Frequencies) varia all'interno dei diversi gruppi etnici e ciò rispecchia la differente percentuale di variabilità spiegata dal polimorfismo nella dose di farmaco necessaria per ottenere un INR terapeutico [18].

1.6.3.2. CYP2C9

Il gene *CYP2C9*, che mappa nel braccio lungo del cromosoma 10 in posizione 10q24.2, codifica per l'enzima microsomale della famiglia dei citocromi P450 2C9, responsabile del metabolismo ossidativo di vari substrati endogeni (acido arachidonico e linoleico) ed esogeni, tra cui numerosi farmaci come Warfarin, fenitoina, losartan, tolbutamide, torasemide, diclofenac e anti-infiammatori non steroidei (NSAIDS) [19]. In letteratura si riportano 57 varianti alleliche del gene *CYP2C9* (CYP2C9*1-CYP2C9*57) (<http://www.cypalleles.ki.se/cyp2c9>), tuttavia solo di alcune sono noti la frequenza allelica nelle diverse popolazioni e l'impatto sia sull'attività enzimatica dell'enzima P450-2C9 che di conseguenza sul metabolismo dei farmaci substrato dell'enzima P450-2C9 (<http://www.pharmkgb.org>).

Ogni variante allelica del gene *CYP2C9* viene indicata con lo star (*) seguito da un numero progressivo ed è definita da uno specifico genotipo a livello di uno o più SNPs (aplotipo).

La variante *1 rappresenta la forma *wild-type* del gene, che corrisponde ad un fenotipo “normal metabolizer”. Il genotipo CYP2C9*1*1 è condiviso da circa il 95% degli asiatici e afroamericani, da circa l’80% della popolazione Ispanica e da circa il 65% della popolazione caucasica. In queste ultime, il 30% degli individui porta almeno una o entrambe le varianti *2 e *3 che sono correlate ad una riduzione dell’attività enzimatica di circa il 20-30% [20].

Tab. 1.8: lista delle principali varianti alleliche del gene CYP2C9 con un impatto significativo sull’attività enzimatica; per ogni variante sono riportati l’allele di riferimento, il cambiamento aminoacidico corrispondente e l’effetto sull’attività enzimatica [6].

Allele	Constituted by genotypes at:	Amino acid changes	Enzymatic Activity
*1	reference allele at all positions		Normal
*2	C>T at rs1799853	R144C	Decreased
*3	A>C at rs1057910	I359L	Decreased
*4	T>C at rs56165452	I359T	Decreased
*5	C>G at rs28371686	D360E	Decreased
*6	delA at rs9332131	273frameshift	Null
*7	C>A at rs67807361	L19I	
*8	G>A at rs7900194	R150H	Decreased
*9	A>G at rs2256871	H251R	
*11	C>T at rs28371685	R335W	Decreased
*12	C>T at rs9332239	P489S	Decreased
*13	T>C at rs72558187	L90P	Decreased
*14	G>A at rs72558189	R125H	Decreased
*15	C>A at rs72558190	S162X	Null
*16	A>G at rs72558192	T299A	Decreased
*17	1144C>T	P382S	
*18	A>C at rs1057910, A>C at rs72558193, A>T at rs1057911	I359L; D397A	Decreased
*25	delAGAAATGGAA at rs72558188	118frameshift	Null
*33	G>A at rs72558184	R132Q	Decreased

Tab. 1.9: frequenze alleliche delle principali varianti del gene CYP2C9 suddivise per etnia [14].

Allele	African-American [‡] (n = 600)		Asian (n = 204)		Caucasian (n = 212)		Hispanic (n = 202)		Ashkenazi Jewish [‡] (n = 1004)	
	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI
CYP2C9										
*1	0.867	0.839–0.894	0.922	0.885–0.958	0.788	0.733–0.843	0.822	0.769–0.875	0.788	0.763–0.813
*2	0.028	0.015–0.042	0.029	0.006–0.053	0.151	0.103–0.199	0.069	0.034–0.104	0.128	0.108–0.149
*3	0.020	0.009–0.031	0.039	0.013–0.066	0.057	0.025–0.088	0.064	0.031–0.098	0.083	0.066–0.100
*4	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000
*5	0.015	0.005–0.025	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.015	0.000–0.032	0.001	0.000–0.003
*6	0.010	0.002–0.018	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.005	0.000–0.015	0.000	0.000–0.000
*8	0.047	0.030–0.064	0.010	0.000–0.023	0.000	0.000–0.000	0.015	0.000–0.032	0.000	0.000–0.000
*11	0.013	0.004–0.023	0.000	0.000–0.000	0.005	0.000–0.014	0.010	0.000–0.024	0.000	0.000–0.000
*13	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000	0.000	0.000–0.000

La genotipizzazione delle varianti alleliche del gene CYP2C9 permette la discriminazione di tre categorie di pazienti: i metabolizzatori lenti (*Poor Metabolizer*, PMs) i metabolizzatori intermedi (*Intermediate Metabolizer*, IMs) e i metabolizzatori veloci (*Extensive Metabolizer*, EMs) (Tab. 1.10).

Tab.1.10: correlazione tra le varianti alleliche del gene CYP2C9 e il metabolismo del Warfarin [7].

CYP2C9		
Genotype	Metabolism	Nomenclature
*1/*1	Extensive, Rapid, Ultra-metabolizer	Normal, Wild
*1/*2	Intermediate	Heterozygote
*1/*3	Poor, Slow	Heterozygote
*2/*3	Poor, Slow	Compound heterozygote
*2/*2	Poor, Slow	Homozygote
*3/*3	Extremely slow	Homozygote

Tab. 1.11: frequenze genotipiche per il gene CYP2C9, suddivise per etnia. n: numero di soggetti; † frequenze predette sulla base dell'equilibrio di Hardy-Weinberg [14].

Predicted metabolizer phenotype/genotype	Observed (expected [†]) frequency (%)				
	African-American [‡] (n = 300)	Asian (n = 102)	Caucasian (n = 106)	Hispanic (n = 101)	Ashkenazi Jewish [§] (n = 502)
Extensive metabolizer					
*1/*1	75.7 (75.1)	86.3 (84.9)	66.0 (62.1)	70.3 (67.5)	62.4 (62.1)
Intermediate metabolizer					
*1/*2	4.3 (4.9)	3.9 (5.4)	15.1 (23.8)	9.9 (11.4)	20.7 (20.2)
*1/*3	3.3 (3.5)	6.9 (7.2)	9.4 (8.9)	8.9 (10.6)	12.0 (13.0)
*1/*5	2.7 (2.6)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	2.0 (2.4)	0.2 (0.2)
*1/*6	1.7 (1.7)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.8)	0.0 (0.0)
*1/*8	8.7 (8.1)	1.0 (1.8)	0.0 (0.0)	1.0 (2.4)	0.0 (0.0)
*1/*11	2.0 (2.3)	0.0 (0.0)	0.9 (0.7)	1.0 (1.6)	0.0 (0.0)
Total	22.7 (23.1)	11.8 (14.5)	25.5 (33.4)	23.8 (29.3)	32.9 (33.4)
Poor metabolizer					
*2/*2	0.3 (0.1)	1.0 (0.1)	6.6 (2.3)	1.0 (0.5)	1.2 (1.7)
*2/*3	0.3 (0.1)	0.0 (0.2)	1.9 (1.7)	1.0 (0.9)	2.6 (2.1)
*2/*8	0.0 (0.3)	0.0 (0.1)	0.0 (0.0)	1.0 (0.2)	0.0 (0.0)
*3/*3	0.0 (0.0)	0.0 (0.2)	0.0 (0.3)	1.0 (0.4)	1.0 (0.7)
*3/*5	0.0 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.2)	0.0 (0.0)
*3/*8	0.0 (0.2)	1.0 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.2)	0.0 (0.0)
*3/*11	0.3 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.1)	0.0 (0.1)	0.0 (0.0)
*5/*6	0.3 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)
*8/*11	0.3 (0.1)	0.0 (0.0)	0.0 (0.0)	1.0 (0.0)	0.0 (0.0)
Total	1.7 (1.0)	2.0 (0.6)	8.5 (4.4)	6.0 (2.5)	5.0 (4.5)

I PMs sono pazienti che presentano due alleli non funzionali del gene CYP2C9 (es. *2 - *2 oppure *2 - *3), pertanto mostrano dei deficit enzimatici che si riflettono in una ridotta o assente capacità metabolica o di attivazione di numerosi farmaci e composti endogeni. I PMs tenderanno ad accumulare o ad eliminare più lentamente i substrati o i farmaci che sono maggiormente metabolizzati dal CYP2C9, avranno quindi una maggiore concentrazione di farmaco a livello ematico e generalmente, a parità di dosaggio, un maggior effetto rispetto ad individui che possiedono le forme funzionali dell'enzima. I metabolizzatori lenti sono quindi più frequentemente esposti ad effetti indesiderati (ADR) se trattati con dosi standard di questi composti e necessitano pertanto sia di aggiustamenti posologici personalizzati (riduzioni di circa il 20-60% della dose standard) sia di un monitoraggio frequente per confermare che le concentrazioni siano comprese nell'intervallo terapeutico. Gli IMs presentano un allele normale del gene CYP2C9 ed uno non funzionale (es. *1 - *2) e possono richiedere, per conseguire un'azione terapeutica ottimale, un dosaggio farmacologico inferiore alla norma. Gli EMs infine, sono individui con un normale metabolismo farmacologico. Gli EMs presentano due alleli funzionali del gene (es. *1 - *1) o un allele funzionale ed uno parzialmente attivo (es. *1 - *9) e, di solito, possono assumere i farmaci che sono substrati dell'enzima CYP2C9 ad un dosaggio standard.

Dal momento che il Warfarin presenta un ridotta finestra terapeutica e che la risposta al trattamento farmacologico è non solo altamente variabile, ma anche influenzata da molteplici fattori come l'età, la dieta, il consumo di alcolici, comorbidità e medicazioni concomitanti, diversi studi hanno valutato se le varianti del gene *CYP2C9* potessero contribuire alla variabilità inter-individuale nella risposta anticoagulante andando a influenzare la biodisponibilità del farmaco; in particolare è stato esaminato l'effetto dei polimorfismi rs1799853 e rs1057910 sulla dose efficace di farmaco e sul rischio di eventi avversi, soprattutto emorragici e trombotici, legati all'utilizzo del Warfarin. Numerose evidenze sperimentali hanno messo in luce una correlazione significativa tra le varianti alleliche CYP2C9*2 (rs1799853, c.430 C>T, Arg144Cys, R144C) e CYP2C9*3 (rs1057910, c.1075 A>C, Ile359Leu, I359L) ed un'alterata *clearance in vitro* ed *in vivo* del Warfarin il cui metabolismo viene ridotto dal 30% al 50% nel caso di CYP2C9*2 e di circa il 90% per CYP2C9*3 [6][21][22][23].

Sanderson e colleghi hanno esaminato la robustezza e la qualità di tali evidenze conducendo una revisione sistematica e una meta-analisi (HuGenetTM) dei dati pubblicati nei maggiori databases scientifici: PUBMED, EMBASE, the Human Genome Epidemiology Network Database, The Cochrane Library e the Database of Abstracted Reviews of Effects. Solo 9 studi, per un totale di 2775 pazienti, rispettavano i criteri di inclusione e sono stati pertanto presi in considerazione nell'analisi. I risultati hanno permesso di concludere che, in effetti, i portatori di almeno una variante allelica necessitano di una dose minore di Warfarin rispetto ai pazienti *wild-type*: in media 0.86 mg in meno per la variante 2C9*2 e 1.92 mg per la variante 2C9*3, pari ad una riduzione in media rispettivamente del 17% e del 35% della dose standard. Inoltre, i portatori di almeno una copia di una delle due varianti alleliche mostrano un rischio relativo maggiore di manifestare reazioni avverse (sanguinamenti ed emorragie) rispetto ai soggetti *wild-type*: 2C9*2 RR di 1.91, 2C9*3 RR di 1.77 e 2C9*2*3 RR di 2.26. La variante allelica CYP2C9*2 si associa, infatti, ad una riduzione del 30-60% della clearance del Warfarin, valore che raggiunge il 70%-90% nel caso della variante CYP2C9*3. Complessivamente la variante CYP2C9*2 contribuisce per il 2,5% alla variabilità nella dose di farmaco, mentre la variante CYP2C9*3 spiega circa il 10-12% della variabilità nella dose terapeutica di Warfarin.

La conoscenza del dato genetico è quindi utile per identificare i pazienti più sensibili al Warfarin, che potrebbero beneficiare di dosi di carico e di mantenimento minori, nonché di un monitoraggio clinico più frequente al fine di ridurre al minimo il rischio di reazioni avverse e di massimizzare l'efficacia della terapia anticoagulante. Il genotipo può anche aiutare il clinico nella scelta del farmaco anticoagulante più opportuno, indirizzando per esempio i pazienti 2C9*3*3 o 2C9*2*3 verso un farmaco alternativo come l'aspirina o inibitori diretti della trombina [20].

1.6.3.3. CYP4F2

Il gene *CYP4F2* mappa in posizione 19p13.12 e codifica per un enzima appartenente alla famiglia dei citocromi responsabile dell'ossidazione della vitamina K a livello epatico. L'enzima *CYP4F2* metabolizza la vitamina K mediante una reazione di idrossilazione, controbilanciando così l'attività dell'enzima *VKORC1* e limitando l'accumulo eccessivo di Vitamina K ridotta.

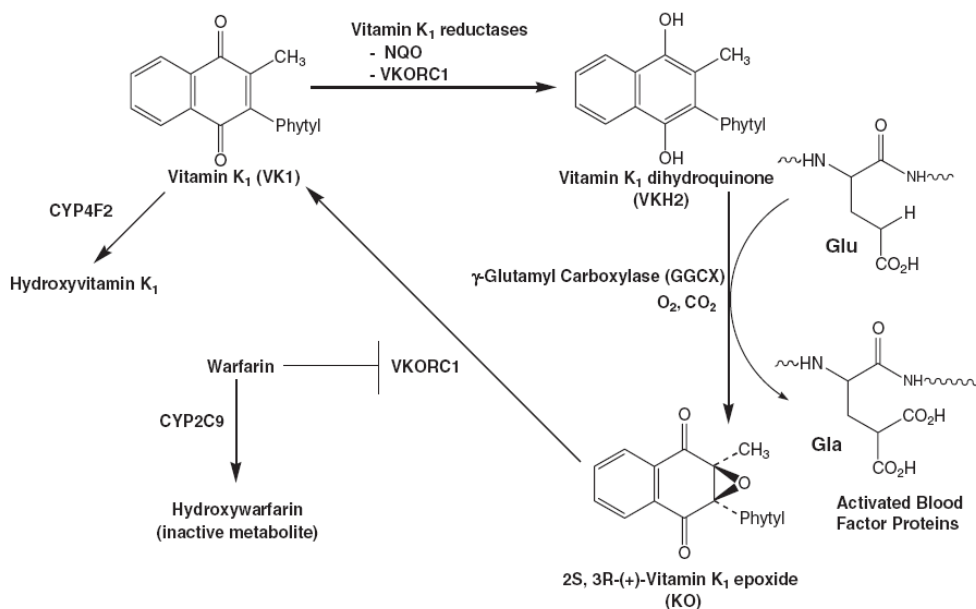


Fig. 1.7: ruolo di CYP4F2 nell'omeostasi della vitamina K. VKH₂ (Vitamina K₁ diidrochinone) è un cofattore essenziale della proteina GG CX (γ-glutamyl carboxylase), l'enzima deputato alla carbossilazione e attivazione di diversi fattori della coagulazione. Durante questo processo, VKH₂ viene ossidato nella forma epossido KO che deve andare incontro a una doppia riduzione (2e⁻) per rigenerare il cofattore attivo. VKORC1 (Vitamin K₁ Epoxido Reductase), il target molecolare del Warfarin, catalizza almeno la prima di queste reazioni di riduzione, generando la forma VK₁ da KO. VKORC1, inoltre, è molto verosimilmente coinvolto anche nella conversione di VK₁ a VKH₂ assieme ad altri enzimi come NQO (NADPH quinone oxidoreductase). CYP2C9 e CYP4F2 influenzano la dose-risposta al Warfarin controllando rispettivamente la clearance e rimuovendo VK₁ dal ciclo [24].

Numerosi studi hanno investigato la correlazione tra l'attività enzimatica di CYP4F2 e il dosaggio individuale del Warfarin, individuando un'associazione significativa tra il polimorfismo rs2108622 (c.1297 C>T, p.V433M) e la variabilità inter-individuale nella risposta terapeutica ai derivati cumarinici. Lo SNP rs2108622 influenza la capacità di metabolizzare la vitamina K in quanto

determina una riduzione delle concentrazioni epatiche dell'enzima P450 4F2 allo stato stazionario che a sua volta si associa ad un accumulo di Vitamina K ridotta. I portatori della variante allelica *CYP4F2* p.V433M pertanto sono meno sensibili al Warfarin dei soggetti *wild-type* e necessitano di un dosaggio maggiore per raggiungere l'effetto anticoagulante desiderato. I meccanismi molecolari attraverso cui lo SNP influenza il metabolismo della Vitamina K non sono stati del tutto chiariti, ma da analisi di espressione genica e Western Blot è emerso che il polimorfismo altera meccanismi post-trascrizionali o andando ad inibire la traduzione proteica o inducendo una degradazione precoce della proteina [24].

Tab. 1.12: correlazione tra i livelli di *CYP4F2* e l'attività VK₁ ossidasica sulla base del polimorfismo rs2108622. ^a valori determinati da saggi Western Blot; ^b VK₁ attività ossidasica normalizzata per il totale delle proteine microsomiali. ^c VK₁ attività ossidasica normalizzata per la quantità di *CYP4F2*.

Pool Genotype (rs2108622)	<i>CYP4F2</i> Content ^a	VK1 Met. Formation ^b	VK1 Met. Formation ^c
	<i>pmol / mg protein</i>	<i>pmol / min / mg</i>	<i>pmol / min / nmol</i>
CC	11.3	0.85 (0.13)	75 (11)
CT	7.2	0.44 (0.01)	61 (1.1)
TT	2.5	0.21 (0.02)	84 (6.7)

Una delle prime evidenze di correlazione tra varianti alleliche del gene *CYP4F2* e la risposta terapeutica al Warfarin, risale ad uno studio del 2008 di Caldwell e colleghi volto a identificare varianti genetiche addizionali, rispetto a quelle già note, che potessero influenzare il dosaggio di farmaco richiesto per raggiungere un INR terapeutico. Avvalendosi della piattaforma DMET *Targeted Human 1.0* (Affymetrix) lo studio ha preso in considerazione un totale di 517 su 1228 analizzati, noti per essere dei biomarcatori oppure allocati in geni codificanti per enzimi farmacometabolizzatori/pompe di trasporto. All'interno del *pool* di polimorfismi selezionati è emerso come statisticamente significativo lo SNP rs2108622 nel gene *CYP4F2* (P value 4.0×10^{-5}). A parità di dose i pazienti omozigoti T/T sono meno sensibili al Warfarin dei soggetti omozigoti C/C e pertanto necessitano di dosi maggiori (di circa 1mg/die) di Warfarin per raggiungere il medesimo effetto anticoagulante. L'associazione esistente tra la variante *CYP4F2* p.V433M e la dose efficace di Warfarin è stata poi confermata anche da analisi di regressione multipla condotte sulle tre corti indagate, considerando oltre allo SNP rs2108622, fattori clinici e altri fattori genetici (Tab. 1.13) [25].

Tab. 1.13: predittori di risposta terapeutica al Warfarin; i fattori clinici da soli (sesso, età, indice di massa corporea e INR) spiegano il 17% della variabilità nella dose terapeutica di farmaco necessaria a raggiungere l'effetto anticoagulante desiderato, mentre la combinazione di fattori clinici e genetici aumenta il grado di predittività e rende conto di più del 50% della variabilità inter-individuale nella dose-risposta al Warfarin.

Predictor/predictor group	Adjusted R ²
Clinical only	0.17
Clinical plus <i>CYP2C9</i> and <i>VKORC1</i>	0.54
Clinical plus <i>CYP2C9</i> and <i>VKORC1</i> and <i>CYP4F2</i>	0.56

La frequenza della variante polimorfica c.1297 C>T varia considerando gruppi etnici differenti con una MAF (*Minor Allele Frequencies*) del 30% nei caucasici ed asiatici e del 7% nella popolazione di origine africana, suggerendo in quest'ultima un contributo minore dello SNP rs2108622 sulla dose di mantenimento del Warfarin.

Tab. 1.14: frequenze alleliche per la variante CYP4F2*3 nella popolazione Africana, Asiatica, Caucasica, Ispanica e Ashkenazi Jewish[14].

Allele	African-American (n = 600)		Asian (n = 600)		Caucasian (n = 600)		Hispanic (n = 600)		Ashkenazi Jewish (n = 1000)	
	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI	Freq.	95% CI
<i>c.1297G>A</i>										
G	0.883	0.858–0.909	0.695	0.658–0.732	0.658	0.620–0.696	0.767	0.733–0.801	0.672	0.643–0.701
A (p.V433M)	0.117	0.091–0.142	0.305	0.268–0.342	0.342	0.304–0.380	0.233	0.199–0.267	0.328	0.299–0.357

Tab. 1.15: frequenze genotipiche osservate in diverse popolazioni per la variante p.V433M del gene CYP4F2. [14]

CYP4F2 genotype	Observed (expected [†]) frequency (%)				
	African-American (n = 300)	Asian (n = 300)	Caucasian (n = 300)	Hispanic (n = 300)	Ashkenazi Jewish (n = 500)
<i>c.1297G>A (p.V433M)</i>					
G/G	78.0 (78.0)	48.0 (48.3)	42.7 (43.3)	58.7 (58.8)	43.4 (45.2)
G/A	20.7 (20.6)	43.0 (42.4)	46.3 (45.0)	36.0 (35.8)	47.6 (44.1)
A/A	1.3 (1.4)	9.0 (9.3)	11.0 (11.7)	5.3 (5.4)	9.0 (10.8)

La rilevanza dell'effetto dello SNP sulla dose media giornaliera di farmaco è stata valutata anche in una meta-analisi condotta su 30 studi, su un totale di 2721 reports presi in considerazione.

Lo studio ha analizzato l'associazione tra il polimorfismo rs2108622 (c.1297 C>T) nel gene CYP4F2 e la dose di mantenimento di farmaci cumarinici, in 9,470 pazienti totali: 7,313 pazienti in cura con Warfarin, 1,838 pazienti in cura con l'acenocumarolo e 319 pazienti in cura con fenprocumone. L'età media dei pazienti era di 64.2 ± 8.31 anni mentre per quanto riguarda la composizione etnogeografica 556 individui erano di origine africana, 1889 soggetti erano di origine asiatica e 6908 pazienti erano di origine caucasica con una frequenza allelica nei tre gruppi rispettivamente di 0.15, 0.25 e 0.31. I dati raccolti hanno permesso di concludere che il polimorfismo rs2108622 è associato in modo statisticamente significativo (95% CI: 5.6-11.1% con P<0.0001) con un incremento nel dosaggio di anticoagulanti cumarinici necessario per raggiungere un INR terapeutico, assestando in un 8,3% la percentuale di aumento della dose media giornaliera nei portatori della variante CYP4F2 p.V433M (omozigoti c.1297 T/T o eterozigoti c.1297 C/T rispetto a omozigoti c.1297 C/C). Anche dopo stratificazione per le varianti alleliche CYP2C9*2, CYP2C9*3 e VKORC1 c. -1639 G>A, che è stato calcolato essere associate ad una riduzione dal 24,1% al 31,5% nel dosaggio di Warfarin nella popolazione oggetto dello studio, lo SNP rs2108622 è stato in grado di spiegare rispettivamente l' 11% delle differenze di dosaggio

osservate tra i portatori della variante CYP4F2 c.1297 T e gli individui omozigoti c.1297 C/C nei pazienti CYP2C9*1 e il 6.9% delle differenze nei soggetti VKORC1 c.-1639 G/G.

Il polimorfismo CYP4F2 p.V433M rappresenta quindi sicuramente un fattore genetico significativo nell'influenzare la dose giornaliera di mantenimento dei farmaci anticoagulanti cumarinici; inoltre, sebbene l'effetto dello SNP sulla variabilità inter-individuale dose-risposta al Warfarin sia minore rispetto a quello delle varianti alleliche CYP2C9*2, *3 e VKORC1 c. -1639 A/A, CYP4F2 si conferma il terzo locus genico in ordine di importanza come predittore di risposta terapeutica al Warfarin e ai suoi derivati, in grado di spiegare l'1%-2% della variabilità complessiva [26].

1.6.4. VALORE PROGNOSTICO DEL DATO GENETICO

Il valore prognostico dei polimorfismi rs9923231 nel gene VKORC1, rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 e rs2108622 nel gene CYP4F2 è stato confermato anche da uno studio di associazione genome-wide (GWAS) condotto da Takeuchi e colleghi nel 2009, su 1053 pazienti svedesi per determinare in modo conclusivo i polimorfismi capaci di alterare in modo sostanziale il dosaggio terapeutico del Warfarin [27].

Lo studio ha preso in considerazione 325,997 SNPs non sinonimi, la cui associazione con la dose di Warfarin è stata valutata inizialmente in un'analisi di regressione univariata. Risultati statisticamente significativi sono stati ottenuti in primis per SNPs clusterizzati in prossimità del gene VKORC1 ($p < 10^{-78}$) e in secondo luogo per polimorfismi nel gene CYP2C9 ($p < 10^{-31}$).

Al fine di potenziare il rilevamento di polimorfismi con un effetto debole ma comunque significativo sul dosaggio del Warfarin, è stata condotta un'analisi di regressione multipla includendo i fattori noti per influenzare l'*outcome* della terapia anticoagulante (VKORC1, CYP2C9, età, sesso). Un singolo polimorfismo (lo SNP rs2108622) a livello del gene CYP4F2 è risultato statisticamente significativo ($p < 8.3 \times 10^{-10}$) ed è stato confermato in una corte separata di 588 pazienti svedesi. Le associazioni più forti sono emerse per lo SNP rs9923231 nel gene VKORC1 ($P = 5.4 \times 10^{-78}$), che come riportato in altri lavori si trova in LD con altri due SNPs (rs9934438 e rs2359612) localizzati nella regione promotoriale/intronica del gene, e per lo SNP rs4917639 ($R^2 = 0.121$, $p < 3.1 \times 10^{-31}$) che si trova in perfetto *linkage disequilibrium* con gli SNPs rs1799853 e rs1057910 che definiscono le varianti alleliche CYP2C9*2 e CYP2C9*3; il risultato per rs4917639 riflette, infatti, l'effetto combinato dei polimorfismi rs1799853 (CYP2C9*2) ($R^2 = 0.038$, $p < 8.8 \times 10^{-13}$) e rs1057910 (CYP2C9*3) ($R^2 = 0.080$, $p < 4.5 \times 10^{-17}$).

I polimorfismi nei geni VKORC1 e CYP2C9 aumentano la sensibilità al Warfarin e in particolare le varianti alleliche CYP2C9*2 e CYP2C9*3 sono associate a maggiori difficoltà nel raggiungere un INR terapeutico stabile e ad un maggiore rischio di eventi di sanguinamento o emorragici. Nessuna associazione significativa è emersa per CNV (*Copy Number Variations*), aplotipi e altri SNPs noti.

Tab. 1.16: risultati dell'analisi di regressione multipla.

Predictor	WARG GWAS (1053)			Replication (588)			Combined (1641)		
	Effect on dose ^b			Effect on dose ^b			Effect on dose ^b		
	Estimate (95% CI)	R ²	P-value	Estimate (95% CI)	R ²	P-value	Estimate (95% CI)	R ²	P-value
VKORC1 rs9923231 (C->T, 0.402) ^a	-0.96 (-1.03, -0.89)	0.283	1.6E-122	-0.99 (-1.09, -0.88)	0.284	5.0E-62	-0.97 (-1.02, -0.91)	0.283	2.7E-181
CYP2C9*3 rs1057910 (Ile359Leu, 0.070) ^a	-1.13 (-1.26, -1.00)	0.075	2.6E-55	-1.08 (-1.27, -0.89)	0.089	2.3E-26	-1.11 (-1.22, -1.00)	0.080	2.6E-79
CYP2C9*2 rs1799853 (Arg144Cys, 0.109) ^a	-0.63 (-0.74, -0.52)	0.048	1.7E-28	-0.40 (-0.55, -0.24)	0.023	5.5E-07	-0.54 (-0.63, -0.45)	0.038	1.1E-31
CYP4F2 rs2108622 (Val433Met, 0.240) ^a	0.25 (0.17, 0.33)	0.016	8.3E-10	0.16 (0.05, 0.27)	0.005	5.0E-029	0.21 (0.14, 0.27)	0.011	3.3E-10
Age	-0.04 (-0.04, -0.03)	0.170	1.9E-63	-0.03 (-0.04, -0.03)	0.129	1.7E-31	-0.04 (-0.04, -0.03)	0.155	1.2E-111
Sex (male)	0.35 (0.25, 0.45)	0.017	7.6E-12	0.25 (0.10, 0.40)	0.009	0.001	0.30 (0.22, 0.38)	0.013	1.6E-12

^aIn parenthesis are major/minor allele, and minor allele frequency.

^bEffect of individual predictor on dose is indicated by regression coefficient and 95% confidence interval, proportion of explained variance (R²) and P-value.

^cAssociation in same direction as GWAS was assessed by a one-tailed test.

doi:10.1371/journal.pgen.1000433.t002

The Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium (CPIC) of the National Institutes of Health Pharmacogenomics Research Network ha sviluppato delle linee guida (*peer-reviewed gene-drug guidelines*), aggiornate periodicamente al sito <http://www.pharmgkb.org>, sulla base dei nuovi sviluppi nel campo della personalizzazione della terapia anticoagulante con Warfarin. Sulla base delle evidenze scientifiche pubblicate relativamente alla correlazione tra la dose di Warfarin e il background genico del paziente emerge una forte indicazione a effettuare il test genetico prima di iniziare la terapia anticoagulante e la raccomandazione a dosare il farmaco tenendo conto del genotipo al fine di identificare in modo accurato la dose terapeutica di farmaco. L'incorporazione delle informazioni genetiche in modelli predittivi di dosaggio ha il potenziale di accorciare il tempo necessario a raggiungere un INR stabile, aumentare il tempo in cui è mantenuto un INR terapeutico e ridurre il rischio di sovra- o sotto- dosaggio del farmaco durante le fasi iniziali della terapia e quindi di reazioni avverse. Tali vantaggi superano i possibili rischi associati all'implementazione della farmacogenetica in ambito clinico tra cui un monitoraggio inadeguato dell'INR, alterazioni sulla compliance del paziente, predizioni di dosaggio scorrette a causa di errori di genotipizzazione.

1.6.5. ALGORITMI FARMACOGENETICI

In seguito all'individuazione dei determinanti genetici della variabilità inter-individuale nel dosaggio del Warfarin, numerosi modelli predittivi di dosaggio basati su fattori clinici, demografici e genetici sono stati sviluppati e validati. Tra i più noti vi sono l'IWPC Dosing Algorithm, il Gage Dosing Algorithm, lo Sconce Dosing Algorithm, l'Algoritmo Linder, l'Algoritmo WARG, l'Algoritmo Couma-Gen e l'equazione UCHC.

L'IWPC (*International Warfarin Pharmacogenetics Consortium*) Dosing Algorithm è stato sviluppato a partire da dati disponibili nel PharmGKB data set (*Accession Number PA162355460*) ed è fruibile sotto forma di foglio di lavoro Excel reperibile al sito: www.pharmgkb.org/drug/PA451906. L'equazione dell'algoritmo è stata derivata analizzando una popolazione grande (4043 pazienti totali) ed eterogenea, sia geograficamente che etnicamente e l'algoritmo è stato validato su una corte di 1009 soggetti; la dose di farmaco si ricava come segue:

$\sqrt{\text{Dose}} \text{ (mg/week)} = 5.6044 - (0.2614 \times \text{Age in decades}) + (0.0087 \times \text{Height in cm}) + (0.0128 \times \text{Weight in Kg}) - (0.8677 \times \text{VKORC1 AG}) - 1.6974 \times \text{VKORC1 AA} - (0.4854 \times \text{VKORC1 Genotype Unknown}) - (0.5211 \times \text{CYP2C9}^*1^*2) - (0.9357 \times \text{CYP2C9}^*1^*3) - (1.0616 \times \text{CYP2C9}^*2^*2) - (1.9206 \times \text{CYP2C9}^*2^*3) - (2.3312 \times \text{CYP2C9}^*3^*3) - (0.2188 \times \text{CYP2C9 Genotype Unknown}) - (0.1092 \times \text{Asian Race}) - (0.2760 \times \text{Black or African American}) - (0.1032 \times \text{Missing or Mixed Race}) + (1.1816 \times \text{Enzyme Inducer Status}) - (0.5503 \times \text{Amiodarone Status})$. Le performance dell'algoritmo si sono dimostrate superiori a quelle sia di modelli basati solo su dati clinici sia di approcci fixed-dose, riuscendo a identificare accuratamente i pazienti più a rischio di manifestare reazioni avverse, per i quali si rendevano necessarie dosi $\leq 21 \text{ mg/week}$ (49.4% vs. 33.3%, $P < 0.001$) o $\geq 49 \text{ mg/week}$ (24.8% vs. 7.2%, $P < 0.001$) [28].

Il Gage Dosing Algorithm è stato sviluppato analizzando una corte di 1050 pazienti e prende in considerazione, come predittori indipendenti della dose terapeutica, dati clinici e genetici combinati in una equazione matematica in cui ogni parametro è pesato per un certo fattore: VKORC1 c.-1639 G>A (-28% per allele), BSA (+11% per 0.25 m^2), CYP2C9*3 (-33% per allele), CYP2C9*2 (-19% per allele), età (-7% per decade), INR target (+11% per aumenti di 0.5 unità), uso di amiodarone (-22%), fumo (+10%), etnia African American (-9%), indicazioni nell'uso del Warfarin/eventi trombotici correnti (+7%). L'equazione è stata validata su una corte di circa 300 pazienti e riesce a spiegare il 53-54% (rispettivamente nella corte di derivazione e in quella di validazione) della variabilità inter-individuale nel dosaggio del farmaco, una percentuale di molto superiore a quella ottenuta da modelli predittivi basati esclusivamente su dati clinici. Per facilitare l'uso dell'algoritmo, l'equazione è stata implementata in un software disponibile in rete al sito: <http://www.Warfarindosing.org>. Il software viene periodicamente aggiornato sulla base di nuove evidenze scientifiche riguardanti fattori significativi di predittività sulla dose-risposta al Warfarin e rappresenta ad oggi una delle migliori risorse per predire la dose iniziale e di mantenimento di Warfarin sia per la completezza dei parametri predittivi analizzati (età, etnia, peso, altezza, medicazioni concomitanti, INR baseline e target, indicazione terapeutica della TAO, fumo, VKORC1*2, CYP4F2*2, GGX rs11676382, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*5, CYP2C9*6) sia perché è stato testato e validato su più di 1000 pazienti. Il sito www.Warfarindosing.org, inoltre, mette a disposizione un ulteriore algoritmo farmacogenetico, l'IWPC Dosing Algorithm, pertanto consente di ricavare una stima della dose terapeutica anche utilizzando un altro modello predittivo [21].

Lo Sconce Dosing Algorithm è stato uno dei primi modelli predittivi a combinare insieme parametri clinici e genetici. L'equazione utilizzata per tale algoritmo è la seguente: $\sqrt{\text{Dose}} \text{ (mg/day)} = 0.628 - (0.0135 \times \text{Age in years}) - (0.24 \times \text{CYP2C9}^*2) - (0.37 \times \text{CYP2C9}^*3) - (0.241 \times \text{VKORC1}) + (0.0162 \times \text{Height in cm})$. Il dato genotipico viene inserito sotto forma di codice dal valore 0, 1 o 2 a seconda del numero di varianti alleliche del gene CYP2C9 portate dal paziente e 1, 2 o 3 per VKORC1 GG, GA, AA [10]. L'Algoritmo WARG, sviluppato da Wadelius e colleghi, è stato validato su una corte di 1496 pazienti di origine caucasica (Nord Europa, Svezia). Il modello prende in considerazione parametri clinici come l'età, il sesso e le medicazioni concomitanti e tutta una serie di parametri genetici, significativamente associati al dosaggio del farmaco (VKORC1, CYP2C9*2 e CYP2C9*3) che aumentano la capacità predittiva del modello e fanno sì che l'algoritmo spieghi ben il 59% della variabilità inter-individuale nel dosaggio del farmaco, almeno nella popolazione di derivazione. La dose settimanale predetta è il quadrato del risultato dell'equazione: $[9.46 \ 832 - (0.90112 \text{ for rs9923231 A/G}) - (2.01863 \text{ for rs9923231 A/A}) - (0.50836 \text{ for }^*1^*2) - (0.97546 \text{ for }^*1^*3) - (1.10204 \text{ for }^*2^*2) - (1.74761 \text{ for }^*2^*3) - (3.40 \ 061 \text{ for }^*3^*3) - (0.03686 \times \text{age}) - (0.27 \ 698 \text{ for females}) - (0.06 \ 992 \times \text{n}^\circ \text{ of drugs that increase INR})]^2$ [29].

Secondo il Couma-Gen Algorithm (equazione di Anderson) infine la dose settimanale viene stimata sulla base della seguente equazione: $1.64 + \exp_e [3.984 + *1*1(0) + *1*2(-0.197) + *1*3(-0.360) + *2*3(-0.947) + *2*2 (-0.265) + *3*3(-1.892) + V_k-CT(-0.304)+ V_k-TT(-0.569) + V_k-CC(0) + \text{age}(-0.009) + \text{male sex}(0.094) + \text{female sex}(0) + \text{weight in Kg}(0.003)]$, dove \exp_e è la base esponenziale e ; *1, *2, *3 si riferiscono a CYP2C9 wild-type (*1) o alle varianti genotipiche *2 e *3); V_k si riferisce al polimorfismo c. 173 + 1000 C>T che è in forte *linkage disequilibrium* con la variante allelica VKORC1 c. -1639 G>A [30].

Nel 2010 Roper e colleghi svilupparono un modello predittivo alternativo chiamato UCHC Equation, in base al quale la dose settimanale (espressa in mg) viene ottenuta moltiplicando per delle costanti, le variabili fisse età, altezza e varianti alleliche in base alla formula: $46.20 - 8.93 (\text{Numbers of Variants}) - 0.461 (\text{Age}) + 0.173 (\text{Height, cm})$ [31]. In uno studio comparativo del 2010 gli stessi autori, inoltre, hanno confrontato le performance di quattro algoritmi pubblicati (Sconce, Anderson, IWPC e Gage) valutandone la capacità di predire la dose di mantenimento di un pool di 1095 pazienti in cura con Warfarin. L'accuratezza dei modelli è stata valutata calcolando la differenza assoluta tra la dose stimata dal modello e la dose di mantenimento dei pazienti e determinando quindi la percentuale di errore e il coefficiente di correlazione R^2 . L'accuratezza clinica dei modelli è stata valutata misurando la proporzione di pazienti per i quali la dose predetta era del 20% al di sopra o al di sotto della dose attuale (under and over dosed patient) o all'interno un *range* di variabilità del 20% rispetto alla dose attuale (ideally dosed). Due sets di pazienti sono stati presi in considerazione: l'UCHC dataset (n=121, popolazione bianca e prevalentemente maschile) e l'IWPC validation dataset (n=974) disponibile al sito <http://www.pharmgkb.org>. Nella corte UCHC tutti i modelli si sono dimostrati ugualmente predittivi spiegando una proporzione di variabilità superiore o uguale al 60% (R^2 compreso tra 60 e 65); tale valore si è ridotto al 36%-46% considerando il dataset IWPC più ampio e diversificato dal punto di vista etnico (Tab. 1.17). Le performances dei singoli algoritmi sono state valutate anche dopo aver stratificato i pazienti sulla base della dose di mantenimento settimanale. In generale tutti i modelli tendono a sovrastimare la dose nel caso di individui che richiedono 21mg/week o meno di farmaco e a sottostimare la dose nel caso di dosi di mantenimento maggiori o uguali a 49mg/week; tutti gli algoritmi, invece, hanno mostrato buone performances predittive per dosi di mantenimento comprese tra 21mg/week e 49mg/week.

Tab. 1.17: dati di comparazione dei principali algoritmi farmacogenetici.

Model	Absolute error		Absolute % error		R^2	Intercept	Slope
	Mean \pm SD	Median	Mean \pm SD	Median			
Comparison of model prediction in the UCHC dataset (n = 121)							
Sconce ⁵	9.45 \pm 8.83	7.93	28.0 \pm 18.2	26.9	60.0	2.20	1.20
Gage	7.28 \pm 7.22	5.4	23.6 \pm 23.3	17.1	64.4	-1.69	1.14
IWPC ²³	7.13 \pm 7.48	4.5	22.2 \pm 20.0	16.7	64.8	-2.33	1.17
Anderson ¹⁰	7.43 \pm 7.64	5.59	23.7 \pm 22.0	18.6	64.9	-6.54	1.32
UCHC (derivation set*)	7.26 \pm 7.00	5.31	25.2 \pm 25.3	18.2	64.0	-4.14	1.16
Comparison of model prediction in the IWPC validation dataset (n = 974)							
Sconce ⁵	9.50 \pm 8.99	6.91	34.5 \pm 38.6	26.5	37.7	5.13	0.97
Gage ²⁰	8.37 \pm 7.92	6.47	34.5 \pm 43.9	22.5	45.8	2.23	0.93
IWPC ²³	8.39 \pm 8.13	6.41	33.6 \pm 42.7	22.2	44.5	1.66	0.98
Anderson ¹⁰	8.81 \pm 8.11	6.74	37.8 \pm 49.8	23.6	41.4	-1.72	1.05
UCHC	9.74 \pm 8.43	7.91	44.0 \pm 58.5	26.0	36.8	1.12	0.88

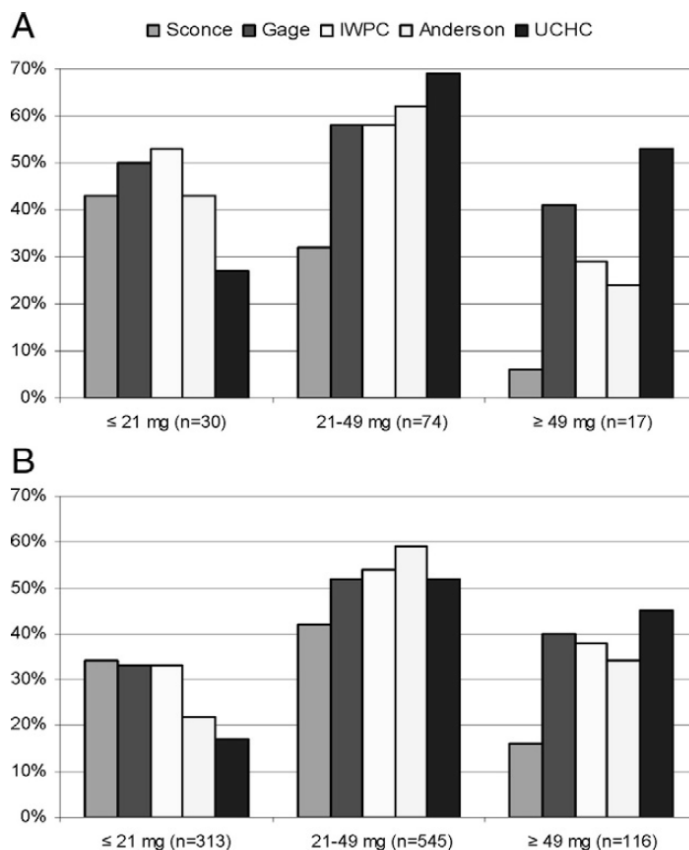


Fig. 1.8: confronto dei modelli predittivi di dosaggio sulla base della percentuale di pazienti (asse Y) per i quali la dose predetta di farmaco non ha superato del 20% la dose di mantenimento attuale.

I pazienti sono stati stratificati sulla base della dose di mantenimento in tre gruppi: *the low-dose group*, *the intermediate-dose group* e *the high-dose group*.

L'algoritmo UCHC mostra performance simili a quelle degli algoritmi Gage, IWPC e Anderson nell'*intermediate-dose group*, è migliore degli altri modelli per l'*high-dose group*, mentre è poco predittivo per il *low-dose group*. Al contrario l'algoritmo Sconce mostra delle performance migliori per il *low-dose group* e delle performance non comparabili agli altri modelli per i gruppi rimanenti. Gli algoritmi con le performance migliori e comparabili in tutti e tre i gruppi sono i modelli IWPC e Gage.

A: UCHC dataset; B: IWPC dataset.

Dalle analisi condotte è emerso che per i pazienti la cui dose stabile di farmaco è ≤ 21 mg/week, l'algoritmo Sconce e i modelli IWPC e Gage hanno fornito le migliori predizioni di dosaggio rispetto agli algoritmi Anderson e UCHC. Quest'ultimo è particolarmente efficace nel predire il corretto dosaggio di farmaco in pazienti che necessitano di dosi pari o maggiori a 49mg/week e che sono quindi ad alto rischio di reazioni avverse in quanto un sottodosaggio è associato ad un'elevata probabilità di eventi trombotici. Tutti gli algoritmi sono in grado di predire correttamente la dose di farmaco per l'*intermediate-dose group* che comprende in genere il 60% dei pazienti, sebbene sia noto che, per tale gruppo di pazienti, l'aggiunta della componente genetica non aumenti significativamente la capacità predittiva di approcci fixed-dose o di modelli basati esclusivamente su dati clinici e demografici. Analizzando la capacità predittiva dei modelli combinando assieme i due datasets, l'algoritmo IWPG si è dimostrato superiore (R^2 pari a 45,9) agli altri seguito dall'algoritmo Anderson (44,9%) e dal modello Gage (44,2%). Il modello sviluppato da Sconce tende a sottostimare la dose soprattutto nei pazienti che richiedono dosi elevate di farmaco, mentre il modello UCHC tende a sovrastimare la dose soprattutto nei pazienti ad alto rischio di sanguinamento.

Lo studio ha evidenziato l'importanza di validare gli algoritmi in un campione sufficientemente ampio e informativo prima dell'implementazione dei modelli farmacogenetici nella pratica clinica e ha dimostrato come l'etnia contribuisca a determinare l'accuratezza dei modelli predittivi basati su dati genetici oltre che clinici. La scelta dell'algoritmo farmacogenetico da utilizzarsi in ambito clinico dovrebbe quindi tenere conto della popolazione usata per derivare/validare il modello e della popolazione locale su cui l'algoritmo viene utilizzato.

Il valore degli algoritmi farmacogenetici è stato dimostrato anche da Finkelman e colleghi che hanno condotto uno studio su 1378 pazienti in cura con dosi stabili di Warfarin, per comparare l'accuratezza di modelli clinici, tabelle genetiche e algoritmi farmacogenetici [32]. Sono stati confrontati un totale di 5 modelli: un metodo basato sulla dose empirica di 5 mg/die (35 mg/week), un algoritmo clinico basato su età, BSA, etnia, uso di amiodarone, INR target, fumo e indicazione nell'uso del Warfarin ([21]) due tabelle genetiche (*FDA Warfarin Label Table* e *Genotype Mean Table*) ed un algoritmo farmacogenetico (www.warfarindosing.org).

Per quanto riguarda l'*FDA Warfarin Table* è stato ipotizzato di assegnare ai pazienti una dose pari alla media delle dosi riportate nel range di dosaggio, mentre in relazione alla *Genotype Mean Table* è stato ipotizzato di assegnare ai pazienti una dose media sulla base del genotipo dei geni VKORC1 e CYP2C9, determinata a partire da una corte di pazienti scelti nella popolazione considerata dall'IWPC per validare l'algoritmo IWPC (tot:2858 pazienti).

Tab. 1.18: Genotype Mean Table.

VKORC1-1639	CYP2C9 *1*1	CYP2C9 *1*2	CYP2C9 *1*3	CYP2C9 *2*2	CYP2C9 *2*3	CYP2C9*3*3
GG	6	5	4	4	4	3
GA	5	4	3	3	2	1
AA	3	3	2	2	1	2

Dai dati raccolti è stato visto che la predizione del dosaggio terapeutico di farmaco basata su dati genetici garantisce una maggiore accuratezza rispetto a metodi puramente empirici o clinici. Utilizzando la tabella fornita nel foglietto illustrativo del farmaco o la tabella derivata nella popolazione IWPC, la dose di mantenimento corretta di Warfarin può essere predetta rispettivamente il 43% e il 44% delle volte rispetto alle percentuali del 39%-37% ottenute usando rispettivamente un algoritmo clinico o un approccio fixed-dose.

L'algoritmo farmacogenetico si dimostra superiore a tutti gli altri modelli, consentendo di predire accuratamente la dose in più del 50% delle volte (52%); l'algoritmo farmacogenetico, inoltre, mostra dei tassi di sotto- o sovradosaggio inferiori a tutti gli altri modelli considerati e consente di predire accuratamente la dose non solo nel gruppo di pazienti che richiede delle dosi medie di farmaco, ma anche nei pazienti, ad alto rischio di reazioni avverse, che richiedono dosi o molto basse o molto alte di farmaco.

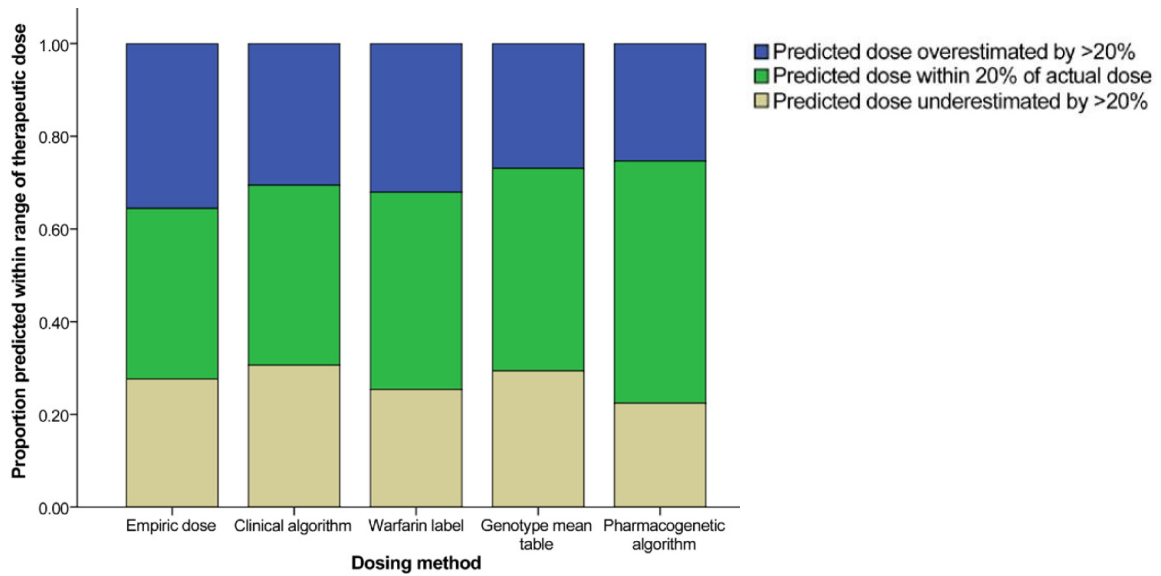


Fig. 1.9: accuratezza dei modelli predittivi di dosaggio; per ciascun metodo viene riportata la percentuale delle dosi di farmaco predette in modo corretto, sottostimate e sovrastimate rispetto alla dose di mantenimento terapeutica.

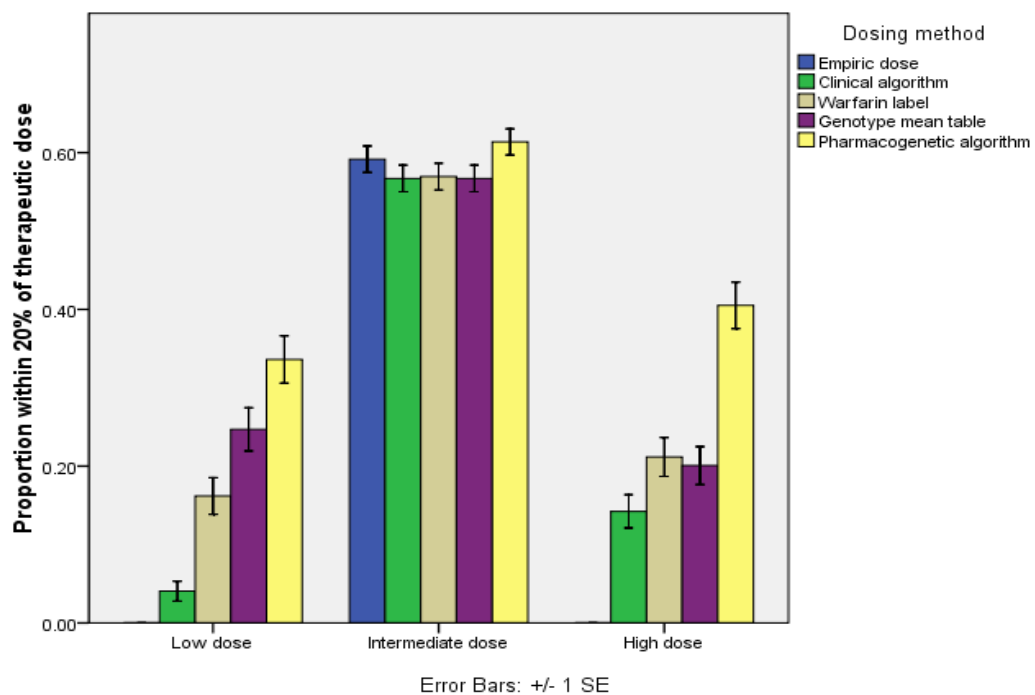


Fig. 1.10: valutazione dell'accuratezza dei metodi di dosaggio del Warfarin dopo stratificazione dei pazienti, sulla base della loro dose stabile di mantenimento, nel gruppo *low dose* (≤ 21 mg/week), *intermediate dose* (> 21 e ≤ 49 mg/week) e *high dose* (> 49 mg/week).

La capacità predittiva dei modelli farmacogenetici potrebbe aumentare prendendo in considerazione altri fattori clinici e genetici che potrebbero in qualche modo avere un impatto sul metabolismo o sull'efficacia del farmaco, come per esempio polimorfismi nei geni CYP4F2 (codifica per l'enzima Leukotriene-B(4) omega-hydroxylase 1, coinvolto nel turnover della vitamina K), GGCX (gamma-glutamyl carboxylase, codifica per un enzima coinvolto nella carbossilazione Vit. K dipendente dei fattori della coagulazione), ApoE (Apolipoprotein E, codifica per una proteina coinvolta nel trasporto dei lipidi nel plasma e alcune varianti potrebbero essere responsabili di un alterato trasporto della vitamina K al fegato) ed EPHX1 (microsomal Epoxide hydrolase 1, codifica per una subunità della Vitamina K epossido reduttasi e mostra un sito di legame per la vitamina K-epossido), sebbene l'entità della loro influenza sul dosaggio del farmaco necessita di essere confermata da studi prospettici su popolazioni ampie e multi-etniche.

A tal proposito un gruppo di ricercatori italiani ha sviluppato un algoritmo farmacogenetico con l'obiettivo di identificare a priori la dose di mantenimento individuale del farmaco sulla base di dati genetici, demografici e clinici [33]. Il modello è uno dei pochi algoritmi che prende in considerazione oltre alle varianti CYP2C9*2, CYP2C9*3 e VKORC1 c.-1639 G>A anche la variante polimorfica CYP4F2*3 che spiega invece circa il 3,3% ± 2.6% della variabilità nella dose efficace di Warfarin. Il modello è stato sviluppato a partire da una coorte di 371 pazienti italiani di origine caucasica in cura stabile con Warfarin di età media di 73 anni (29-93) e prende in considerazione come parametri l'età, la BSA, i geni VKORC1, CYP2C9 e CYP4F2 combinati nella seguente equazione: $V_{dose} \text{ (mg/week)} = (7.39764 - [0.02734 \times \text{age}] + [1.06287 \times \text{BSA (m}^2)]) - [1.04468 \times \text{VKORC1 -1639 AG}] - [2.12117 \times \text{VKORC1 -1639 AA}] - [0.78983 \times \text{CYP2C9*1*2}] - [1.17138 \times \text{CYP2C9*1*3}] - [1.181292 \times \text{CYP2C9*2*2 or *2*3 or *3*3}] - [0.46723 \times \text{CYP4F2*1*3}] - [0.71528 \times \text{CYP4F2*1*1}]$. L'algoritmo si è dimostrato in grado di assegnare correttamente la dose di farmaco nel 51,8% dei pazienti rispetto alla percentuale del 31,2% ottenuta con un modello clinico basato su età, BSA (m²) e ALT (U/l) (McNemar test: p<0.0001). Suddividendo i pazienti sulla base della dose di mantenimento in tre gruppi ($\leq 25\text{mg/week}$, >25 e $<45\text{mg/week}$, $\geq 45\text{mg/week}$) il modello farmacogenetico ha predetto correttamente la dose ($\pm 20\%$ della dose terapeutica di mantenimento attuale) per gruppo di rischio, rispettivamente nel 36,24%, 66,20% e 55,42% dei casi contro percentuali del 16,78%, 56,38% e 9,60% ottenute con il modello clinico dimostrandosi superiore a quest'ultimo soprattutto nel caso dei pazienti in terapia con regimi a basso ed alto dosaggio. Il coefficiente di correlazione per i due modelli è stato pari a 65.4% e 13.4%.

Le performance del modello farmacogenetico italiano sono state confrontate con quelle di altri tre algoritmi sviluppati su popolazioni multi-etniche (IWPC algorithm), americane statunitensi (Couma-Gen algorithm) e del Nord Europa (WARG algorithm) applicando tali modelli sul medesimo set di pazienti usato per validare l'algoritmo italiano. Le analisi condotte hanno messo in luce delle performance simili (MAE, *mean absolute errors* minori) per l'algoritmo italiano e il WARG algorithm, imputabili probabilmente a somiglianze nelle popolazioni usate per derivare il modello. Per tutti i modelli l'entità delle differenze tra la dose di mantenimento osservata e quella predetta è risultata dipendente dalla dose di mantenimento: per regimi a basso o alto dosaggio le differenze tra la dose predetta e quella osservata sono maggiori e i modelli tendono rispettivamente a sovra- e sotto-stimare la dose reale, tuttavia il livello di accuratezza dei modelli è elevato e tutti gli algoritmi spiegano un'elevata percentuale di variabilità nel dosaggio del farmaco ($R^2 = 65.4\%$ per l'algoritmo italiano, 60.5% per il WARG, 63.1% per l'IWPC e 61.4% per il Couma-Gen). Anche in questo studio viene confermato il fatto che ogni algoritmo non è universale ma garantisce performance migliori sulla popolazione/i da cui è stato derivato.

1.6.6. TEST FARMACOGENETICI

Attualmente il *gold standard* per l'identificazione delle varianti alleliche dei geni VKORC1 e CYP2C9 informative per il dosaggio del Warfarin è il sequenziamento bidirezionale (pag 8 ACCE), tuttavia in commercio sono disponibili diversi kit diagnostici basati su altre tecnologie, meno costose e più rapide. Nel settembre 2007 l'FDA ha approvato la prima notifica per un test farmacogenetico sviluppato da Nanosphere Inc., "*Verigene® Warfarin Metabolism Nucleic Acid Test*" (Verigene® System) per identificare le varianti alleliche dei geni VKORC1 1173C>T e CYP2C9*2 - *3. Altri tre test diagnostici sono stati approvati dalla FDA nel 2008: "*AutoGenomics, Inc., Infiniti® Warfarin Assay*" (sistema Biofilm Chip Microarray), "*Paragon DX, Rapid Genotyping Assay—CYP2C9 & VKORC1*" (sistema RT-PCR) e "*Osmetech Molecular Diagnostics, eSensor® Warfarin Sensitivity Test and eSensor XT-8 System*" (sistema microarray incluso di estrazione del DNA, purificazione e ibridazione su chip) e uno nel 2009: "*TrimGen Corp., eQ-PCR™ LC Warfarin Genotyping Kit*" (tecnologia Real-Time); tali test indagano gli alleli CYP2C9*2-*3 e VKORC1 c. -1639 G>A, tuttavia esistono delle versioni estese es. "*expanded Infiniti® CYP450 2C9-VKORC1 Multiplex Assay*" che include CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6, *11, VKORC1 -1639G>A, e sei varianti VKORC1 addizionali oppure "*eSensor® Warfarin Plus Test*" che include CYP2C9*2, *3, *5, *6, *11, *14, *15, *16, VKORC1 -1639G>A e CYP4F2 V433M.

Nel mercato sono anche disponibili altri test diagnostici che però non sono stati approvati dalla FDA: "*xTAG™ CYP2C9+VKORC1 Kit, Luminex Molecular Diagnostics*" che interroga le varianti alleliche CYP2C9*2, *3, *4, *5, *6, VKORC1 -1639G>A e sei mutazioni aggiuntive che determinano resistenza al Warfarin (VKORC1 V29L, V45A, R58G, V66M, R98W, L128R) e "*the Simple Probe Warfarin assay*" Idaho Technology Inc. che indaga le varianti alleliche CYP2C9*2, *3 e VKORC1 -1639G>A. E' possibile, inoltre, ottenere la genotipizzazione per le varianti alleliche CYP2C9 e VKORC1 anche da alcuni laboratori riconosciuti (ARUP Laboratories, Genelex o LabCorp) che utilizzano come metodologie di indagine la PCR-RFLP o il sequenziamento. Per una lista completa dei test commerciali disponibili si rimanda al sito:

(http://www.pharmgkb.org/resources/forScientificUsers/pharmacogenomic_tests.jsp).

1.6.6.1. RAPPORTO COSTO/BENEFICIO DELLA GENOTIPIZZAZIONE

Non sono ancora disponibili dei dati chiari sul rapporto costo-beneficio della strategia di genotipizzazione rispetto allo standard. Infatti la FDA non ha formalmente raccomandato l'introduzione del test genetico né ha approvato o validato alcun algoritmo predittivo e i trials clinici (**COAG**, *Clarification of Optimal Anticoagulation through Genetics*, NCT00839657; **EU-PACT**, *The European Pharmacogenetics of Anti-Coagulant Therapy*, NCT01119300; **GIFT** *The Genetic Informatics Trial of Warfarin Therapy to Prevent DVT*, NCT01006733; *Pharmacogenetic dosing of warfarin: a controlled randomized trial*; *Warfarin Adverse Events Reduction for Adults Receiving Genetic Testing at Therapy Initiation*, NCT01305148) volti a valutare l'efficacia e l'utilità della personalizzazione della terapia su base clinica e genetica non sono ancora stati terminati. Mancano ancora poi delle linee guida per valutare le performance dei programmi di intervento o relative ai piani di monitoraggio a lungo termine ed, inoltre, il test genetico impone delle implicazioni etiche, legali e sociali che devono essere esaminate al fine di garantire un trattamento equamente distribuito nel territorio, non discriminatorio e confidenziale. Ad oggi

sono disponibili solo delle stime indicative che valutano il rapporto costo-beneficio della terapia anticoagulante *genetic-guided* considerando la percentuale di reazioni avverse evitate e il costo del test farmacogenetico.

Effetti collaterali della terapia anticoagulante come sanguinamenti o emorragie si verificano in circa il 5% dei pazienti trattati con Warfarin (Coumadin®), anche in presenza di un intensivo monitoraggio dell'INR. Il rischio di sanguinamenti aumenta nel periodo iniziale della terapia per valori di INR pari o maggiori a 4.0 e diminuisce al raggiungimento di un INR terapeutico stabile. Analizzando le differenze genetiche alla base della variabilità inter-individuale nella risposta al Warfarin è stato visto che gli individui *wild-type* per il citocromo P450-2C9 raggiungono lo stato stazionario in 3-5 giorni, mentre i portatori delle varianti alleliche CYP2C9*2 e CYP2C9*3 impiegano dai 6-8 giorni ai 12-15 giorni per raggiungere un INR terapeutico stabile a seconda della peculiare combinazione allelica. La sensibilità clinica per CYP2C9 di identificare gravi eventi emorragici è del 46% (95% CI 32%-60%), mentre la specificità clinica è del 69% (95% CI 62%-75%). Per quanto riguarda l'influenza delle varianti alleliche del gene CYP2C9 e VKORC1 sulla dose di mantenimento del Warfarin, è riportato che gli individui *1*2, *1*3, *2*2, *2*3 e *3*3 necessitano di una riduzione di dose rispettivamente del 22%, 36%, 43%, 53% e 76% rispetto ai pazienti CYP2C9*1*1 e che, rispetto ai portatori dell'aplotipo VKORC1 BB, la dose di farmaco debba essere ridotta del 28% e 50% nei pazienti con aplotipo VKORC1 AB e AA. Complessivamente si stima che l'aggiustamento posologico del farmaco su base genetica consenta di ridurre il rischio di eventi avversi in una percentuale di casi che va dal 20% all'80%. Il costo dei test farmacogenetici è variabile ma rientra in media in un *range* compreso tra \$300 e \$500 (\$60 per TrimGen, \$622 per LabCorp, \$1500 per AutoGenomics). Considerando quindi gli aspetti di validità e utilità clinica del test farmacogenetico e il prezzo del test, il costo complessivo da fronteggiare per singolo evento evitato si aggira tra i \$14,500 e i \$95,900 a seconda della sensibilità clinica del test. Siccome ogni anno si contano circa 300.000 nuovi pazienti (USA), il costo per estrarre, genotipizzare e mantenere il DNA è di \$350 per paziente (\$105 milioni) e il test consente di ridurre di circa il 50% il numero di eventi di sanguinamento, si stima che introducendo il test farmacogenetico nella pratica clinica si possano evitare circa 3,465 eventi emorragici, con un risparmio di \$47 milioni. A questo punto risulta ovvio che se il test farmacogenetico avesse un costo inferiore ai \$100 allora il rapporto costo-beneficio sarebbe a favore dell'introduzione del test nella pratica clinica di routine [7][34][35].

1.7. IL VIRUS DELL'EPATITE C

1.7.1. STORIA E TASSONOMIA

La scoperta del virus dell'epatite C è relativamente recente e risale a circa 30 anni fa. Nel 1975 circa il 65% delle epatiti "post-trasfusionali" non veniva riferito né al virus dell'epatite A (HAV) né a quello dell'epatite B (HBV) e Feinstone nominò tali epatiti "non-A, non B" o NANBH. In seguito a studi condotti su scimpanzé divenne chiaro che le NANBH erano causate da un agente infettivo il cui genoma fu caratterizzato nel 1989 grazie all'avvento delle strategie di clonaggio per gli acidi nucleici [36][37][38].

Da un punto di vista tassonomico il virus dell'epatite C (HCV) è un membro del genere *Hepacivirus*, appartenente alla famiglia *Flaviviridae*. Analisi comparative tra sequenze nucleotidiche di HCV (sia dell'intero genoma che di regioni subgenomiche come E1/core e NS5B) derivate da individui appartenenti a classi di rischio differenti e provenienti da regioni geografiche diverse, hanno rivelato la presenza di sei maggiori genotipi (1-6) e di un gran numero di sottotipi (più di 70 totali) all'interno di ciascun genotipo [39][40][41].

I genotipi presentano sequenze che differiscono in media per il 30-35%, mentre all'interno di ciascun genotipo, l'omologia di sequenza tra i diversi sottotipi è di circa il 75-80%. La maggiore variabilità si riscontra nelle regioni che codificano le proteine E1 ed E2, dal momento che le sequenze codificanti la proteina core e alcune delle proteine non strutturali come NS3 sono altamente conservate; la regione 5' UTR, in particolare, presenta il minor grado di variabilità di sequenza poiché sequenze specifiche e strutture secondarie dell'RNA sono richieste per la replicazione e la trascrizione [40]

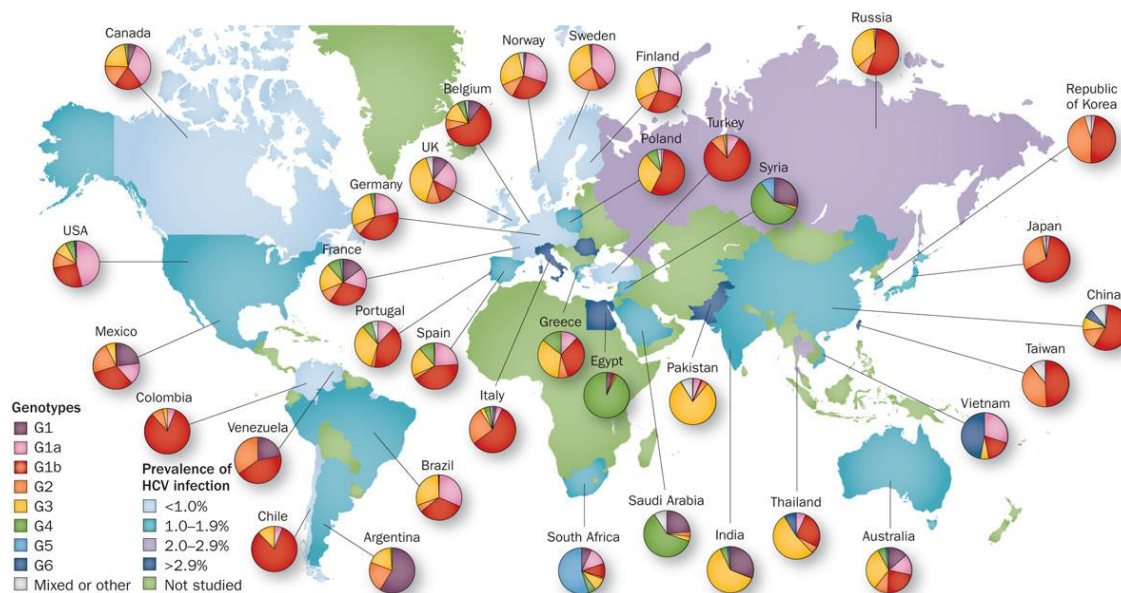


Fig. 1.11: stima della prevalenza dell'infezione da HCV nel mondo e distribuzione geografica globale dei genotipi di HCV. I dati potrebbero rappresentare una sottostima del reale quadro epidemiologico dell'epatite C in quanto l'infezione decorre spesso in modo asintomatico anche per molti anni [42].

I genotipi 1, 2 e 3 mostrano una distribuzione globale piuttosto eterogenea con una prevalenza relativa che varia considerando aree geografiche differenti. I sottotipi 1a e 1b sono i più comuni tipi virali negli USA e si riscontrano con una frequenza elevata anche in Europa. Il genotipo 2 è relativamente comune in Nord America, Europa, Giappone (soprattutto i sottotipi 2a e 2b) e il sottotipo 2c è comunemente riscontrato nel Nord Italia. I genotipi 3 e 6 sono predominanti nel Sud-Est Asiatico sebbene il sottotipo 3a stia diventando un'emergenza comune in Europa e USA dove è riscontrato soprattutto nei tossicodipendenti. Il genotipo 4 è prevalente nel Nord Africa e nell'Asia Centrale, mentre il genotipo 5 si riscontra principalmente in Sud Africa [43].

Oltre ad aspetti prettamente epidemiologici, la determinazione del genotipo è importante per riuscire a predire la risposta alla terapia. I dati finora raccolti da diversi studi prospettici hanno evidenziato, infatti, che il genotipo non influenza né la progressione né la severità della patologia bensì può predire l'*outcome* terapeutico; i genotipi 2 e 3 sono generalmente più facili da trattare rispetto ai genotipi 1 e 4 che risultano più resistenti all'attuale regime terapeutico basato sulla combinazione di Peg-IFN alfa e Ribavirina. Questo si riflette nel tasso di SVR (*Sustained Virological Response*, assenza di RNA virale nel siero dopo 24 settimane dalla fine del trattamento) che raggiunge il 50% nei pazienti con infezione da HCV genotipo 1 - 4 e l'80% nei pazienti con infezione da HCV genotipo 2 - 3 [44]. Con l'avvento dei farmaci di nuova generazione DAAs (*Directly Acting Antiviral Agents*), rilevante ai fini terapeutici è anche la distinzione dei diversi sottotipi: è noto, infatti, che il sottotipo 1a acquisisce molto più velocemente del sottotipo 1b una resistenza nei confronti degli inibitori della proteasi NS3 come boceprevir e telaprevir.

1.7.2. STRUTTURA VIRALE

Le possibilità di analizzare la struttura dei virioni di HCV sono state molto limitate a causa della difficoltà di coltivare il virus in sistemi cellulari e dall'associazione delle particelle virali, derivate dal siero, con le LDL (*Low-density Lipoprotein*) [45]. Studi su cellule Huh7 usando sistemi ricombinanti hanno permesso di ricreare *in vitro* particelle virali replicanti e quindi di studiarne sia la struttura che i meccanismi di replicazione. Il virus HCV è costituito da un virione rotondeggiante di 50-55nm di diametro formato da un pericapside lipidico (envelope) al quale sono associate esternamente le proteine virus-specifiche E1 ed E2; il bilayer lipidico circonda il nucleocapside virale, una struttura sferica di 30-35nm composta dalla proteina core o HCV core protein, all'interno del quale è conservato il genoma virale [46].

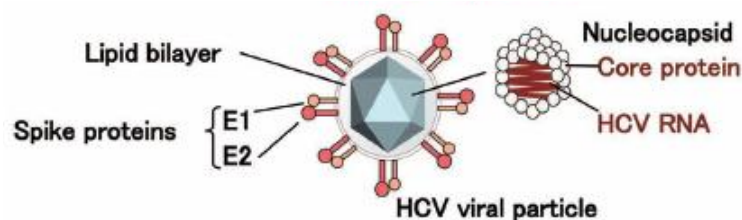


Fig. 1.12: struttura di una particella virale.

HCV è un virus a RNA il cui genoma è costituito da una molecola di RNA *single stranded* (ssRNA) di approssimativamente 9,6 kb a polarità positiva che funge da RNA messaggero per la traduzione delle proteine virali. L'RNA virale contiene una singola ORF (*Open Reading Frame*) che codifica per una proteina precursore policistronica di circa 3000 aminoacidi che viene processata co/post-traduzionalmente da proteasi sia virali che cellulari in tre proteine strutturali (core, E1 ed E2), sette proteine non strutturali (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5, NS5B) e una proteina aggiuntiva ARF (*Alternate Reading Frame*) derivata da frameshifting ribosomiale entro la regione del core durante la trascrizione [47].

I geni codificanti per le proteine strutturali sono localizzati al 5' dell'ORF e sono seguiti downstream dai geni codificanti per le proteine non-strutturali; le prime sono componenti essenziali della struttura del virione, le seconde invece sono coinvolte nella replicazione dell'RNA. La ORF è fiancheggiata da regioni 5' e 3' non codificanti (NTR o UTR o NCR, *non- un- traslated regions, non coding regions*), altamente conservate, che regolano la replicazione virale. La 5'NTR (341 nucleotidi) si organizza in una complessa struttura secondaria di 4 domini (I-IV) che regolano la replicazione (I e II) e la trascrizione virale (II-IV) attraverso la formazione del sito IRES (*Internal Ribosome Entry Side*) di riconoscimento e legame del ribosoma, da cui inizia la trascrizione cap-indipendente [48]. La 3'NTR consta di tre regioni funzionali: una regione variabile di 40 nucleotidi, un tratto poly U/UC di lunghezza variabile da 30 a 80nt e una coda X altamente conservata di 98 nucleotidi al 3' terminale; quest'ultima consiste di tre stem-loops (SL-1-3) e delezioni o mutazioni all'interno dei loop determinano l'incapacità di replicare per il virus. Entrambe le regioni NTR cooperano assieme favorendo interazioni RNA-RNA che risultano in una circolarizzazione del genoma e che oltre a dirigere la replicazione, ne potenziano la traduzione [49].

Durante la traduzione, la poliproteina è trasferita al reticolo endoplasmatico (ER). Le proteine N-terminali C, E1, E2 e p7 sono processate da una peptidasi del segnale cellulare (SP, *cellular signal peptidase*); per la formazione della proteina core matura è però necessaria l'azione di una seconda peptidasi (SSP, *Signal Peptide Peptidase*) che rimuove la sequenza segnale per la traslocazione di E1 all'ER al C-terminale della proteina core. Le proteine non strutturali da NS2 a NS5B sono processate da due proteasi codificate dal virus (NS2/NS3 e NS3/NS4A). NS2 e la porzione N-terminale di NS3 costituiscono una cistein proteasi zinco-dipendente responsabile del taglio in cis alla giunzione tra NS2 e NS3; la serin proteasi NS3 e il suo cofattore NS4A catalizzano invece il taglio proteolitico delle proteine a valle contenute nel precursore proteico [50].

La proteina core è responsabile della formazione del nucleocapside ed è deputata anche alla regolazione del cell-signaling e di fasi come l'assemblaggio e la traduzione dell'RNA. [52][53].

Le proteine E1 ed E2 sono due glicoproteine transmembrana che fanno parte dell'envelope virale; a livello strutturale si può riconoscere un grande ectodominio idrofilico che viene N-glicosilato a livello del lume del reticolo endoplasmatico e un dominio transmembrana (TMD) responsabile dell'interazione di E1 ed E2 a formare eterodimeri coinvolti nell'interazione virus-recettore (CD81 e rLDL), passaggio chiave per la successiva internalizzazione del virus all'interno della cellula. Analisi comparative tra le sequenze codificanti per le proteine E1 ed E2 in diversi isolati di HCV hanno rivelato un limitato grado di conservazione; E1 in particolare mostra un dominio di circa 40aa moderatamente variabile, mentre nella regione codificante per E2 sono state identificate due regioni ipervariabili (HVR1 e HVR2) che si riflettono in una variabilità di sequenza aminoacidica maggiore all'80%. La presenza di domini non conservati e delle regioni HVRs riflette l'esposizione di tali domini agli anticorpi specifici anti-HCV e offre una possibile spiegazione del meccanismo di evasione del virus dal sistema immunitario. E1 ed E2 sono quindi responsabili della

gran parte della variabilità genetica osservata tra genotipi e sottotipi virali e dell'alterazione delle proprietà antigeniche e biologiche del virus che mutando rendono difficile il riconoscimento da parte degli anticorpi anti-HCV [54]. La proteina p7 forma un canale ionico nel RE che si ipotizza sia funzionale alla formazione dei virioni.

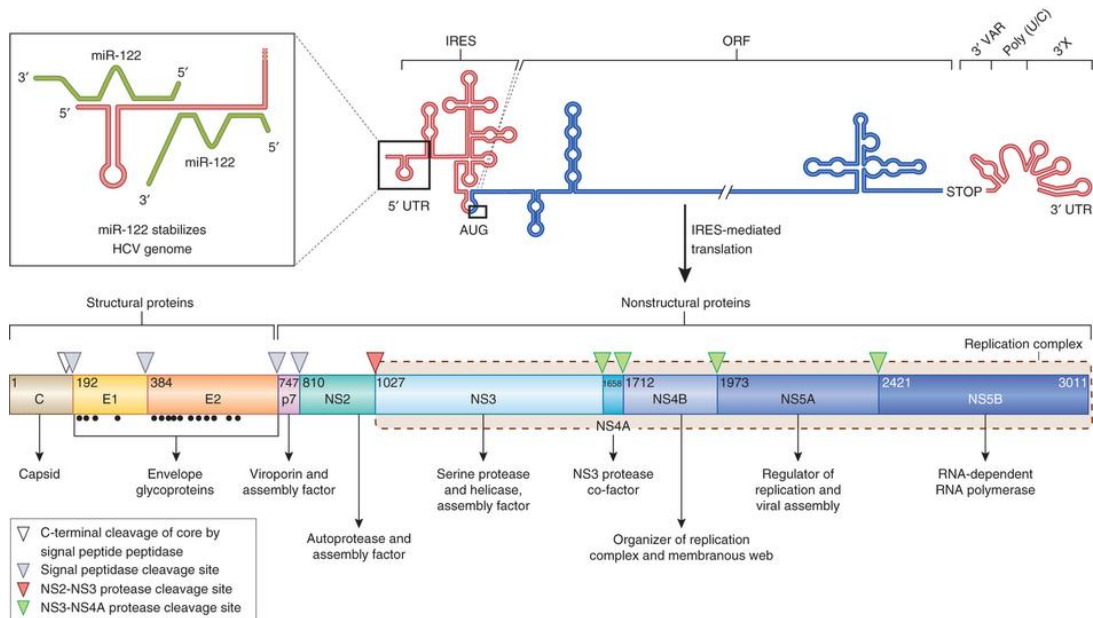


Fig. 1.13: genoma di HCV e processamento della poliproteina [51].

NS2 è una autoproteasi (cistein proteasi) le cui attività funzionali dipendono dal dominio proteasico al C-terminale, che sembra giocare un ruolo essenziale nelle fasi iniziali di assemblaggio del virione e nella morfogenesi, probabilmente attraverso l'interazione con le glicoproteine E1-E2 e il complesso NS3/NS4A. NS2 inoltre interagisce con molte proteine cellulari come CIDE-B alterando il ciclo cellulare e inibendo l'apoptosi.

NS3 è una proteina multifunzione: l'attività ATPasica/elicasica della porzione C-terminale permette di svolgere strutture secondarie dell'RNA, mentre l'attività serin proteasica del dominio N-terminale è coinvolta nella processazione della poliproteina virale.

NS4B è una proteina integrale di membrana con un importante ruolo nella formazione di reticoli membranosi (*ER-derived membranous web*) che formano una piattaforma su cui assemblare il complesso di replicazione. NS4B presenta anche un motivo di legame ai nucleotidi che lega e idrolizza GTP: non è escluso che NS4B possa legare l'RNA virale o strutture polinucleotidiche.

NS5A è una proteina multifunzionale con un ruolo cruciale nella regolazione della replicazione dell'RNA virale, nell'assemblaggio e rilascio del virus, nella regolazione delle interazioni proteiche tra proteine virali e tra proteine dell'ospite e molecole virali, nella modulazione dei *signaling pathways* cellulari e nella regolazione della risposta mediata dall'IFN I. NS5A, infatti, rappresenta un sensore dell'IFN grazie alla presenza della regione ISDR (*Interferon Sensitivity-Determining Region*) e si pensa giochi un ruolo nella resistenza *in vivo* all'IFN-alfa.

NS5B è la polimerasi virale. Un dominio idrofobico la localizza a livello della membrana del RE, mentre il sito attivo si rivolge al citosol. Come altre polimerasi RNA-dipendenti, NS5B è un enzima *error-prone* e privo di meccanismi *proof-reading* (attività 5'-3' esonucleasica) di correzione; ciò

comporta l'incorporazione nell'RNA nascente di ribonucleotidi errati a un tasso di circa 10^{-3} /nucleotide/generazione che sommato alla rapida cinetica di replicazione virale, è responsabile dell'evoluzione rapida del virus sia intra-paziente che inter-paziente. La proteina ARF, prodotta per frameshift -2/+1, si localizza nel RE e si sa sia espressa in vivo durante l'infezione.

L'eterogeneità genetica di HCV e la sua elevata capacità di adattamento alla pressione selettiva esercitata dal sistema immunitario dell'ospite sono coinvolte nella frequente cronicizzazione dell'infezione, nell'evasione da parte del virus dalla risposta immunitaria, nella limitata efficacia della terapia e nella difficoltà di preparare un vaccino [55].

1.7.3. CICLO REPLICATIVO VIRALE

La replicazione del virus HCV è un processo multistep molto complesso che coinvolge diversi attori sia virali che cellulari. L'entrata del virus negli epatociti è dipendente dal legame delle proteine E1-E2 con il recettore tetraspannina CD81. Dopo l'iniziale binding tra le glicoproteine dell'envelope e il glicosamminoglicano eparan solfato presente sulla superficie cellulare, segue l'interazione di E2 con il recettore SR-BI (*Scavenger Receptor B type I*), prerequisito per la concomitante o successiva interazione del virus con CD81. Siccome SR-BI agisce da recettore per le LDL/HDL, l'infezione degli epatociti può essere mediata anche dal legame diretto tra SR-BI e i complessi HCV-LDL [54].

Il dato poi che molti tipi cellulari non siano suscettibili all'infezione pur esprimendo CD81 e SR-BI ha suggerito il coinvolgimento di altri fattori cellulari nell'infezione virale e nel trasferimento *cell-to-cell* del virus; tra questi in ordine di importanza le proteine CLDN1 (*claudin-1*) e OCLN (*occludin*) presenti nelle tight junctions degli epatociti e altamente espresse nel fegato, i membri della famiglia delle claudine CLDN6 e CLDN9 e infine, come cofattori, i recettori RTKs e NPC1L1 [56].

Il legame al recettore induce la formazione di una vescicola endocitica rivestita di clatrina che si fonde con l'endosoma; il pH acido dell'endosoma scatena la fusione dell'envelope con la membrana endosomiale e provoca il successivo rilascio dell'RNA virale nel citoplasma della cellula. L'IRES virale lega la subunità 40S del ribosoma complessata ai fattori di inizio della traduzione eIF2 e eIF3, al GTP e al tRNA iniziatore, formando il complesso di preinizio 48S che si associa alla subunità 60S dando vita al complesso di traduzione attivo. Una volta formato il complesso di replicazione, l'RNA viene replicato dalla RdRp. La replicazione procede con la formazione di un intermedio a doppio filamento che viene separato da NS3 formando una molecola di RNA antisenso che funge da template per la sintesi di nuove molecole di *plus-strand* RNA. Una volta che tutti i componenti della particella virale sono stati sintetizzati, questi vengono assemblati a formare particelle virali complete a livello del RE; un ruolo chiave nel processo di assemblaggio è svolto dai *lipid droplets* (LD) a cui sono associate molte delle proteine virali come per esempio la proteina core, NS5A e perfino il complesso di replicazione [57] [58][59].

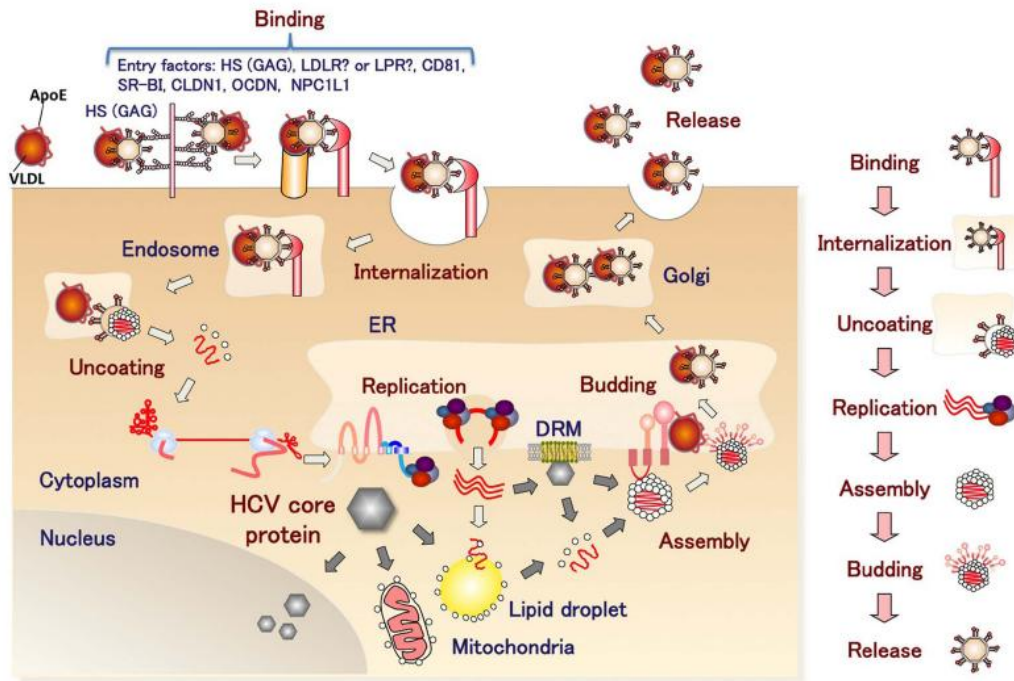


Fig. 1.14: il ciclo replicativo di HCV può essere riassunto nei seguenti punti: 1, entrata nella cellula ospite dopo legame a recettori specifici cellulari; 2, esplosione dell'envelope; 3, traduzione dell'RNA e processamento della poliproteina virale; 4 formazione del complesso replicativo e replicazione del genoma virale; 5, assemblaggio delle particelle virali; 6, rilascio in circolo dei virioni [57].

1.8. INFEZIONE DA VIRUS DELL'EPATITE C

1.8.1. EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) ha un impatto globale significativo. In accordo alle stime del WHO (*World Health Organization*) sono 130-170 milioni i portatori del virus HCV nel mondo, pari a circa il 2-2,5% della popolazione mondiale, di cui 5 milioni in Europa.

La prevalenza dell'infezione da HCV viene stimata per regione dal momento che per molte nazioni mancano dati epidemiologici aggiornati; le percentuali variano da <1.0% nel Nord Europa (con una prevalenza dello 0.1% nel Regno Unito e in Scandinavia) a >2,9% nell'Africa settentrionale, con una prevalenza del 15-20% in Egitto [60]

La principale via di trasmissione del virus è la via parenterale; infatti, la maggior parte di pazienti con epatite C cronica in Europa e USA hanno contratto l'infezione attraverso le trasfusioni di sangue o l'uso di farmaci/droghe somministrati per endovena [61]. L'esposizione al virus e la trasmissione del virus sono possibili anche attraverso le punture accidentali con aghi o strumenti taglienti contaminati dal virus, l'uso di materiale sanitario contaminato, le pratiche religiose che implicano scarificazione, le procedure di body piercing e/o tattooing e in misura minore l'attività sessuale non protetta con partner infetti [62]. Il rischio di trasmissione perinatale è basso, inferiore al 5% e non ci sono evidenze che l'allattamento al seno sia un fattore di rischio nei neonati [63]. I fattori di rischio menzionati sono variamente rappresentati da Paese a Paese: in

Australia ed America, l'uso di sostanze stupefacenti per via endovenosa sembra essere stato il fattore predominante per l'infezione, mentre in Italia, Spagna, Cina, Giappone ed Egitto ha contribuito maggiormente l'uso di strumenti e procedure di diagnosi e cura non sicure [64].

Negli ultimi 10-15 anni l'incidenza dell'infezione da HCV si è progressivamente ridotta nei paesi occidentali soprattutto nella popolazione di età compresa tra 15 e 24 anni. I fattori che hanno contribuito ad abbassare il numero di nuove infezioni sono stati l'introduzione dello screening obbligatorio per Ac anti-HCV in tutti i donatori di sangue dai primi anni 1990, l'utilizzo di test molecolari per la ricerca dell'HCV-RNA, l'impiego di dispositivi medici monouso, l'adozione di pratiche più sicure nelle procedure a rischio di contaminazione ematica e infine le campagne educative e di sensibilizzazione sulle modalità di trasmissione dei virus HIV e HCV [65].

Attualmente il rischio di contrarre l'infezione in seguito a trasfusioni di sangue è stimato essere tra 1 : 500.000 e 1 : 1.000.000 unità trasfuse e, in Europa, i nuovi casi di infezione derivano per lo più dall'uso di sostanze illecite per endovena, con un incidenza di infezione che varia dal 15% al 30% annuo [64][66].

1.8.2. STORIA NATURALE

Le manifestazioni cliniche dell'infezione da HCV costituiscono un quadro eterogeneo che varia considerando le forme acute rispetto a quelle croniche. L'epatite acuta è spesso asintomatica e nel 20% dei casi si risolve spontaneamente. Nell'80% dei pazienti invece l'infezione progredisce verso una forma cronica, le cui manifestazioni spaziano da condizioni asintomatiche, non progressive e pressochè stabili a forme progressive caratterizzate da fibrosi epatica che nel lungo periodo può evolvere in cirrosi ed epatocarcinoma [62]. Il decorso della patologia è generalmente lento e progressivo: circa il 20-30% dei pazienti cronicamente infetti sviluppano cirrosi in un arco temporale di 20-30 anni. La prognosi può variare fortemente in ciascun paziente in modo dipendente da numerosi fattori che includono: genotipo virale, sesso, età, trattamento antivirale (presenza/assenza e tipologia), uso di alcol, comorbidità, coinfezioni e background genetico dell'individuo. Questi fattori influenzano anche la durata dell'infezione che può durare dai 10 ai 30 anni dall'inizio dell'infezione agli stadi finali della patologia. La progressione della patologia è generalmente più rapida in pazienti con età compresa tra i 40 e i 55 anni, di sesso maschile, che fanno uso di alcol o stupefacenti come marijuana o steroidi, con coinfezioni (HIV o HBV); la progressione dell'infezione sembra invece essere rallentata e i cambiamenti nell'istologia epatica meno severi in pazienti Americani di origine africana [67][68].

1.8.2.1. Epatite C Acuta

Il periodo di incubazione varia molto a seconda dell'individuo e dell'importanza dell'inoculo ma in media è di 8 settimane. I sintomi dell'epatite C acuta sono generalmente aspecifici e comprendono malessere, nausea e dolore al quadrante superiore destro del fegato; l'itterizia è presente in meno del 25% dei pazienti mentre un aumento delle aminotransferasi da 10 a 30 volte oltre il limite normale (800 U/l) è comune e insorge dalle 6 alle 12 settimane successive all'esposizione. Le manifestazioni cliniche durano in genere dalle 2 alle 12 settimane e la loro risoluzione si accompagna nel 40% dei casi alla normalizzazione dei livelli delle ALT e nel 20% dei

casi alla guarigione intesa come eradicazione spontanea del virus (HCV-RNA non rilevabile nel siero). La sieroconversione è rilevabile intorno alla ottava settimana dopo l'esposizione anche se in alcuni pazienti compare anche dopo parecchi mesi (Fig. 1.15) [69].

1.8.2.1. Epatite C Cronica

L'epatite cronica è definita dalla persistenza dell'HCV-RNA a livello sierico per più di sei mesi. La probabilità di cronicizzazione dipende sia da fattori virali che da fattori legati all'ospite: una risposta Th1 HCV-specifica, titoli anticorpali elevati specifici per le proteine strutturali di HCV, varianti alleliche del gene *IL28B*, sono associati alla clearance spontanea del virus. Il rate di cronicizzazione varia anche in funzione dell'età, del sesso e dell'etnia: individui giovani e/o di sesso femminile e/o caucasici-ispatici presentano un minore rischio che l'infezione cronicizzi. Circa il 25% dei pazienti con epatite C cronica presenta dei livelli di ALT superiori alla norma di 2-5 volte e nel 30-40% dei casi compaiono manifestazioni extraepatiche come disordini autoimmuni, glomerulonefriti, dermatiti e diabete mellito. Nella maggior parte dei pazienti, tuttavia, l'infezione cronica si accompagna a sintomi eterogenei ed aspecifici come fatica, debolezza, mialgia e nausea almeno fino a quando la funzionalità epatica non viene compromessa dall'instaurarsi di uno stato infiammatorio persistente che porta a sconvolgere l'architettura parenchimale del fegato. L'evoluzione della malattia epatica verso gli stadi terminali avviene mediante un processo fisiopatologico che determina l'accumulo di tessuto fibroso come risposta al danno tissutale ripetuto. La quantità di matrice extracellulare fibrillare (ECM) viene utilizzata nella pratica clinica per misurare la gravità della progressione attraverso il sistema di punteggio METAVIR. Un punteggio 0-2 indica una fibrosi lieve non associata ad anomalie funzionali, mentre i punteggi 3 o 4 descrivono situazioni più gravi in cui il parenchima epatico presenta numerosi setti fibrotici, le funzioni epatocitarie sono seriamente danneggiate e il flusso sanguigno è alterato (cirrosi).

La cirrosi rappresenta il quadro terminale della degenerazione epatica a cui si associano pressochè la quasi totalità delle complicazioni dell'epatite C. Le più comuni manifestazioni cliniche associate alla cirrosi sono inizialmente la perdita di peso e di appetito e successivamente l'epatomegalia e/o la splenomegalia, elevate concentrazioni di bilirubina sierica e l'iperalbuminemia, sebbene molti pazienti cirrotici non manifestino alcun sintomo fintanto che la patologia non evolve in cirrosi scompensata. Lo scompenso epatico, il cui rischio è del 5% annuo nei pazienti cirrotici, può manifestarsi in diverse forme che includono per esempio l'ascite, l'encefalopatia epatica, la trombosi portale e la piastrinopenia, causa di petecchie, facili sanguinamenti e alterazioni della coagulazione. I pazienti con cirrosi possono sviluppare anche l'epatocarcinoma il cui rischio è stimato attorno al 3% annuo. La cirrosi scompensata e l'epatocarcinoma rappresentano le principali cause di trapianto di fegato, in assenza del quale le prospettive di vita a lungo termine sono drasticamente ridotte (le prospettive di vita a 5 anni sono ridotte del 50%) [70][71].

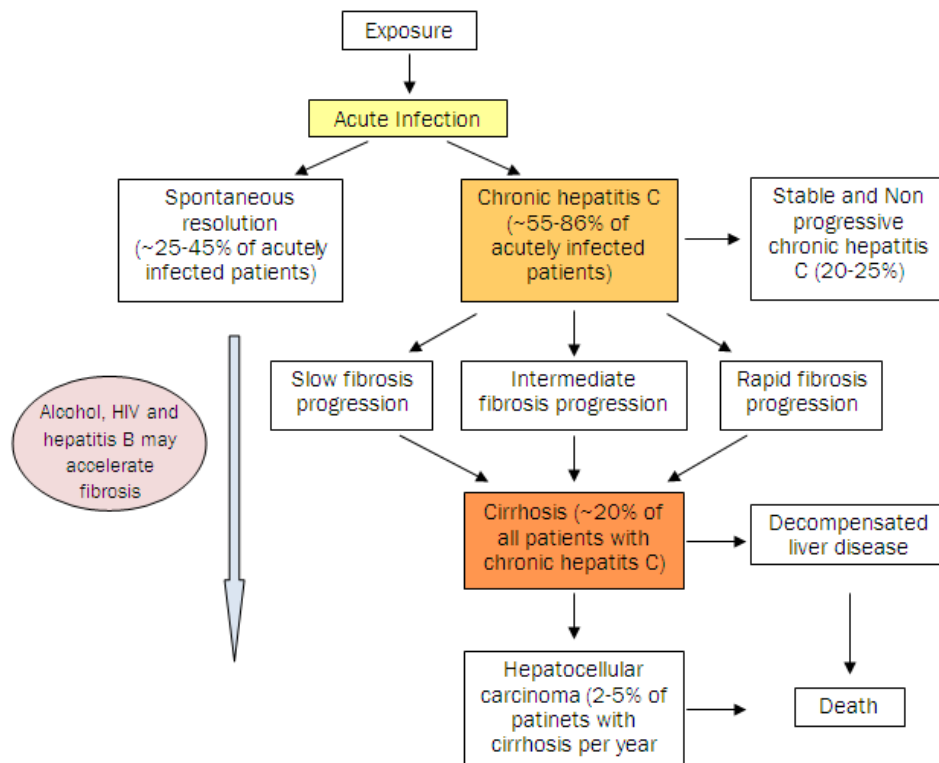


Fig. 1.15: storia naturale dell'infezione da HCV [68].

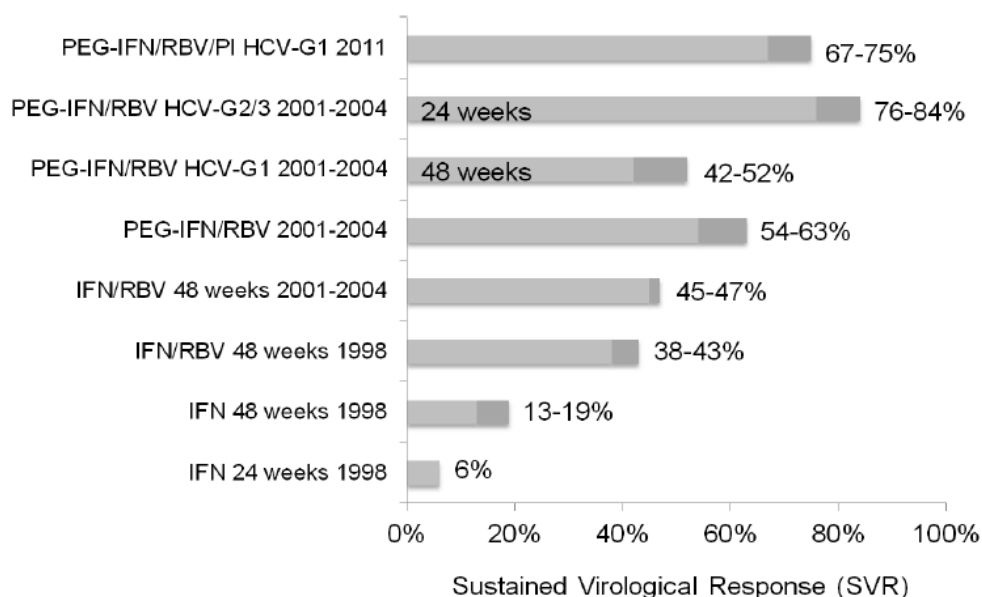
1.9. TERAPIA DELL'INFEZIONE DA HCV

Nella malattia cronica da HCV l'obiettivo della terapia è l'eradicazione dell'infezione con lo scopo di evitare la progressione dell'epatite cronica in cirrosi, prevenire le complicanze della cirrosi epatica e migliorare la qualità della vita. Nel corso degli anni la terapia dell'epatite C ha subito una notevole evoluzione: la prima molecola utilizzata è stata l'Interferone alfa in monoterapia, ben presto sostituito da combinazioni più efficaci di Interferone alfa e Ribavirina e più recentemente dai nuovi tipi di Interferone alfa pegilati in combinazione con Ribavirina. L'efficacia di tale associazione è stata provata da molti trials clinici che hanno dimostrato la notevole superiorità di Peg-IFN e Ribavirina rispetto a IFN standard e Ribavirina e a IFN in monoterapia, nell'indurre una risposta virologica sostenuta in caso di epatite cronica e cirrosi compensata da HCV. La terapia di combinazione, inoltre, si è dimostrata superiore alla monoterapia in tutti i diversi sottogruppi virologici e clinici dell'epatite C, indipendentemente dal tipo di IFN impiegato, dai dosaggi, dalla frequenza di somministrazione e dalla durata del trattamento. La combinazione PEG-IFN (PEG- α 2b o PEG- α 2a) e Ribavirina è stata perciò indicata dalle linee guide come standard di terapia per l'epatite C o SOC (*Standard Of Care*) [72]. La duplice terapia, tuttavia, è efficace nell'80% dei casi di infezione da HCV di genotipo 2-3 e in meno del 50% dei casi di infezione da HCV di genotipo 1. Per tale ragione negli ultimi decenni sono stati sviluppati agenti antivirali di nuova generazione da utilizzare in pazienti intolleranti alla terapia standard (SOC, *Standard of Care*) oppure da usarsi in combinazione con Peg-IFN e Ribavirina per aumentare l'efficacia della SOC, ridurre la durata e la tossicità e facilitare la *compliance* del paziente [73].

Tab. 1.19: farmaci approvati per il trattamento dell'epatite C cronica.

Medication	Dosing
Type I interferons	Subcutaneous injection
Pegylated interferon α -2a (Pegasys®)	180 μ g once weekly
Pegylated interferon α -2b (PEG-Intron®)	1.5 μ g/kg once weekly
Interferon α -2a (Roferon®)	3 - 4.5 Mill IU three times weekly
Interferon α -2b (Intron A®)	3 Mill IU three times weekly
Consensus Interferon (Infergen®)	9 μ g three times weekly
Ribavirin	Oral tablets or capsules
Ribavirin (Copegus®)	800 - 1200 mg daily (200 mg or 400 mg tablets)
Ribavirin (Rebetol®)	600 - 1400 mg daily (200 mg capsules or solution)
HCV protease inhibitors	Oral tablets or capsules
Boceprevir (Victrelis®)	800 mg (4 x 200 mg capsules) every 7-9 hours
Telaprevir (Incivek®, Incivo®)	750 mg (2 x 375 mg tablets) every 7-9 hours* *3 x 375 mg every 12 hours is as effective in treatment-naïve patients (Buti 2012)

Tab. 1.20: confronto dei tassi di SVR ottenuti con diversi regimi terapeutici dal 1998 al 2011. Il tasso di SVR è aumentato dal 5% con IFN in monoterapia a più del 70% con la triplice terapia PEG-IFN + RBV + PI (Protease Inhibitor, Boceprevir o Telaprevir) per pazienti trattamento naive.



I nuovi farmaci presentano un meccanismo d'azione totalmente differente da quello dell'IFN e della Ribavirina e il loro sviluppo si deve sia alla maggiore comprensione del meccanismo fisiopatologico di HCV sia a studi di *modelling* e cristallografia delle principali proteine virali. (Fig. 1.16).

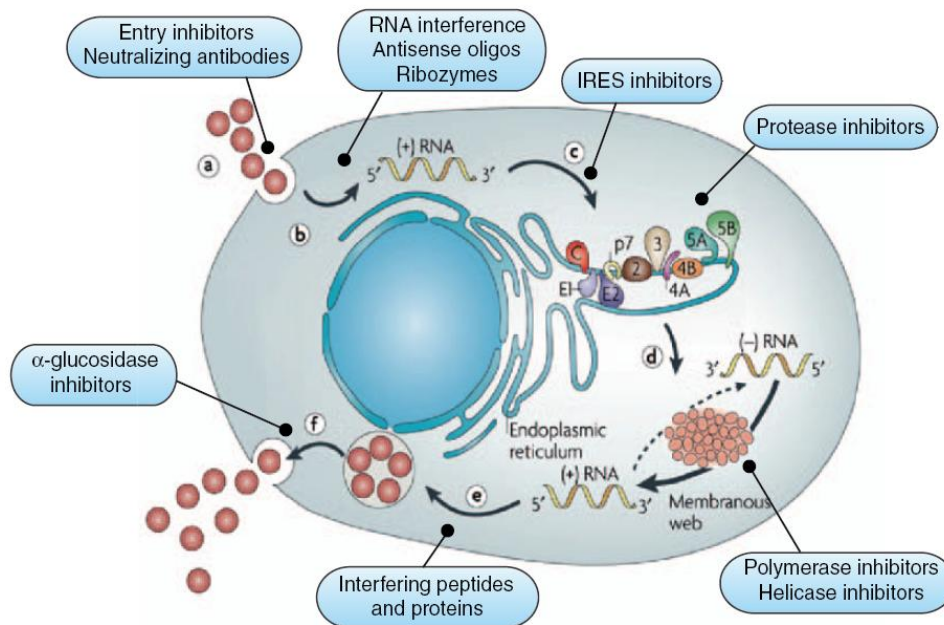


Fig. 1.16: ciclo vitale del virus HCV e possibili *target* molecolari della terapia antivirale. a) Il legame al recettore nella membrana cellulare e l'entrata nella cellula possono essere bloccati da inibitori di fusione del virus con la membrana cellulare o da anticorpi neutralizzanti diretti contro i fattori di binding virali che concentrano le particelle virali sulle superficie cellulare. b) il rilascio dell'RNA virale a seguito dell'uncoating attiva il *pathway* dell'IFN endogeno. c) L'IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) direziona l'RNA virale al reticolo endoplasmatico; pertanto IRES-eIF3-binding blocker, siRNA, ribozymi (heptazymi) o oligo antisense rappresentano metodi potenziali per inibire l'espressione delle proteine virali. d) la traduzione e il processamento della poliproteina virale può essere impedito agendo sulla proteasi virale NS3-4A. e) il processo di replicazione virale può essere ostacolato o inibendo le proteasi virali o impedendo il legame dell'RNA e della polimerasi virale al complesso di replicazione (inibitori della ciclofillina) o bloccando direttamente la polimerasi virale (inibitori delle proteine NS5A e NS5B) oppure prevenendo l'azione dell'elicasi virale NS3, la cui azione è essenziale per la formazione di RNA *single strand* + a partire da intermedi a RNA *double strand* +/- f) L'assemblaggio dei virioni e la fuoriuscita del virus dalla cellula può essere arrestato ostacolando la glicosilazione e quindi il *foldig* delle proteine dell'envelope (UT-231B, celgosivir) o inibendo la proteina NS5A [74].

1.9.1. INTERFERONE

Per la terapia dell'infezione cronica da HCV sono stati approvati e sono disponibili diversi tipi di Interferone alfa (Interferone alfa 2a/2b, IFN alfa 2a/2b) ricombinanti, utilizzabili in combinazione con Ribavirina. Uno dei limiti degli Interferoni ricombinanti è la breve emivita dopo somministrazione parenterale che si traduce in una caduta dei livelli di IFN intracellulare e quindi in una riduzione sostanziale dell'efficacia della terapia; la necessità di mantenere costantemente elevata l'attività antiretrovirale a livello cellulare, per meglio contrastare la rapida cinetica della replicazione virale, ha portato a sviluppare nuove formulazioni di IFN alfa, a più lunga emivita. Queste formulazioni si basano sulla coniugazione dell'IFN con polietilenglicole (PEG) mediante legame covalente, ottenendo composti che presentano più lento assorbimento ma soprattutto minor degradazione enzimatica e rallentata clearance.

Sono stati sino ad oggi sviluppati due diversi tipi di PEG-IFN, che differiscono per il sottotipo di IFN utilizzato, ma soprattutto per caratteristiche di pegilazione: il PEG-IFN alfa-2b è IFN alfa-2b legato ad una molecola lineare di PEG di 12kD, mentre il PEG-IFN alfa-2a è alfa-2a legato ad una molecola ramificata di Peg di 40kD. Da un punto di vista molecolare l'IFN alfa ricombinante agisce in modo analogo all'Interferone endogeno promuovendo la risposta antivirale cellulare.

1.9.1.1. PEG-IFN alfa-2a e PEG-IFN alfa-2b

Il PEG-IFN alfa-2a è disponibile in commercio con il nome di Pegasys, mentre il PEG-IFN alfa-2b si trova in commercio con il nome di PegIntron.

FARMACOCINETICA

L'assorbimento del Peg-Interferone è sostenuto, con un picco di concentrazione sierica a 72 e 96 ore dopo l'iniezione. La biodisponibilità del Peg-Interferone è alta e simile a quella osservata con l'Interferone alfa, mentre l'emivita plasmatica è maggiore (60-80 ore Vs. 3-4 ore) rispetto a quella dell'Interferone alfa. L'elevata emivita è controbilanciata però da una minore attività biologica degli isomeri pegilati, seppur qualitativamente simile, rispetto a quella dell'Interferone alfa libero. Il metabolismo è a carico principalmente del rene (30%) e la clearance sistemica del Peg-Interferone è 100 volte più bassa rispetto all'Interferone. L'attività del Peg-Interferone alfa-2a non interferisce sull'attività metabolica degli isoenzimi del citocromo P450 3A4, 2C9, 2C19 e 2D6 bensì inibisce l'attività del citocromo P450 1A2. La somministrazione ripetuta di Peg-Interferone alfa-2b invece, si accompagna a un aumento dell'attività degli enzimi del sistema del citocromo CYP2D6 e CYP2C8/9.

FARMACODINAMICA

L'Interferone alfa ricombinante inibisce la replicazione virale in vivo e in vitro mediante l'alterazione del metabolismo della cellula ospite.

L'efficacia e la sicurezza cliniche di Peg-Interferone sono state valutate in pazienti naïve all'Interferone, con epatite C cronica. Per quanto riguarda il PEG-IFN alfa-2a, rilevanti sono risultati lo studio NV15495 che ha specificamente reclutato pazienti con diagnosi istologica di cirrosi (circa l'80%) o transizione a cirrosi (circa il 20%) e lo studio clinico NR15961 in cui sono stati inclusi soltanto pazienti con co-infezione da HIV/HCV.

Per quanto riguarda il PEG-IFN alfa-2b sono stati condotti due studi clinici fondamentali: lo studio C/I97-010 che ha valutato Peg-Interferone in monoterapia in 916 pazienti, trattati per un anno con un periodo di follow-up di sei mesi e lo studio C/I98-580 che ha valutato l'associazione di Peg-Interferone con Ribavirina in 1.530 pazienti sottoposti a tre regimi di trattamento [P 1,5/R (Peg-Interferone 1,5 microgrammi/kg/settimana) + Ribavirina (800 mg/die), P 0,5/R (Peg-Interferone 1,5 microgrammi/kg/settimana per un mese seguito da 0,5 microgrammi/kg/settimana per 11 mesi) + Ribavirina (1.000/1.200 mg/die), I/R (Interferone alfa-2b (3 MUI tre volte a settimana) + Ribavirina (1.000/1.200 mg/die)per 48 settimane con sei mesi di follow-up].

Nel primo caso, la risposta al trattamento (*rate* di SVR) è risultata maggiore nei gruppi trattati con Peg-Interferone alfa-2a rispetto a Interferone alfa-2a (SVR 28-39% Vs. 11-19%) e nei gruppi

trattati con regime Peg-Interferone alfa-2a + Ribavirina rispetto al regime Interferone alfa-2a + Ribavirina (54% Vs. 45%, $p = 0.003$).

Nel secondo caso, gli studi hanno permesso di dimostrare la superiorità di Peg-Interferone rispetto a Interferone alfa-2b da solo e la maggiore efficacia dell'associazione Peg-Interferone (1,5 microgrammi/kg/settimana) e Ribavirina rispetto all'associazione Interferone alfa-2b e Ribavirina (SVR 54% Vs. 23%, $p = 0.014$). Un fattore di mancata efficacia del farmaco è la presenza di fattori neutralizzanti l'Interferone come anticorpi anti-IFN che possono insorgere in seguito al trattamento, si è visto, con una incidenza dell'1% (in pazienti trattati alla dose di Peg-Interferone di 0,5 microgrammi/kg).

In pazienti adulti con CHC, precedentemente non responsivi alla terapia con Peg-Interferone alfa-2b, l'efficacia del ritrattamento con PEG-IFN alfa-2a è stata valutata nello studio MV17150; le analisi condotte hanno chiaramente identificato la durata del trattamento di 72 settimane come il principale elemento, determinante il conseguimento di una risposta virologica sostenuta.

Per quanto riguarda il PEG-IFN alfa 2b, dati di efficacia della duplice terapia sono stati resi disponibili dal completamento di uno studio non comparativo e di due studi clinici (C95-144 e I95-145) condotti su pazienti già trattati, *relapser o non responder*; complessivamente sono stati analizzati 2.293 pazienti, con fibrosi da moderata a grave, già precedentemente trattati con Interferone alfa (pegilato e non) + Ribavirina, che sono stati ritrattati con Peg-Interferone alfa-2b 1,5 microgrammi/kg per via sottocutanea, una volta alla settimana, in associazione a Ribavirina, dosata in base al peso corporeo. In questo gruppo di pazienti, in media il 55% ha raggiunto la SVR dopo un trattamento di 48 settimane (59% se pretrattati con Interferone, 50% se pretrattati con PEG-IFN). In generale i *non responders* ad una precedente terapia con Interferone pegilato alfa/Ribavirina ottengono meno facilmente una risposta al ritrattamento alla settimana 12 rispetto ai *non responders* a Interferone alfa non pegilato/Ribavirina (12,4 % vs. 28,6 %). Invece, nel caso di pazienti recidivanti dopo un precedente trattamento con Interferone alfa-2b in monoterapia, il ritrattamento con Interferone alfa-2b e Ribavirina permette di raggiungere una SVR nel 10% di casi in più rispetto al trattamento precedente.

PREDITTIVITÀ ALLA RISPOSTA

Il parametro predittivo di risposta (SVR) alla terapia di associazione con Peg-Interferone e Ribavirina 800-1400 mg, in pazienti trattamento naïve, è il livello di HCV-RNA misurato alla settimana 4 e alla settimana 12. Tali momenti temporali sono predittivi di una risposta sostenuta nel caso in cui, alla 4^a settimana, si sia raggiunta la negativizzazione della viremia oppure il decremento della carica virale sia di almeno 1-log e nel caso in cui, alla 12^a settimana, il decremento della carica virale sia di almeno 2-log o l'RNA virale non sia più rilevabile. In pazienti *non responder* e ritrattati per 48 o 72 settimane invece è predittiva di SVR una soppressione virale alla settimana 12 (livelli non rilevabili di HCV-RNA definiti come <50 UI/ml).

Dati ottenuti dallo studio IDEAL (*Individualized Dosing Efficacy Vs. Flat Dosing to Assess Optimal Pegylated Interferon Therapy*) condotto in pazienti con epatite C da HCV GT-1, sul rate di SVR, hanno evidenziato, inoltre, una correlazione tra la percentuale di risposta alla terapia e la distribuzione del polimorfismo rs12979860 del gene IL28B in diverse etnie (Afroamericani, Ispanici, Asiatici). Tassi di SVR maggiori si riscontrano tra i soggetti rs12979860-CC, suggerendo un possibile ruolo predittivo del polimorfismo nei confronti dell'*outcome* terapeutico.

INDICAZIONI TERAPEUTICHE

Il PEG-IFN è indicato in duplice terapia con RBV, per il trattamento di pazienti adulti affetti da epatite C cronica (CHC), trattamento naïve, che siano positivi per l'RNA del virus dell'epatite C (HCV-RNA), inclusi pazienti con cirrosi compensata e/o co-infetti con HIV clinicamente stabile. L'Interferone pegilato è anche indicato in pazienti adulti precedentemente trattati, in cui il regime di trattamento Interferone alfa in monoterapia o quello di associazione Interferone alfa (pegilato o nonpegilato) e Ribavirina abbiano fallito.

In triplice terapia con Ribavirina e boceprevir o telaprevir, il farmaco è indicato per il trattamento della CHC di genotipo 1, in pazienti adulti con malattia epatica compensata, che non siano stati trattati in precedenza o che non abbiano risposto ad una precedente terapia.

In monoterapia, l'utilizzo del Peg-Interferone è indicato solo in caso di intolleranza alla Ribavirina.

La dose di farmaco raccomandata, in unica somministrazione settimanale per via sottocutanea, è di 180 microgrammi/settimana nel caso del PEG-IFN alfa-2a, mentre per PEG-IFN alfa-2b è calcolata sul peso corporeo del paziente (1,5 mcg/kg/settimana).

Confrontando i dati di studi che hanno valutato l'efficacia (intesa come percentuale di SVR) del trattamento combinato Peg-Interferone + Ribavirina e la percentuale di ricaduta, per genotipo virale, carica virale basale e durata del trattamento, è stato possibile rilevare che la durata ottimale del trattamento è di 48 settimane per pazienti infetti da genotipo virale 1/4 e 24 settimane per i pazienti con genotipo 2/3. Nel caso di pazienti già precedentemente trattati, è opportuno protrarre il trattamento a 72 e 48 settimane, rispettivamente nel caso di infezioni da GT 1-4 e GT 2-3 (PEG-IFN alfa-2a). La durata del trattamento dipende naturalmente anche dalla tollerabilità alla terapia e da fattori prognostici aggiuntivi come il grado di fibrosi; è stato comunque osservato che il trattamento combinato, se associato ad una durata di 24 settimane nel caso di infezione da genotipo 1 e 4 o di 16 settimane nel caso di infezioni da genotipo 2-3 si associa a una maggiore frequenza di ricadute. Sebbene, inoltre, per il buon esito della terapia sia fondamentale che la dose assunta sia il più vicino possibile a quella standard raccomandata, in caso di gravi reazioni avverse o anomalie dei valori di laboratorio, è opportuno comunque modificare i dosaggi di Peg-Interferone e Ribavirina (scalo di Ribavirina di 200mg se Hb < 10 g/dl, sospensione se Hb < 8,5 g/dl). La dose di Peg-Interferone in monoterapia va ridotta della metà nel caso in cui la conta dei neutrofili sia < $0,75 \times 10^9/l$ o la conta piastrinica sia < $50 \times 10^9/l$ e il trattamento va sospeso se i valori di laboratorio di neutrofili e piastrine sono inferiori rispettivamente a $0,5 \times 10^9/l$ e $25 \times 10^9/l$. Particolari accorgimenti posologici devono essere presi in considerazione in pazienti con una funzionalità renale alterata: in monoterapia, la dose iniziale di Peg-Interferone deve essere ridotta del 25% per valori di clearance della creatinina di 30-50 ml/minuto e del 50% per valori di clearance della creatinina di 15-30 ml/minuto.

EFFETTI INDESIDERATI E CONTROINDICAZIONI

Gli effetti avversi osservati in pazienti trattati con PEG-IFN alfa sono del tutto sovrapponibili a quelli registrati in soggetti trattati con associazione di PEG-IFN alfa e Ribavirina, soprattutto per quanto riguarda la sintomatologia a carico del sistema nervoso centrale (SNC) (cefalea, neuropatia, depressione), gli effetti sulla crescita (rallentamento) e sullo sviluppo di bambini ed adolescenti e i rischi sul sistema cardiovascolare in pazienti con anamnesi positiva. Raramente si sono osservate reazioni di ipersensibilità acuta (orticaria, broncocostrizione), alterazioni tiroidee (sia ipo- che iper-) o disturbi oftalmici (emorragie retiniche, occlusione dei vasi retinici); comuni invece la piressia, i disturbi dentali e l'ipotensione dovuta a deplezione di liquidi.

Tab. 1.21: dosi e durata raccomandate per la terapia di associazione Peg-Interferone alfa-2a e Ribavirina in pazienti con HCV. Per LVL si intende una carica virale ≤ 800.000 UI/ml al basale; per HVL si intende una carica virale > 800.000 UI/ml al basale. a dai dati raccolti non è stato possibile stabilire se una dose più elevata di Ribavirina (ad esempio 1000/1200 mg/die in base al peso corporeo) comporti tassi di SVR più alti rispetto alla dose di 800 mg/die, quando il trattamento è ridotto a 16 settimane. *RVR: HCV-RNA non rilevabile alla settimana 4 e alla settimana 24; **RVR HCV-RNA negativo alla settimana 4.

Genotipo	dose di Pegasys	dose di ribavirina	Durata
Genotipo 1 LVL con RVR*	180 microgrammi	<75 kg = 1000 mg ≥75 kg = 1200 mg	24 settimane o 48 settimane
Genotipo 1 HVL con RVR*	180 microgrammi	<75 kg = 1000 mg ≥75 kg = 1200 mg	48 settimane
Genotipo 4 con RVR*	180 microgrammi	<75 kg = 1000 mg ≥75 kg = 1200 mg	24 settimane o 48 settimane
Genotipo 1 o 4 senza RVR*	180 microgrammi	<75 kg = 1000 mg ≥75 kg = 1200 mg	48 settimane
Genotipo 2 o 3 senza RVR**	180 microgrammi	800 mg	24 settimane
Genotipo 2 o 3 LVL con RVR**	180 microgrammi	800 mg ^(a)	16 settimane ^(a) o 24 settimane
Genotipo 2 o 3 HVL con RVR**	180 microgrammi	800 mg	24 settimane

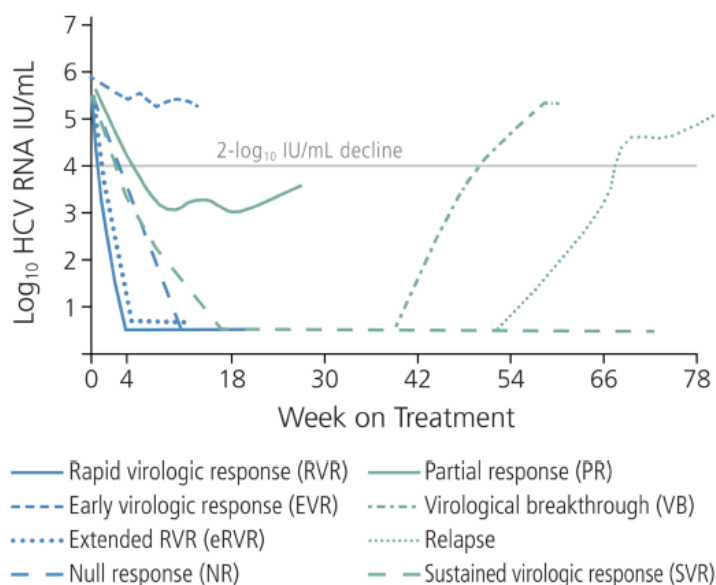


Fig. 1.17: cinetica virale durante il trattamento e definizione della risposta *on-treatment*.

RVR: *Rapid Virological Response*, HCV-RNA non misurabile nel siero dopo 4 settimane di terapia;

EVR: *Early Virological Response*, declino dell'HCV-RNA $\geq 2\text{-log}_{10}$ alla settimana 12 di trattamento;

eRVR: *Extended Rapid Virological Response*, titolo virale non rilevabile nel siero alla settimana 4 di trattamento e mantenimento della soppressione virale almeno fino alla settimana 12 di terapia;

NR: *Null Response*, declino dei livelli di HCV-RNA inferiore a 2-log_{10} IU/mL alla settimana 12 di trattamento;

PR: *Partial Response*, declino dell'HCV-RNA di almeno 2-log_{10} IU/mL, alla settimana 12 di trattamento, ma con livelli detettabili di HCV RNA alla settimana 24 di terapia;

VB: *Virological Breakthrough*, raggiungimento della soppressione della viremia seguita da un aumento a 100 UI/mL o ad un incremento di 1-log_{10} IU/mL o maggiore a qualsiasi *time point* nel corso del trattamento;

RR: *Relapse*, titolo virale (HCV-RNA) rilevabile nel siero durante il periodo di *follow-up* in pazienti con HCV-RNA non rilevabile al termine del trattamento [75].

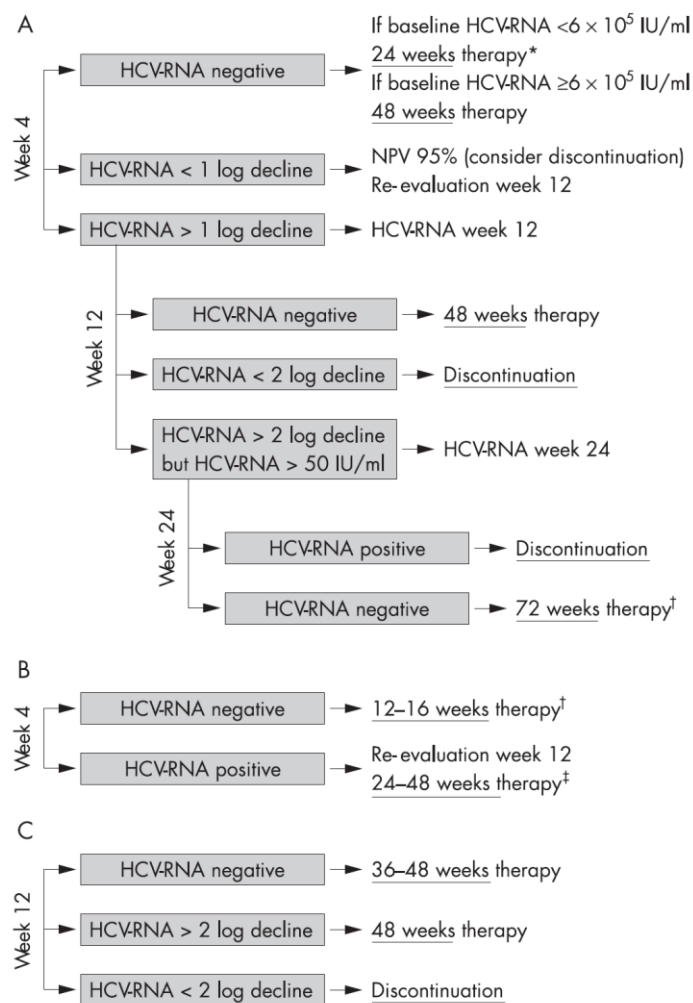


Fig. 1.18: ottimizzazione del trattamento con PEG-IFN/RBV in pazienti con CHC da virus HCV GT 1 (A), 2/3 (B) e 4 (C) [76]. “HCV-RNA negative” indica che il titolo virale non è rilevabile nel siero, ossia è al di sotto del limite di rilevabilità (LLD, *Lower Limit of Detection*) del sistema utilizzato per quantificare l’RNA virale nel siero. Per valutare l’eRVR, l’LLD di riferimento deve essere pari o inferiore a 10-15 IU/ml; per valutare gli altri tipi di risposte virologiche (SVR, RVR, etc.,) devono essere usati saggi con LLD pari o inferiori a 50 IU/ml.

1.9.2. RIBAVIRINA

La Ribavirina si ritrova in commercio sotto il nome di Rebetol (Shering-Plough Corporation per Merck Sharp & Dohme) o Copegus (Roche) ed è stato autorizzato dalla Commissione Europea all’immissione in commercio il 7 maggio 1999.

La Ribavirina è un farmaco antivirale, ad azione diretta, di tipo nucleosidico; si tratta, infatti, di un composto sintetico, analogo strutturale della guanosina che *in vitro* esplica un’attività contro l’RNA e il DNA di alcuni virus con meccanismi virus-statici differenti a seconda del virus su cui agisce.

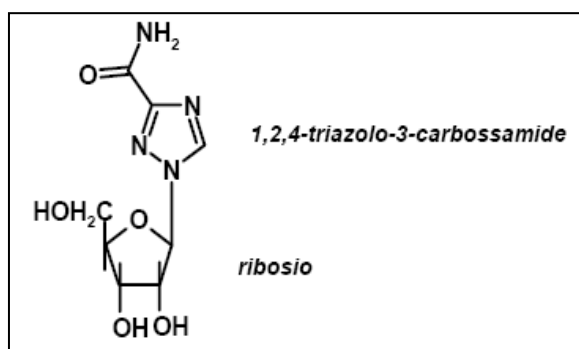


Fig. 1.19: struttura chimica della ribavirina.

La forma mono-fosfato (RMP) inibisce l'enzima inosina mono-fosfato deidrogenasi (IMPDH) competendo con il suo substrato, l'acido inosinico (IMP), strutturalmente simile all'RMP. Siccome l'IMPDH catalizza lo step *rate-limiting* della sintesi *de novo* del GTP, l'azione dell'RMP si traduce in una riduzione della disponibilità cellulare di GTP, in una alterazione della composizione del pool di nucleotidi purinici e quindi nell'inibizione della sintesi degli acidi nucleici e dell'RNA virale. La forma trifosfato (RTP), invece, oltre ad ostacolare la sintesi delle proteine virali, inibendo due enzimi coinvolti nel capping dell'mRNA: la guanililtransferasi e la mRNA metiltransferasi, inibisce l'attività della polimerasi virale sostituendosi ai substrati canonici dell'enzima e causando così la prematura terminazione della catena ribonucleica e l'inibizione della replicazione dell'RNA. L'RTP, inoltre, appaiandosi con la citidina e la uridina/timidina, può sostituirsi sia alla guanosina che all'adenosina, determinando errori nella replicazione del genoma virale. Secondo quanto riportato da Crotty et al., la Ribavirina agisce da agente mutageno, causando un aumento della frequenza di mutazione e la formazione di "quasispecies" dalla ridotta capacità replicativa e infettiva [77]. La Ribavirina infine, modula la risposta immunitaria adattativa determinando un aumentato rilascio di citochine di tipo 1 (IL-2, IFN-gamma e TNF-alfa) promuovendo una potente risposta antivirale mediata da Th1 e CTLs [78].

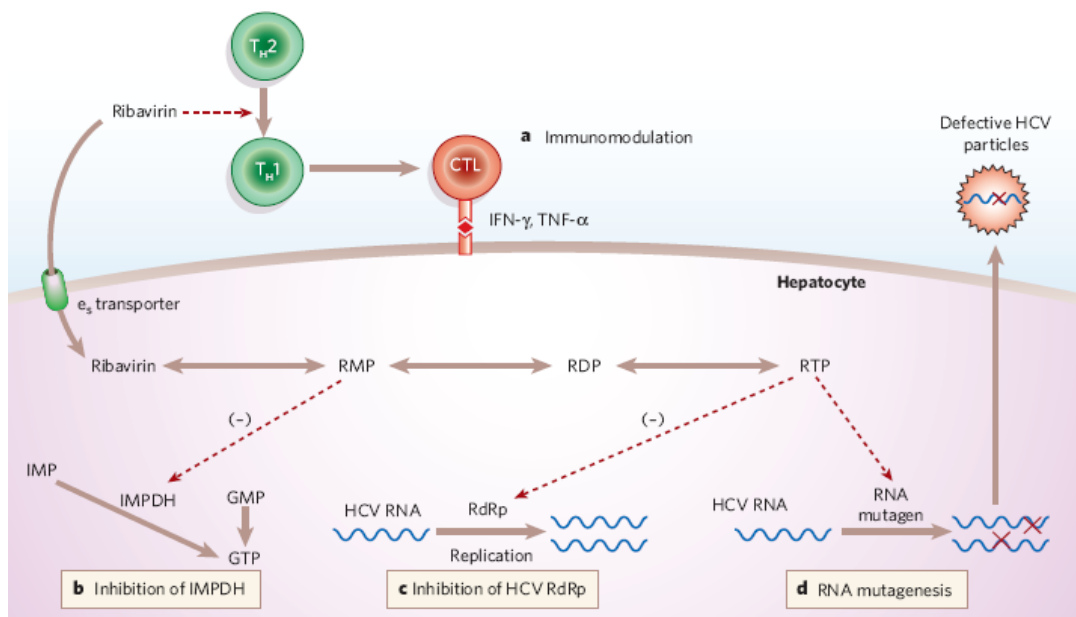


Fig. 1.20: riassunto dei meccanismi d'azione della Ribavirina [44].

Trials clinici hanno dimostrato che la Ribavirina in monoterapia non ha alcuna effetto nell'eliminare il virus dell'epatite C o nel migliorare l'istologia epatica nei 12 mesi di terapia; l'efficacia massima del farmaco si esplica in associazione a Interferone o Peg-Interferone alfa-2b. In due studi clinici (C95-132 e I95-143), in cui pazienti naive sono stati trattati un anno con duplice terapia, la risposta virologica sostenuta (SVR) a fine trattamento è stata raggiunta nel 50% di casi in più rispetto a quanto osservato in monoterapia con Interferone alfa-2b. Nello studio clinico C/I98-580, che ha valutato l'efficacia di tre diversi regimi di trattamento (P1,5/R; P0,5/R e I/R) in 1.530 pazienti naive, è stato poi osservato che l'associazione di Ribavirina a Peg-Interferone alfa-2b (1,5 microgrammi/kg/settimana) è stata significativamente più efficace

dell'associazione di Ribavirina e Interferone alfa-2b (3 MUI/3 volte a settimana), in particolare in pazienti infettati da HCV genotipo 1, valutando la risposta dopo sei mesi di trattamento. Tuttavia, oltre al genotipo di HCV e ai valori basali di carica virale anche la dose di Ribavirina rappresenta un valore prognostico di risposta: dosi di Ribavirina >10,6 o >13,2 mg/kg si associano a SVR maggiori rispetto a quelle osservate in pazienti trattati con dosi ≤ 10,6 mg/kg (Tab. 1.22).

Tab. 1.22: frequenza di risposta sostenuta con Ribavirina + Peg-Interferone alfa-2b per dose di Ribavirina [mg/kg], genotipo e carica virale. La dose di Ribavirina (mg/kg) di 10,6 corrisponde alla dose di 800 mg/die.

Genotipo HCV	Dose di Rebetol (mg/kg)	P 1,5/R	P 0,5/R	I/R
Tutti i Genotipi	All	54 %	47 %	47 %
	≤ 10,6	50 %	41 %	27 %
	> 10,6	61 %	48 %	47 %
Genotipo 1	All	42 %	34 %	33 %
	≤ 10,6	38 %	25 %	20 %
	> 10,6	48 %	34 %	34 %
Genotipo 1 ≤ 600.000 UI/ml	All	73 %	51 %	45 %
	≤ 10,6	74 %	25 %	33 %
	> 10,6	71 %	52 %	45 %
Genotipo 1 > 600.000 UI/ml	All	30 %	27 %	29 %
	≤ 10,6	27 %	25 %	17 %
	> 10,6	37 %	27 %	29 %
Genotipo 2/3	All	82 %	80 %	79 %
	≤ 10,6	79 %	73 %	50 %
	> 10,6	88 %	80 %	80 %

P 1,5/R (Peg-Interferone 1,5 microgrammi/kg/settimana) + Ribavirina (800 mg/die).

P 0,5/R (Peg-Interferone 1,5 microgrammi/kg/settimana per un mese seguito da 0,5 microgrammi/kg/settimana per 11 mesi) + Ribavirina (1.000/1.200 mg/die).

I/R (Interferone alfa-2b [3 MUI tre volte a settimana] + Ribavirina (1.000/1.200 mg/die).

In un ampio studio randomizzato condotto su 3.070 pazienti adulti mai trattati in precedenza, con epatite C cronica genotipo 1, si sono confrontati la sicurezza e l'efficacia del trattamento di tre regimi a base di Peg-Interferone alfa-2b/2a e Ribavirina per un totale di 48 settimane (Tab. 1.23). In tutti i tre gruppi di trattamento, i tassi di SVR erano simili e si abbassavano in pazienti con cirrosi o carica virale al basale >600.000 UI/ml o età > 40 anni.

Percentuali di SVR maggiori si sono riscontrate in pazienti caucasici in confronto agli afro-americi, i quali è noto abbiano un basso fattore prognostico per l'eradicazione del virus. Tra i pazienti con HCV-RNA non rilevabile alla fine del trattamento, il tasso di ricaduta è stato del 24 %. Studi prospettici hanno poi evidenziato che il trattamento per 48 settimane può essere associato ad una più elevata percentuale di risposta e ad un più basso rischio di recidiva, ma è meno tollerato e si associa ad una più alta frequenza di interruzione (5% Vs. 14%) del trattamento o a modificazioni di dose (18% Vs. 49%).

Tab. 1.23: risposta virologica alla settimana 12 di trattamento, risposta alla fine del trattamento, tasso di ricaduta e SVR (Risposta virologica Sostenuta). Il Peg-Interferone è stato somministrato per via sottocutanea, 1 volta a settimana; la Ribavirina è stata somministrata *per os* sulla base del peso corporeo (800 – 1400 mg) in due dosi giornaliere.

Gruppo di trattamento	% di pazienti (numero)		
	peginterferone alfa-2b 1,5 µg/kg + Rebetol	peginterferone alfa-2b 1 µg/kg + Rebetol	peginterferon alfa-2a 180 µg + ribavirina
HCV-RNA non rilevabile alla settimana 12 di trattamento	40 (407/1.019)	36 (366/1.016)	45 (466/1.035)
Risposta alla fine del trattamento*	53 (542/1.019)	49 (500/1.016)	64 (667/1.035)
Ricaduta*	24 (123/523)	20 (95/475)	32 (193/612)
RVS*	40 (406/1.019)	38 (386/1.016)	41 (423/1.035)
RVS in pazienti con HCV-RNA non rilevabile alla settimana 12 di trattamento	81 (328/407)	83 (303/366)	74 (344/466)

*HCV-RNA PCR test, con un limite inferiore di quantificazione di 27 UI/ml
La mancanza di una risposta virologica precoce alla Settimana 12 di Trattamento (HCV-RNA rilevabile con una riduzione < 2 log₁₀ rispetto al basale) è stato un criterio per l'interruzione del trattamento.

In pazienti già trattati con Interferone alfa/Ribavirina, *relapser o non responder* (HCV-RNA positivo alla fine di 12 settimane di trattamento), la duplice terapia per 48 settimane con regime Peg-Interferone alfa-2b, 1.5 microgrammi/kg per via sottocutanea, una volta alla settimana + Rebetol dosato in base al peso corporeo, si è dimostrata efficace e ha consentito di raggiungere una SVR nel 55% dei casi, nel sottogruppo di pazienti con HCV-RNA non rilevabile alla 12^a settimana di trattamento e nel 12% dei casi, in pazienti con riduzione della carica virale > 2 log ma con virus rilevabile alla settimana 12 (studio non comparativo su 2.293 pazienti con fibrosi da moderata a grave).

L'efficacia della duplice terapia è stata valutata anche in pazienti che avevano recidivato a un precedente trattamento con Interferone alfa-2b, in altri due studi clinici (C95-144 e I95-145) che hanno arruolato un totale di 345 pazienti con epatite C cronica. La terapia di associazione Rebetol + Interferone alfa-2b per 6 mesi con sei mesi di *follow up* ha permesso di raggiungere una SVR in un numero di casi 10 volte maggiore a quelli osservati con Interferone alfa-2b in monoterapia (49% Vs 5%).

Per quanto riguarda i dati di efficacia a lungo termine, sono stati condotti due ampi studi di follow-up di almeno 5 anni, su 1.071 + 567 pazienti precedentemente trattati rispettivamente con IFN alfa-2b non pegilato (con o senza Rebetol) e Interferone pegilato (con o senza Rebetol); rispettivamente il 97% e il 99% dei pazienti trattati ha mantenuto la negatività virale dopo aver raggiunto l'SVR; l'SVR, dopo il trattamento dell'epatite cronica con Interferone alfa-2b e Ribavirina, produce una clearance del virus a lungo termine che porta alla risoluzione dell'infezione epatica e ad una cura clinica o guarigione dall'epatite C cronica, anche se questo non preclude il verificarsi di eventi epatici in pazienti con cirrosi (compreso epatocarcinoma).

INDICAZIONI TERAPEUTICHE

La Ribavirina è un farmaco indicato come componente di un regime di terapia combinata con Peg-Interferone alfa-2b o Interferone alfa-2b per il trattamento dell'infezione da virus dell'epatite cronica C in adulti, bambini dai 3 anni in su e adolescenti, senza scompenso epatico, sia naive (non trattati) che precedentemente trattati con insuccesso (*null responder* o *relapser*).

La dose di Ribavirina è tarata sul peso corporeo del paziente mentre la scelta del regime di associazione è basata sulle caratteristiche cliniche del paziente.

La durata del trattamento dipende in generale dal genotipo virale che a sua volta è predittivo della risposta virologica sostenuta.

Nel caso di duplice terapia con Peg-Interferone è previsto un trattamento della durata di 48 settimane per pazienti infetti con HCV genotipo 1 o 4, che abbiano HCV-RNA non rilevabile alla 12esima settimana di terapia e di 24 settimane nel caso di infezione a carico dei genotipi 2 e 3.

In pazienti naive o in ritrattamento, il trattamento con Ribavirina va continuato per un periodo complessivo di 1 anno in caso di genotipo 1 (con negativizzazione di HCV-RNA dopo sei mesi di trattamento) o, nel caso di genotipo non-1 (con negativizzazione di HCV-RNA dopo sei mesi di trattamento), qualora il paziente abbia > 40 anni, sia di sesso maschile oppure presenti fibrosi epatica.

EFFETTI INDESIDERATI E CONTROINDICAZIONI

Rebetol è controindicata in caso di ipersensibilità al principio attivo, gravidanza, allattamento, anamnesi di grave malattia cardiaca, insufficienza renale cronica, cirrosi scompensata, emoglobinopatie, coinfezione HIV-HCV e cirrosi, malattie autoimmuni (in associazione a Interferone).

La Ribavirina causa un calo dei livelli di emoglobina (anche fino a <10g/dl) ed emolisi eritrocitaria che possono portare a un deterioramento della funzionalità cardiaca o a esacerbazione di sintomi cardiopatici.

Studi clinici hanno evidenziato, inoltre, gravi effetti sul SNC (Sistema Nervoso Centrale) sia durante il trattamento che soprattutto nei 6 mesi di *follow-up* dopo il trattamento con Ribavirina associata a Peg-IFN alfa 2b/IFN alfa 2b e con una maggiore incidenza fra i bambini e gli adolescenti rispetto ai pazienti adulti (2,4% Vs. 1%). Nel caso di duplice terapia con Peg-IFN alfa-2b o IFN alfa-2b e Ribavirina si sono osservati depressione, ideazione suicidaria, labilità emotiva e sonnolenza.

A causa degli effetti di tossicità riscontrati sugli elementi del sangue (anemia con riduzioni di Hb > 4 g/dl, anemia emolitica, leucopenia e trombocitopenia) prima di iniziare il trattamento con Ribavirina è importante valutare diversi parametri ematologici e ematochimici (esame emocromocitometrico completo e con formula leucocitaria, conta delle piastrine, dosaggio di elettroliti, creatinina sierica, test di funzionalità epatica, acido urico). Valori basali ottimali pre-trattamento sono: Hb > 12g/dl, piastrine > 100.000/mm³, neutrofili > 1.500/mm³. Le valutazioni di laboratorio devono essere eseguite alla 2^a e 4^a settimane di trattamento e sono da ripetere periodicamente se clinicamente indicato.

Durante il trattamento possono manifestarsi reazioni di ipersensibilità come orticaria, broncocostrizione o esantemi e in alcuni casi si sono riportati casi di retinopatie come emorragie retiniche o neuropatia ottica. Oltre a quanto già citato, tra le più comuni (<1/10) reazioni avverse si riscontrano anoressia, cefalea, disturbi visivi, vertigini, diarrea, vomito, ittero, alopecia rash cutanei e astenia.

1.9.3. MECCANISMI MOLECOLARI DI EVASIONE DEL SISTEMA IMMUNITARIO DA PARTE DEL VIRUS HCV

Una delle possibili spiegazioni della parziale efficacia della terapia con Interferone risiede nella comprensione del meccanismo patogenetico del virus HCV. Un'ipotesi propone che la proteasi virale NS3-4 non solo processi le proteine virali ma anche inattivi per clivaggio, componenti dell'*antiviral signaling pathway*, come TRIF (*TIR domain containing Adaptor-Inducing IFN*), Cardiff (*CARD Adaptor Inducing IFN- β*), e RLHs (*RNA-sensing RIG-like helicases*), che rilevano il virus e inducono la trascrizione degli IFN I endogeni. Foy e colleghi dimostrarono che l'attività proteasica di NS3/4A impedisce la fosforilazione e l'attivazione di IRF-3 un fattore di trascrizione che media la produzione di IFN indotta dal virus [79].

Un'altra proteina virale, NS5A (*non-structural-protein 5A*), induce l'espressione di IL-8 (Interleuchina 8), una chemochina pro-infiammatoria che però interferisce con la risposta antivirale indotta da IFN probabilmente riducendo l'attività dell'enzima OAS (2'-5' oligoadenylate-synthetase) [80]. Gale e collaboratori hanno, inoltre, dimostrato che una variante della proteina NS5A, che presenta un gruppo carbossi-terminale aggiuntivo di 26 aminoacidi, può legare e inattivare PKR (*Protein Kinase R*), proteina chiave nell'inibizione della replicazione virale [81]. L'attività di PKR può anche essere influenzata dalla proteina virale E2 (*envelope 2*); E2 è in grado di legare PKR inattivandolo per mezzo di un dominio proteico omologo al dominio PePHD (*PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain*) presente su eIF2 α e riconosciuto da PKR. L'omologia di E2 con PePHD è più alta nei virus di genotipo 1 [82]. Altri dati indicano che HCV interferisce con il segnale dell'IFN-alfa up-regolando la proteina PP2A (*Protein Phosphatase 2A*) che causa una riduzione del legame di STAT1 al DNA attraverso l'ipometilazione della proteina STAT1 e la sua associazione a PIAS1 (*protein inhibitor of activated STAT*) [83]. Il virus HCV riesce quindi ad instaurare una infezione cronica, inattivando il sistema IFN I e compromettendo la risposta antivirale endogena. E' stato osservato, inoltre, che pazienti con un'espressione al basale (pre-trattamento) elevata delle proteine ISGs tendono a rispondere meno alla terapia se comparati con pazienti con un'espressione basale bassa. E' verosimile supporre che i soggetti con una risposta antivirale up-regolata siano refrattari alla stimolazione del sistema immunitario mediata dall'IFN esogeno e quindi più propensi a non rispondere alla terapia o a recidivare (pazienti *partial responders* o *non-responders*). La pre-attivazione dei geni ISGs si riscontra poi più frequentemente in pazienti infetti da HCV di genotipo 1 e 4, la cui eradicazione è molto più difficile rispetto ai genotipi 2 e 3 (rate di successo della terapia < 30% Vs. 60%). E' quindi possibile che l'infezione da genotipo 2 e 3 si associ a una minore attivazione dell'immunità innata e quindi ad una minore induzione dell'IFN endogeno, rendendo il soggetto più suscettibile alle terapie a base di IFN-alfa che in tali pazienti indurrebbero uno stato antivirale molto rapido. Nei pazienti resistenti alla terapia e con elevati livelli pre-trattamento delle ISGs è inoltre possibile che siano attivi dei sistemi inibitori, o virali o endogeni, della risposta antivirale mediata dall'IFN [84].

1.9.4. AGENTI ANTIVIRALI DI NUOVA GENERAZIONE

Il gruppo di composti di nuova generazione più studiati e anche più efficaci nel trattamento dell'infezione cronica da HCV è sicuramente quello dei farmaci chiamati collettivamente STAT-C (*Specifically Targeted Anti-Viral Therapy for Hepatitis C*) o DAAs (*Directly Acting Antiviral Agents*)

che attualmente sono in valutazione in studi di fase I-IV (Tab. 1.24). Lo sviluppo dei composti DAAs è stato inizialmente focalizzato verso il genotipo 1 di HCV sia per difficoltà di trattamento delle infezioni a carico di tale genotipo, sia per la disponibilità di modelli in vitro (il modello del replicone di HCV) specifici solo per il genotipo 1. I DAAs agiscono a differenti livelli, nell'inibire in modo specifico e selettivo molecole coinvolte direttamente o indirettamente nella replicazione virale, determinando un rapido declino dei livelli di RNA virale nel siero [73].

I principali target molecolari degli DAAs sono rappresentati dalle proteine non strutturali del virus e includono: la RNA polimerasi RNA-dipendente NS5B (RdRp), la serin proteasi NS3 e il suo cofattore NS4A e la proteina NS5A. Gli inibitori di NS5B si suddividono in due classi: nucleosidici (NI) e non nucleosidici (NNI). I primi, nella forma trifosfato, competono con i substrati nucleotidici naturali della HCV NS5B RdRp e riducono l'efficienza di elongazione della polimerasi, agendo da terminatori della catena ribonucleica in crescita. Molti NI sono in fase di studio clinico e alcuni come il PSI-7977 (Sofosbuvir) di Pharmasset/Roche è in fase III. Gli inibitori non nucleosidici agiscono in modo allosterico sull'enzima NS5B, ostacolando il legame allosterico di cofattori della polimerasi virale.

Tra gli agenti DAAs, quelli maggiormente studiati sono gli inibitori peptido-mimetici della serin-proteasi NS3/4A, proteina con funzioni chiave nella replicazione virale e nella modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. Esistono due classi principali di inibitori: quelli macrociclici e i derivati lineari del tetra-peptide alfa-chetoamide, caratterizzati entrambi da una notevole attività antivirale e da una modesta-bassa barriera genetica alla resistenza. Un'altra caratteristica comune agli inibitori proteasici è la selettività verso specifici genotipi di HCV, legata al fatto che genotipi e sottotipi virali diversi presentano lievi differenze nella sequenza aminoacidica del dominio proteasico della proteina NS3. Alcuni (es. BILN 2061) non hanno superato la fase clinica di sperimentazione a causa dell'elevata tossicità in vivo, altri invece sono in corso di approvazione (Simeprevir), altri ancora (VX-950 o Telaprevir e SCH-503034 o Boceprevir) hanno superato le fasi di sperimentazione clinica e sono stati approvati per l'immissione in commercio in USA e nell'Unione Europea, compresa l'Italia.

Uno dei principali limiti nell'utilizzo dei nuovi composti è lo sviluppo di resistenza associata al trattamento. La resistenza ai composti antivirali è legata all'elevata variabilità genetica del virus che a sua volta dipende dalle caratteristiche replicative di HCV. La replicazione dell'RNA virale è, infatti, un processo *errore-prone*, con un tasso di errore di circa 10^{-3} - 10^{-4} mutazioni/sito/ciclo di replicazione. Come conseguenza dell'elevato tasso di replicazione e di mutazioni spontanee, HCV presenta un notevole turn-over virale e circola nell'ospite come un insieme di virioni "*quasi-species*" geneticamente differenti, ma strettamente correlati caratterizzati da una diversa fitness o capacità di adattamento. La presenza di mutanti trattamento-resistenti determina nella maggior parte dei casi il fallimento della terapia e rappresenta la ragione per cui i DAAs in monoterapia non sono raccomandati.

Nell'ambito degli antivirali di nuova generazione risultati incoraggianti si sono ottenuti anche con altri composti che sono attivi verso *targets* cellulari coinvolti nel ciclo replicativo di HCV o con proprietà immuno-modulatorie oppure che presentano una differente attività antivirale rispetto agli DAAs; alcuni tra questi agiscono come inibitori di proteine cellulari con funzione regolatoria (inibitori delle cyclofilline), altri invece bloccano i meccanismi di legame-entrata del virus nella cellula (antagonisti di recettori cellulari come SR-B1 o CD81) o di assemblaggio-rilascio del virus dalla membrana cellulare (inibitori dell' α -1 glucosidasi I) [85].

Tab. 1.24: agenti DAAs in sviluppo [86].

Drug name	Company	Target/active site	Phase
NS3-4A protease inhibitors			
Ciluprevir (BILN 2061)	Boehringer Ingelheim	Active site/macrocyclic	Stopped
Telaprevir (VX-950)	Vertex	Active site/linear	IV
Boceprevir (SCH503034)	Schering-Plough	Active site/linear	IV
Simeprevir (TMC435)	Janssen/Medivir	Active site/macrocyclic	III
Danoprevir (R7227)	Roche/InterMune	Active site/macrocyclic	III
Vaniprevir (MK-7009)	Merck	Active site/macrocyclic	Halted/II
MK-5172	Merck	Active site/macrocyclic	II
BI201335	Boehringer Ingelheim	Active site/linear	III
Narlaprevir (SCH900518)	Schering-Plough	Active site/linear	Halted
Asunaprevir (BMS-650032)	Bristol-Myers Squibb	Active site	II
PHX1766	Pheromix	Active site	Halted
GS-9256	Gilead	Active site	II
GS-9451	Gilead	Active site	I
ABT450	Abbott	Active site	II
IDX320	Idenix	Active site	II
ACH-1625	Achillion	Active site/macrocyclic?	II
Nucleoside analogue NS5B polymerase inhibitors			
Valopicitabine (NM283)	Idenix/Novartis	Active site	Stopped
Mericitabine (R7128)	Roche/Pharmasset	Active site	III
R1626	Roche	Active site	Stopped
Sofosbuvir (GS-7977) (former PSI-7977)	Pharmasset	Active site	III
PSI-938	Pharmasset	Active site	Stopped
IDX184	Idenix	Active site	Halted
ALS-220	Alios/Vertex	Active site	I
Non-nucleoside NS5B polymerase inhibitors (NNI)			
BILB 1941	Boehringer Ingelheim	NNI site 1/thumb 1	Stopped
BI207127	Boehringer Ingelheim	NNI site 1/thumb 1	II
MK-3281	Merck	NNI site 1/thumb 1	Stopped
TMC647055	Janssen	NNI site 1/thumb 1	I
Filibuvir (PF-00868554)	Pfizer	NNI site 2/thumb 2	II
VX-759	Vertex	NNI site 2/thumb 2	Halted
VX-916	Vertex	NNI site 2/thumb 2	Halted
VX-222	Vertex	NNI site 2/thumb 2	II
Setrobuvir (ANA598)	Anadys	NNI site 3/palm 1	II
ABT-072	Abbott	NNI site 3/palm 1	Halted
ABT-333	Abbott	NNI site 3/palm 1	II
HCV-796	ViroPharma/Wyeth	NNI site 4/palm 2	Stopped
Tegobuvir (GS-9190)	Gilead	NNI site 4/palm 2	II
IDX375	Idenix	NNI site 4/palm 2	II
NS5A inhibitors			
Daclatasvir (BMS-790052)	Bristol-Myers Squibb	NS5A domain 1 inhibitor	III
BMS-824393	Bristol-Myers Squibb	NS5A protein	I
PPI-461	Presidio Pharmaceuticals	NS5A protein	I
GS-5885	Gilead	NS5A protein	II
ABT-267	Abbott	NS5A protein	II
MK-8742	Merck	NS5A protein	I
Drugs targeting host factors			
Alisporivir (Debio-025)	Novartis	Cyclophilin inhibitor	Halted
NIM811	Novartis	Cyclophilin inhibitor	Halted
SCY-635	Scynexis	Cyclophilin inhibitor	II
Miravirsen	Santaris	miRNA122 antisense RNA	II

1.9.4.1. BOCEPREVIR

Victrelis® è un farmaco sviluppato dalla Merck Sharp & Dohme LTD disponibile in Europa dal 18 luglio 2011, quando l'*European Medicines Agency* (EMA) ne ha autorizzato l'immissione in commercio; in Italia il farmaco è divenuto disponibile a partire da gennaio 2013 (Determina n. 715/2012).

L'autorizzazione alla commercializzazione di Boceprevir in combinazione con la terapia standard attuale si basa sui risultati di efficacia e sicurezza di due grandi studi clinici di fase III condotti in Europa e Nord America. Questi studi hanno esaminato circa 1.500 pazienti adulti affetti dall'infezione causata dal genotipo 1 del virus dell'epatite C cronica (HCV) precedentemente non trattati (studio HCV SPRINT-2, *Serine Protease Inhibitor Therapy 2*, 1097 pazienti) o già sottoposti ad una terapia a base interferonica senza però aver raggiunto l'SVR (studio HCV RESPOND-2, *Retreatment with HCV Serine Protease Inhibitor Boceprevir and PegIntron/Rebetol 2*, 403 pazienti). Entrambi gli studi hanno incluso due bracci di trattamento con Boceprevir: un braccio RGT (*Response-Guided Therapy*), in cui i pazienti con virus non rilevabile (HCV-RNA) all'ottava settimana di trattamento erano idonei per una durata più breve della terapia (28 o 32 settimane) e un braccio di trattamento a 44 settimane. Gli studi hanno compreso anche un braccio di controllo in cui i pazienti hanno ricevuto un trattamento a 48 settimane con solo Peg-Interferone alfa-2b e Ribavirina (P/R). In entrambi gli studi, tutti i pazienti hanno seguito la strategia di *lead-in*, ovvero sono stati trattati con 1.5 µg/kg/settimana di Peg-Interferone alfa-2b (P) e una dose sperimentale di Ribavirina (R) pari a 600-1400 mg/die per 4 settimane, al termine delle quali hanno assunto 800mg di Boceprevir tre volte al giorno per 44 settimane.

Il parametro di efficacia era il numero di soggetti in cui, a distanza di 24 settimane dalla conclusione del trattamento, non rimaneva traccia dell'infezione virale all'esame del sangue (assenza di RNA virale alla 24a settimana del periodo di follow-up).

Dagli studi effettuati, Victrelis® si è dimostrato efficace nel trattamento di pazienti con epatite C cronica in associazione alla terapia con Peg-IFN alfa-2b e Ribavirina. L'aggiunta di Boceprevir alla terapia standard ha determinato un aumento sostanziale e significativo della percentuale di pazienti in grado di raggiungere la SVR (*Sustained Virological Response*) e una diminuzione del tempo complessivo di trattamento rispetto allo *Standard of Care* (SOC), stabilito in 48 settimane in pazienti adulti con infezione da HCV di genotipo 1.

Nello studio SPRINT-2 si è registrato un incremento di circa il 30% nel tasso di SVR: circa il 70% dei pazienti ha raggiunto una risposta virologica sostenuta, rispetto al 40% dei pazienti trattati con la terapia standard. Nello studio RESPOND-2 è stato osservato che nei gruppi di pazienti trattati con Boceprevir più del 60% dei pazienti raggiungeva l'SVR rispetto al 21% del gruppo di controllo; inoltre, tra i pazienti con HCV-RNA non individuabile all'8^a settimana, il tasso di SVR è stato dell'86% dopo 32 settimane di Boceprevir + P/R e dell'88% dopo 44 settimane. Fra i 102 pazienti con un decremento dei livelli di RNA virale inferiore a 1-log₁₀ IU/ml alla 4^a settimana di trattamento, il tasso di SVR è stato dello 0% nel gruppo di controllo e 33% in quelli che hanno ricevuto la triplice terapia, ad indicare che Boceprevir può essere utile in tutti quei pazienti che non rispondono o rispondono in modo parziale alla terapia standard, per ottenere l'eradicazione del virus. Basandosi sui dati di letteratura, relativi alla correlazione tra variante genetica descritta dallo SNP rs12979860 C>T a monte del gene IL28B (Interferone Lambda 3) e la risposta alla terapia combinata con Peg-IFN alfa-2b e Ribavirina, è stata condotta un'analisi retrospettiva dei dati genetici ottenuti dallo screening di tale variante nei pazienti arruolati nei trials clinici SPRINT-2 e RESPOND-2; dai dati raccolti è emerso che l'89% dei pazienti C/C per lo SNP rs12979860

riuscivano a eradicare il virus già entro le prime 8 settimane di trattamento con triplice terapia e, di conseguenza, erano eleggibili per una terapia di più breve durata rispetto al 52% dei pazienti non C/C.

Le reazioni avverse si sono verificate in circa il 98% dei pazienti, sebbene gli effetti collaterali più severi si siano riscontrati nel 10% dei pazienti. Gli effetti indesiderati più comuni riscontrati sono stati affaticamento, anemia, nausea, mal di testa, disgeusia e rash cutanei. Di questi, l'anemia si è manifestata più frequentemente in pazienti che hanno ricevuto Boceprevir in combinazione con P/R rispetto al controllo (49% Vs. 29%): il 43% ha manifestato anemia di grado 1 (9,5-10,9 g/dl), il 31% di grado 2 (8-9,4 g/dl), il 3% di grado 3 (6,5-7,9 g/dl) e l'1% di grado 4 (<6,5 g/dl) rispetto al gruppo di controllo in cui le percentuali rispettive erano del 36%, 17%, 2% e 0%.

L'aggiunta di Victrelis a Peg-Interferone alfa-2b/2a e Ribavirina ha dato luogo, inoltre, a più alte incidenze di neutropenia e neutropenia di grado 3-4 (conta dei neutrofili < 0.75 x 10⁹/l) e ad una diminuzione della conta piastrinica in un numero maggiore di pazienti (3% Vs. 1%) rispetto a quanto osservato con la terapia standard.

Il principio attivo di Victrelis, Boceprevir, è un inibitore dell'enzima NS3, una proteasi del virus HCV, implicata nella duplicazione virale. Boceprevir si lega in modo covalente, ma reversibile, al sito attivo della serina proteasi NS3 (Ser139) tramite un gruppo funzionale alfa-chetoamidico, inibendo così la replicazione virale nelle cellule ospiti infettate da HCV, determinando un rallentamento del tasso di duplicazione virale e favorendo quindi l'eliminazione del virus. La potenza di Boceprevir viene ridotta da alcune varianti aminoacidiche della proteasi NS3 associate a resistenza (RAV): V36M, T54A, R155K, A156S e V170A. L'utilizzo di Victrelis® in monoterapia non è quindi consigliabile in quanto si associa alla selezione di ceppi virali resistenti verso i quali il farmaco ha efficacia limitata o nulla.

Victrelis® è un farmaco indicato per il trattamento dell'epatite C cronica (CHC) da virus HCV di genotipo 1 in associazione con Peg-Interferone α e Ribavirina. L'utilizzo del farmaco è limitato a pazienti adulti con malattia epatica compensata, cioè il cui fegato pur danneggiato mantiene la propria funzionalità epatica, che non siano stati precedentemente trattati oppure che non abbiano risposto a una precedente terapia.

Attualmente il regime standard di trattamento prevede la combinazione di Peg-IFN alfa plus Ribavirina per 4 settimane da integrare poi con Victrelis per un periodo non superiore alle 44 settimane: un trattamento di 28 settimane complessive (4 settimane di lead-in con Peg-IFN/R + 24 settimane di triplice) è previsto per i naive, senza cirrosi, che raggiungono la eRVR (HCV-RNA non rilevabile tra la 8 e la 24^{ima} settimana); un trattamento di 48 settimane complessive (4 settimane di lead-in con Peg-IFN/R + 32 settimane di triplice + 12 settimane di Peg-IFN/RBV) è previsto per i pazienti naive non cirrotici che presentano livelli di HCV-RNA rilevabili alla settimana 8 di trattamento ma non alla 24 e per pazienti non cirrotici *partial responders* o *relapser* o *null responders*; un trattamento di 48 settimane complessive (4 settimane di lead-in con Peg-IFN/R + 44 settimane di triplice) è previsto infine per tutti i pazienti cirrotici e per quelli *non responders* a un precedente trattamento. La dose raccomandata è di 800 mg (quattro capsule) per tre volte al giorno da assumere per os in concomitanza dei pasti.

Il trattamento con Victrelis in associazione a Peg-Interferone alfa-2b e Ribavirina va interrotto qualora il paziente abbia valori di acido ribonucleico del virus HCV superiore a 100UI/ml alla 12^a settimana o se presenta valori di HCV-RNA rilevabili alla 24^a settimana.

1.9.4.2. TELAPREVIR

Incivo® è un farmaco sviluppato dalla casa farmaceutica Janssen-Cilag International N.V., contenente il principio attivo Telaprevir; l'EMA ne ha raccomandato l'approvazione per la commercializzazione in data 22 Luglio 2011 e il 19 settembre 2011 è stata rilasciata l'autorizzazione da parte della Commissione europea all'immissione in commercio in tutta l'Unione Europea. In Italia il farmaco è divenuto disponibile dal gennaio 2013 (Determina del 26 novembre 2012 n° 713/2012).

Telaprevir, noto anche con la sigla VX-950, è farmaco simil-peptidico in grado di inibire la serin-proteasi NS3/4A del virus HCV, impedendo al virus HCV di replicarsi e, in associazione a Peg-Interferone alfa e Ribavirina, aumenta la possibilità di eliminazione del virus.

Telaprevir presenta un'attività antivirale molto elevata controilanciata però da una bassa barriera genetica alla resistenza: il farmaco non è attivo in presenza di alcune sostituzioni aminoacidiche nell'enzima NS3, pertanto l'utilizzo in monoterapia può rapidamente far emergere varianti farmaco-resistenti. Da studi di mutagenesi localizzata in vitro è risultato che Telaprevir è relativamente efficace in presenza delle varianti V36A/M, T54A/S, R155K/T e A156S (aumento di 3-25 volte della IC50) presenti nelle 4 posizioni nella regione della proteasi NS3-4A compatibili con il meccanismo d'azione di Telaprevir.

Il farmaco è stato esaminato in tre importanti studi clinici di fase III su pazienti affetti da epatite C cronica di genotipo 1. I dati ottenuti su 2290 pazienti hanno attestato la maggiore efficacia del regime a base di Telaprevir rispetto al solo trattamento standard. In uno di questi, lo studio 108 (ADVANCE) nel gruppo trattato con Telaprevir per dodici settimane in associazione a Peg-Interferone alfa-2a e Ribavirina (T12/PR), la percentuale di SVR è stata del 72% rispetto al gruppo di controllo (Pbo/PR48). Inoltre, le percentuali di SVR sono state maggiori (differenza di circa il 30%) per il gruppo raccomandato T12/PR (1.125 mg/12ore [T12(b.i.d.)/PR]) rispetto al gruppo di controllo in tutti i sottogruppi analizzati, stratificando i pazienti per età, sesso, etnia, indice di massa corporea, genotipo virale, HCV-RNA basale (> o < di 800.000 UI/ml) ed entità di fibrosi epatica, confermando quindi la superiorità della triplice terapia rispetto all'attuale *Standard of Care*. Dati ottenuti dallo studio C216 REALIZE hanno, inoltre, dimostrato la sostanziale superiorità dei regimi a base di telaprevir rispetto alla terapia standard nei pazienti *relapser o non responders* con tassi di risposta rispettivamente dell'84% e del 31% contro tassi del 22% e 5% ottenuti con la combinazione Peg-IFN/RBV.

La risposta alla terapia in termini di SVR, è stata anche valutata nello studio di fase III C211, stratificando i pazienti in base al genotipo a livello del polimorfismo rs12979860 del gene IL28B.

Come già osservato per la terapia standard, il tasso di SVR nei pazienti rs12979860-CC è risultato pari al 92% rispetto al 66% osservato nei soggetti rs12979860-TT.

Il profilo di efficacia è stato valutato in uno studio di follow-up (studio 112 EXTEND) della durata di tre anni da cui è emerso che più del 99% dei pazienti aveva mantenuto il proprio status nei tre anni dalla fine del trattamento.

Telaprevir è indicato nel trattamento dell'Epatite C cronica di genotipo 1, in associazione a Peg-Interferone alfa-2a o -2b e Ribavirina, in pazienti adulti con epatopatia compensata (compresa la cirrosi), che siano naive al trattamento o che siano stati precedentemente trattati con IFN-alfa (non o pegilato) da solo o in associazione a Ribavirina, compresi i pazienti recidivanti, i *partial responder* e i *null responder*. In pazienti naive, è previsto un trattamento T/PR della durata di 12 settimane; sulla base dei dati di cinetica virale alla settimana 4 e 12 di trattamento, ai pazienti vengono somministrati Peg-Interferone/Ribavirina per un totale di 48 o 24 settimane a seconda

che i livelli di HCV-RNA siano o meno rilevabili. In pazienti *partial responder* o *null responder* il trattamento con INCIVO deve essere iniziato in associazione a Peg-Interferone alfa e Ribavirina e somministrato per 12 settimane, seguito da una terapia con soli Peg-Interferone alfa e Ribavirina (senza INCIVO), per una durata complessiva del trattamento di 48 settimane. Se i livelli di HCV-RNA risultano maggiori a 1000 UI/mL alla settimana 4 o 12 di trattamento, è consigliato interrompere la terapia.

Come già descritto per Boceprevir, gli effetti indesiderati più comuni sono l'anemia, la nausea e l'eruzione cutanea. In particolare l'incidenza e la gravità dell'anemia sono risultate maggiori del doppio rispetto a quanto osservato con la terapia standard (SOC).

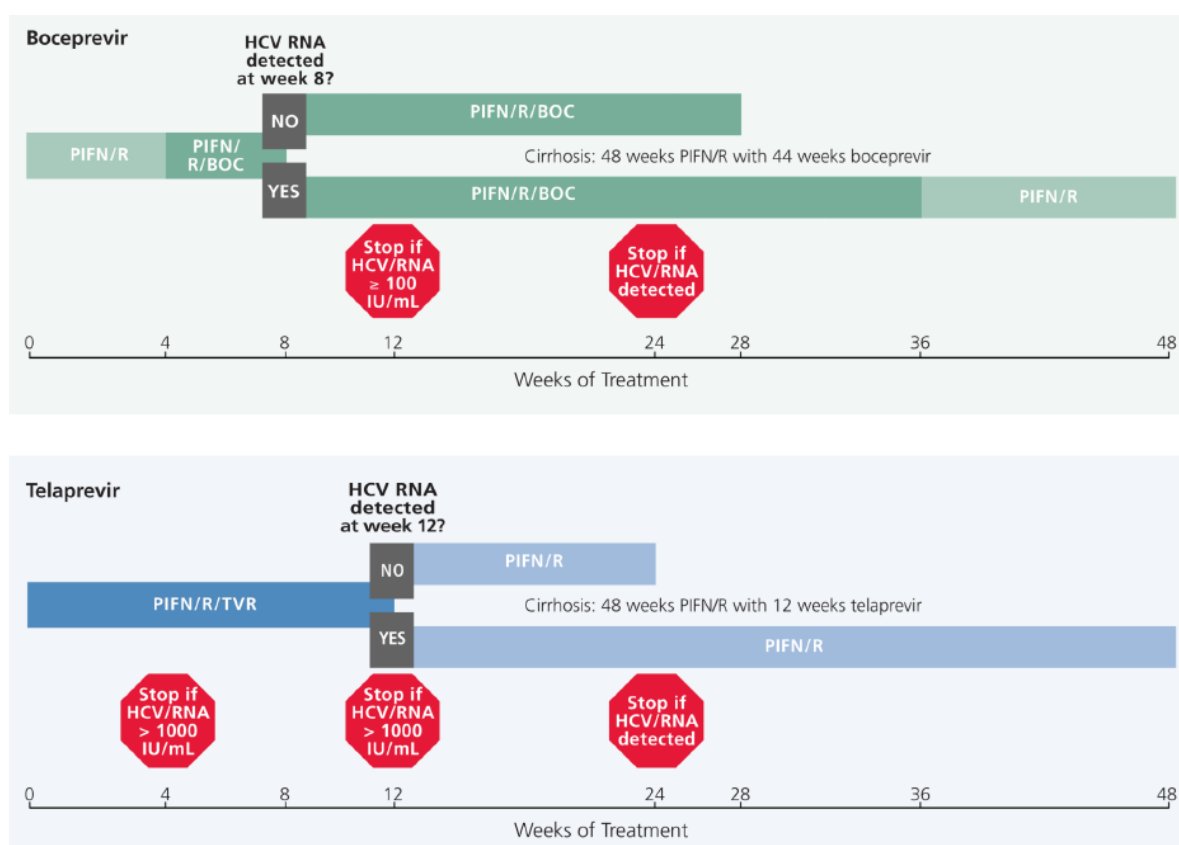


Fig. 1.21: *stopping (futility) rules* valide per la triplice terapia con Boceprevir (BOC) e Telaprevir (TVR) in pazienti trattamento naive [75].

1.9.4.3. CONSIDERAZIONI SULLA TRIPLICE TERAPIA

Attualmente la triplice terapia con BOC o TLV è il trattamento di riferimento per pazienti *experienced (relapser o partial responder)*, cioè in cui un precedente trattamento con Peg-IFN e RBV abbia fallito soprattutto in presenza di fibrosi severa (F3-F4) o cirrosi compensata.

Candidati alla triplice terapia sono anche i pazienti *trattamento naive* con fibrosi severa (F3) o cirrosi (F4) compensata.

In ogni caso, sia in pazienti naive che in pazienti *experienced*, l'indicazione al trattamento con triplice deve essere ponderata nel singolo paziente in funzione dell'urgenza terapeutica (rischio

evolutivo della malattia epatica), delle probabilità di successo e dal rapporto rischio/beneficio del trattamento che è legato principalmente all'incidenza e alla gravità degli effetti collaterali della terapia e alla disponibilità di cure alternative (es. IFN- λ s).

La probabilità di successo è condizionata oltre che dal tipo di trattamento, dall'età, dallo stadio della malattia, dal profilo virologico (livelli viremici, genotipo virale, sottotipo virale) e dal genotipo IL28B, la cui rilevanza è inversamente proporzionale alla potenza antivirale dei farmaci. Considerare i polimorfismi nel gene IL28B è utile per valutare l'eleggibilità a trattamenti di durata inferiore o al trattamento antivirale in casi particolari per i quali l'uso della triplice terapia non è raccomandato o controverso. Per esempio pazienti rs12979860-CC potrebbero essere trattati per 24 settimane nel caso di duplice terapia e 12 settimane o meno nel caso di triplice (TLV) o quadruplica terapia (PEG-IFN/RBV + 2 DAAs); dall'altro lato i pazienti portatori delle varianti alleliche sfavorevoli rs12979860-CT/TT, seppur asintomatici o con fibrosi assente o lieve (F0-F1), potrebbero trarre giovamento da un trattamento precoce per evitare la progressione della patologia e per aumentare la probabilità di eradicazione del virus [75]. La valutazione delle varianti alleliche del gene IL28B, inoltre, potrebbe aiutare il clinico nell'individuazione dei pazienti per i quali un regime a base di IFN potrebbe essere utile e sufficiente a eradicare il virus a da quelli invece che trarrebbero più beneficio da regimi combinati con Peg-IFN/RBV e DAA, come nel caso di pazienti che sono portatori delle varianti alleliche associate a una ridotta risposta (rs12979860-TT e rs8099917-GG) [87]. Non bisogna infatti dimenticare che il genotipo rs12979860-CC è associato a una migliore cinetica virale precoce e si correla significativamente oltre che alla SVR anche alla RVR e alla cEVR (*Complete Early Virological Response*, HCV-RNA negativo o titolo virale non rilevabile nel siero, alla 12esima settimana di trattamento) pertanto la sua valutazione è di estrema importanza per la gestione clinica del paziente prima di intraprendere il trattamento per poter scegliere il regime terapeutico più efficace [88].

1.9.5. PROSPETTIVE FUTURE

I limiti terapeutici della terapia standard e della triplice terapia hanno portato i ricercatori a valutare altri regimi di trattamento *IFN-free* basati sulla combinazione di DAAs specifici per target virali differenti e per i quali non ci siano evidenze di cross-resistenza. Sia la SOC che la triplice terapia si associano, infatti, a spiacevoli effetti avversi e mostrano una limitata efficacia in pazienti con fibrosi in stadio avanzato e/o cirrosi scompensata o non responsivi a precedenti trattamenti; inoltre, la somministrazione di DAAs con una barriera bassa alla resistenza non può essere slegata da quella di IFN/Ribavirina e la responsività all'IFN, in tali casi, rimane un fattore chiave per il successo della triplice terapia e per evitare di selezionare varianti virali resistenti (RAVs).

Da dati preliminari, le combinazioni di DAAs che si sono rivelate più efficaci in regimi *IFN-free* sono state quelle di composti ad ampio spettro di azione virale, con un'elevata barriera genetica alla resistenza e/o una potente attività antivirale (inibitori NI NS5B, inibitori diretti a fattori dell'ospite e inibitori NS3-4A e NS5A). La combinazione di un inibitore della proteina NS5A, Daclatasvir (60 mg /die) e un inibitore di NS3-4A, Asunaprevir (1200-400 mg/die) in pazienti con infezione da HCV di genotipo 1b e *non responders* a Peg-IFN /RBV ha permesso di raggiungere dei tassi di SVR del 90%.

È stato poi osservato che l'aggiunta di Ribavirina in regimi *IFN-free* svolge un ruolo importante nel prevenire fenomeni di recidiva a lungo termine e potenzia l'efficacia della terapia. A tal proposito

si sono rivelati chiarificatori i dati clinici raccolti nello studio ELECTRON per il farmaco Sofosbuvir (GS-7977), un inibitore NI della polimerasi virale. In pazienti trattamento-naive, trattati con Sofosbuvir e Ribavirina per 12-24 settimane e con genotipo 1, 2 e 3 si sono raggiunti tassi di SVR rispettivamente dell'80 e del 100%. Il trattamento con Sofosbuvir in monoterapia, in pazienti trattamento-naive con HCV genotipo 2 e 3, ha consentito di raggiungere una *rate* di SVR di solo il 60%. Risultati simili sono stati ottenuti anche nello studio SOUND-C2 che ha confrontato il regime di associazione di BI-201335 (inibitore NS3-4A) con BI-207127 (inibitore NNI), con o senza Ribavirina, per 16-40 settimane. La co-somministrazione della Ribavirina ha determinato un aumento 30% nella percentuale di pazienti con SVR.

Attualmente nuovi inibitori della proteasi NS3-4A, di seconda e terza generazione, sono in fase di sviluppo (Vaniprevir, Asunaprevir, Simeprevir etc.) e potrebbero apportare notevoli vantaggi come una migliorata tollerabilità, un'attività antivirale a più ampio spettro d'azione, profili di resistenza migliorati e parametri farmacocinetici ottimizzati.

Per abbassare il rischio di fallimento terapeutico, soprattutto in pazienti a rischio di recidiva, *non responders* a IFN/Ribavirina o con cirrosi non compensata e fibrosi grave, si è ipotizzato l'uso di IFN/RBV in associazione a DAAs con un'elevata barriera genetica alla resistenza e un'attività antivirale potente ed estesa a più genotipi oppure l'uso di regimi basati su PEG-IFN alfa e Ribavirina in combinazione con due DAAs appartenenti a classi molecolari differenti (quadruplica terapia). Alcuni di questi approcci sono stati già testati in studi clinici di fase I e II e si sono dimostrati efficaci. Dati raccolti nello studio ZENITH, hanno dimostrato la netta superiorità del regime IFN/Ribavirina in associazione a Telaprevir e VX-222 (NNI) in pazienti naive con infezione da genotipo 1 rispetto all'associazione Telaprevir + VX-222 con o senza Ribavirina; stesso discorso per il regime IFN/RBV + GS-9256 (inibitore NS3-4A) e tegobuvir (NNI) rispetto all'associazione GS-9256 + Tegobuvir, con o senza Ribavirina [86].

Dai dati ottenuti negli studi clinici è stato possibile individuare dei fattori predittivi di successo dei nuovi regimi basati sui farmaci DAAs. Sicuramente pazienti in cui la terapia a base di IFN/RBV ha fallito, difficilmente riusciranno a raggiungere una SVR in seguito al ritrattamento con un regime *IFN-free*, indipendentemente dall'inclusione o meno di Ribavirina. Una buona risposta immunitaria, innata e adattativa, è poi sicuramente essenziale per assicurare una clearance totale e duratura del virus anche in presenza di varianti resistenti e anche il genotipo IL28B può rappresentare un fattore predittivo di risposta in alcuni tipi di regimi terapeutici (NNI + inibitori NS3-4A ± Ribavirina). Naturalmente, anche le caratteristiche genetiche del virus HCV sono importanti: il genotipo 1, e in particolar modo il genotipo 1a rispetto all'1b, determina delle infezioni molto più difficili da trattare rispetto a quelle sostenute dai genotipi 2 e 3 e le varianti virali (quasispecies) che si producono spontaneamente durante la replicazione di HCV assumono particolare rilievo nell'ambito della resistenza alla terapia con gli agenti antivirali di nuova generazione. Ulteriori studi sono necessari per determinare il profilo di efficacia e di sicurezza a lungo termine di tali regimi *IFN-free* e soprattutto per individuare il regime più efficace anche rispetto ad una stratificazione dei pazienti per genotipo-sottotipo virale, genotipo IL28B e *status* terapeutico (*naive-relapse-non responder*) [89].

Tab. 1.25: riassunto degli studi clinici che esaminano regimi *IFN-free* [86].

DAA combination	Study name	Patient population	Major endpoints
Nucleoside NS5B inhibitor ± ribavirin			
GS-7977 + ribavirin	Electron [51, 52], Quantum [50]	Treatment-naïve and experienced HCV Gt1-6	SVR (11-88% in HCV genotype 1 patients, dependent on previous treatment outcome, HCV subtype, <i>IL28B</i> genotype; 80-100% in HCV genotype 2/3 patients, dependent on previous treatment outcome)
GS-7977 monotherapy	Electron [51]	Treatment-naïve HCV Gt2,3	SVR (60%)
Nucleoside NS5B inhibitor + NS3-4A inhibitor ± ribavirin			
Mericitabine + danoprevir	Inform-1 [49]	Treatment-naïve HCV Gt1	HCV RNA decline at week 2 (5.2 log ₁₀)
Mericitabine + danoprevir/ritonavir ± ribavirin	Inform-SVR [30]	Treatment-naïve HCV Gt1	SVR (26% in HCV Gt1a, 71% in HCV Gt1b; significantly lower without ribavirin)
Nucleoside NS5B inhibitor + NS5A inhibitor ± ribavirin			
GS-7977 + daclatasvir ± ribavirin	AI-444040 [60]	Treatment-naïve HCV Gt1,2,3	SVR (100% and 91% in HCV genotype 1 and 2/3 patients, respectively)
Non-nucleoside NS5B inhibitor + NS3-4A inhibitor ± ribavirin			
BI-207127 + BI-201335 + ribavirin	SOUND-C1 [53]	Treatment-naïve HCV Gt1	RVR (73-100%, depending on dosage of BI-207127)
BI-207127 + BI-201335 ± ribavirin	SOUND-C2 [54]	Treatment-naïve HCV Gt1, including 10% of patients with compensated liver cirrhosis	SVR (56-68% + ribavirin, 39% - ribavirin; HCV Gt 1b and good-response <i>IL28B</i> genotype were additional predictors of SVR)
Tegobuvir + GS-9256 ± ribavirin	n.a. [55]	Treatment-naïve HCV Gt1	RVR (37% + ribavirin, 7% - ribavirin)*
ABT-333 + ABT-450/ritonavir + ribavirin	CO-PILOT [57]	HCV Gt1, treatment-naïve and non-responders	SVR (93% and 47% in treatment-naïve and non-responders, respectively)
ABT-072 + ABT-450/ritonavir + ribavirin	PILOT [58]	Treatment-naïve HCV Gt1 with good-response <i>IL28B</i> genotype	SVR (91% at week 24, a late relapse was observed at week 36)
VX-222 + telaprevir ± ribavirin	ZENITH [56]	Treatment-naïve HCV Gt1	SVR**
NS3-4A inhibitor + NS5A inhibitor ± ribavirin			
Asunaprevir + daclatasvir	AI447011 [6]	HCV Gt1 null responders	SVR (36%, relapse only in HCV genotype 1a but not 1b patients)*
Asunaprevir + daclatasvir	AI447017 [7]	HCV Gt1b null responders	SVR (100%)
Asunaprevir + daclatasvir	AI447017 [59]	HCV Gt1b, null responders and patients intolerant/ineligible to IFN	SVR (91% and 64% in null responders and intolerant/ineligible patients, respectively. This result highlights the importance of adherence to IFN-free regimens).
Multiple DAA agent combinations			
NS5A-inhibitor (GS-5885) + NS3-4A inhibitor (GS-9451) + NNI (tegobuvir) + ribavirin	QUAD [61]	Treatment-naïve HCV Gt1	SVR (77% and 89% in HCV genotype 1a and 1b, respectively; approx. 30% of patients required IFN-based rescue therapy due to failure of HCV RNA <LOD at week 2)
Cyclophilin-inhibitor ± ribavirin			
Alisporivir ± ribavirin	VITAL-1 [62]		SVR (approx. 90% of patients eligible for all-oral therapy, 29-42% of all patients, remaining patients received additional PegIFN-α).

*These studies include quadruple therapies resulting in 100% SVR [6] and 100% RVR [55], respectively.

**SVR rates for all-oral arms have not yet been presented for this study. Quadruple-therapy arms in ZENITH resulted in high SVR rates.

1.9.6. FATTORI PREDITTIVI PRETRATTAMENTO

Visti e considerati la significativa tossicità e i costi della terapia antivirale, si è sviluppato un notevole interesse nell'identificazione di fattori prognostici in grado di predire l'esito della terapia. I fattori predittivi finora individuati risultano collegati sia al virus che all'ospite.

GENOTIPO VIRALE

Il genotipo virale è uno dei principali fattori in grado di influenzare il successo terapeutico. Il genotipo virale è uno dei più forti predittori di SVR: il tasso di risposta virologica sostenuta in pazienti infettati dal genotipo 2 e 3 del virus HCV e trattati per 24 settimane con terapia standard (Peg-IFN-alfa + RBV) si attesta attorno all'80% in confronto a circa il 40% osservato in pazienti infettati da genotipo 1 e 4 e trattati per 48 settimane con duplice terapia [90]. Anche il sottotipo virale, in particolare la distinzione tra 1a e 1b, è importante per la corretta gestione del paziente soprattutto per regimi terapeutici basati su triplice terapia con Peg-IFN/RBV/BOC o TLV. Pazienti con HCV genotipo 1a hanno un rischio maggiore di sviluppare resistenza alla terapia con inibitori delle proteasi (PI) rispetto a pazienti con HCV genotipo 1b; la mutazione associata più frequentemente alla resistenza, infatti, è una sostituzione aminoacidica in posizione 155 (R155K) della proteina NS3 e nel caso di HCV GT1a, è sufficiente la sostituzione di un singolo nucleotide per sviluppare resistenza, mentre nel caso di HCV GT1 sono necessarie due sostituzioni [91].

CINETICA VIRALE

La cinetica virale durante la terapia rappresenta un parametro importante per monitorare la risposta alla terapia nel tempo; il declino dell' HCV-RNA è sicuramente uno dei predittori più fortemente associati alla risposta terapeutica. La rilevazione dell'HCV-RNA viene effettuata all'inizio della terapia per misurare la carica virale al basale, alla 4^a e alla 12^a settimana di trattamento per valutare la risposta iniziale alla terapia (RVR ed EVR/cEVR), a fine trattamento (24 o 48 settimane a seconda del genotipo virale) per stabilire la EOTR o ETR (*End-Of-Treatment Response*, titolo virale non rilevabile alla fine del trattamento di 24 o 48 settimane) e dopo 6 mesi dal termine della terapia per definire la SVR (*Sustained Virological Response*). La presenza di RVR correla positivamente con l'SVR; diversi studi hanno dimostrato che in pazienti con genotipo 1/4, trattamento naive, il raggiungimento dell'RVR si associava a un tasso di SVR di circa il 78-100% dopo sole 24 settimane di trattamento con PEG-IFN/RBV [92]. Purtroppo in caso di infezione da genotipo 1, solo il 20% dei pazienti presenta una RVR, mentre nei pazienti infetti da HCV genotipo 2/3 la percentuale sale al 60%. Dall'altro lato l'assenza di EVR è altamente predittiva di fallimento terapeutico: circa il 99% dei pazienti che non raggiungono tale risultato di norma non raggiungono nemmeno la SVR. L'elevato valore predittivo dell'EVR viene considerato pertanto nella scelta di interruzione della terapia (*futility rules*) [75][93].

CONCENTRAZIONE HCV-RNA

Anche la concentrazione basale dell'HCV-RNA è associata all'*outcome* terapeutico: una concentrazione dell'HCV-RNA inferiore a 600,000-800,000 IU/ml correla positivamente con l'SVR [90].

VARIABILITÀ GENOMICA VIRALE

L'ampia variabilità genomica dell'RNA virale, infine, costituisce un parametro ambivalente rispetto alla risposta al trattamento: singole mutazioni in posizioni differenti possono diminuire la fitness del virus facilitandone l'eradicazione oppure determinare una resistenza alla terapia antivirale e di conseguenza influire negativamente sull'*outcome* terapeutico.

I principali determinanti genetici virali della risposta alla terapia si localizzano nelle sequenze codificanti per la proteina NS5A e per il core di HCV. Mutazioni non sinonime nella regione che codifica per l'ISDR (*IFN Sensitivity Determining Region*) sono strettamente associate al successo della terapia standard; solo un piccolo numero di mutazioni sono correlate al fallimento terapeutico [94]. Si ipotizza che le varianti funzionali reprimano l'attività della proteina NS5A, inibendo la sua capacità di bloccare l'espressione dei geni indotti dall'Interferone. Numerosi studi riportano poi che sostituzioni aminoacidiche nelle posizioni 70 (R70Q o R70H) e 91 (L91M) del core proteico di HCV sono associate al fallimento del trattamento combinato: la resistenza al trattamento è conferita in particolare, da residui di glutamina o istidina in posizione 70 e da residui di metionina a livello dell'aminoacido 91.

Evidenze recenti riportano una correlazione anche tra la proteina dell'envelope E2 e il fallimento terapeutico; E2, infatti, contiene una regione ipervariabile chiamata HVR1 caratterizzata da un alto tasso di mutazione. Virioni mutanti sarebbero in grado di sfuggire ai meccanismi dell'immunità così come all'azione di anticorpi neutralizzanti determinando nell'ospite uno stato di viremia costante [95].

IL28B

Diversi studi multicentrici, condotti su individui infetti da epatite C cronica da genotipo 1, di diversa estrazione etnica (caucasici, ispanici, africani-americani, latino americani e asiatici) hanno portato ad individuare una associazione significativa tra due polimorfismi a monte del gene IL28B (rs12979860 [C/T] 3kb upstream e rs8099917 [T/G] 8kb upstream) e il tasso di SVR.

E' stato osservato che individui rs12979860-CC mostrano una più elevata probabilità di eradicare il virus rispetto a portatori dei genotipi CT o TT, nel caso di infezione acuta, e un tasso di SVR di circa 3 volte maggiore di quello osservato in pazienti CT o TT, nel caso di epatite C cronica. Un discorso analogo è valido anche per lo SNP rs8099917: il genotipo rs8099917-TT si riscontra più frequentemente nei pazienti che raggiungono l'SVR, mentre individui rs8099917-TG o GG presentano un rischio di circa due volte maggiore di non rispondere alla terapia [87]. Recentemente, inoltre, il valore predittivo negativo dello SNP rs12979860 ma non di rs8099917, è stato confermato anche in pazienti con epatite C da genotipo 2 e 3 che raggiungono l'RVR. [96].

FATTORI CLINICI

Alcuni parametri demografici e clinici sono correlati positivamente alla probabilità di rispondere efficacemente alla terapia e di raggiungere l'ETR, la RVR e la SVR; un elenco comprende: il sesso femminile, l'età (<40 anni), l'assenza di steatosi, fibrosi (3-4 stage), cirrosi epatica e insulino-resistenza, valori bassi di BMI e di peso corporeo e infine l'etnia (caucasici e asiatici rispondono con più successo alla terapia degli africani o degli afro-americani).

Naturalmente, l'infezione da HCV in presenza di un quadro clinico compromesso (diabete, obesità, abuso di alcol, steatosi, insufficienza renale e coinfezioni virali) si associa ad una maggior probabilità di fallimento terapeutico [67].

COMPLIANCE

La compliance del paziente, infine, è di fondamentale importanza per assicurare l'efficacia della terapia. Nel caso in cui la mancata aderenza al regime terapeutico dipendesse da intolleranza ai principi attivi è sempre opportuno somministrare una dose il più vicino possibile alla dose standard e/o eventualmente affiancare alla terapia standard una terapia di supporto per ridurre il rischio di effetti collaterali gravi.

Tab. 1.26: fattori correlati alla SVR in combinazione alla terapia con Peg-Interferone e Ribavirina in pazienti con epatite C. L'*outcome* terapeutico è influenzato sia da fattori virali (genotipo virale e sostituzioni aminoacidiche nella regione ISDR e nel core proteico in posizione 70 e 91) che da fattori clinici e genetici legati all'ospite (polimorfismi nel gene IL28B) [44].

Host <i>IL28B</i> genotype (rs12979860)		
T/T	C/T	C/C
<i>Other important pretreatment factors</i>		
Genotype 1	Viral genotype	Genotypes 2 and 3
>600,000	Viral load (IU/ml)	<600,000
African American (AA)	Race	Non-AA
F3 and F4	Fibrosis (METAVIR grade)	F0 and F1
Male	Gender	Female
>40	Age (years)	<40
Less likely to respond	←—————→	More likely to respond

Nel caso della triplice terapia con Peg-IFN/RBV/BOC-TLV molti predittori perdono di significato in virtù del maggiore potere antivirale dei farmaci di nuova generazione; evidenze derivate dallo studio IDEAL hanno indicato l'eRVR come un parametro predittivo di SVR ed attualmente l'eRVR (HCV-RNA non rilevabile alla settimana 4 e mantenimento della negativizzazione virale fino alla settimana 12) viene utilizzata per personalizzare la triplice terapia sulla base del principio: "*Response-guided Therapy*"; la definizione di "*stopping rules*" che tengono conto della cinetica virale precoce, infatti, permette di ridurre la durata della terapia in un 45%-60% di pazienti e di evitare di esporre gli stessi a terapie inutili nonché a un rischio maggiore di eventi avversi.

La conoscenza dei parametri individuali associati alla risposta terapeutica prima di iniziare il trattamento è quindi importante in quanto offre la possibilità di predire l'efficacia della terapia (SVR, eradicazione del virus) e di conseguenza consente di indirizzare il clinico verso il regime terapeutico più adatto per il paziente. E' stato riportato, infatti, che la personalizzazione della terapia in termini di tipologia (SOC Vs. triplice terapia) durata, dosaggio può incrementare notevolmente il tasso di SVR rispetto a quanto si otterrebbe seguendo linee guida standard e ridurre i costi di gestione clinica dei pazienti con CHC di circa il 20% [75].

1.10. GENETICA DELL'OSPITE NELL'INFEZIONE DA HCV

1.10.1. GENE IL28B

IL28B è un gene di 6 esoni che mappa nel cromosoma 19 in posizione 19q13 dove forma con i geni *IL28A* e *IL29* un cluster genico. I tre geni codificano per tre diversi tipi di citochine, strutturalmente e funzionalmente correlate, classificate sulla base della loro funzione come IFN di tipo III o IFN- λ s. Il gene *IL28A* codifica per la citochina IFN- λ 1, *IL29* codifica per IFN- λ 2 e il gene *IL28B* codifica per una citochina funzionalmente correlata agli IFN di tipo I e strutturalmente omologa all'IL-10, chiamata IFN- λ 3 [97].

1.10.1.1. TIPI DI INTERFERONE

A partire dal 1957, anno in cui Isaac e Lindenmann scoprirono l'Interferone, enormi progressi sono stati compiuti nell'ambito sia della conoscenza delle funzioni dell'Interferone sia nella caratterizzazione delle diverse specie di Interferone prodotte dalle cellule umane. Gli Interferoni attualmente noti, vengono classificati in tre gruppi distinti, il tipo I, II e III, sulla base della sequenza aminoacidica. Tra i mammiferi, gli Interferoni di tipo I comprendono un totale di 8 sottoclassi, di cui 5 sono caratteristiche del genere umano: l'IFN- α (di cui esistono 13 sottotipi), l'IFN- β , l'IFN- ϵ , l'IFN- κ e l'IFN- ω . Gli IFN di tipo II comprendono un solo sottotipo, l'IFN- γ , codificato da un gene che mappa nel cromosoma 12. La scoperta degli IFN di tipo III è avvenuta in tempi relativamente recenti grazie ad analisi computazionali di predizione genica. I geni che codificano per gli IFN- λ s infatti, presentano una struttura genica simile (5 esoni per *IL29* e 6 esoni per *IL28A* e *IL28B*) e a livello aminoacidico un'omologia di sequenza maggiore all'80% (96% per IFN- λ 1 e - λ 3 e dell'81% per IFN- λ 1 con IFN- λ 2) che si riflette in notevoli analogie sia strutturali che funzionali [98]. Recentemente Ray e colleghi hanno scoperto una nuova variante interferonica, la proteina IFNL4, codificata da un gene a monte di *IL28B*. Le analogie strutturali e i dati preliminari ottenuti da esperimenti *in vitro* fanno supporre un meccanismo d'azione comparabile a quello di IFN- λ 3, tuttavia ulteriori studi sono necessari per chiarirne la funzione e il meccanismo molecolare *in vivo* [99][100].

1.10.1.2. MECCANISMO DI AZIONE DEGLI INTERFERONI

Gli interferoni sono proteine solubili appartenenti alla famiglia delle citochine, prodotte da un ampio spettro di cellule, che inducono una resistenza antivirale in molti stipiti cellulari in relazione ad un'ampia varietà di virus. In realtà gli interferoni presentano uno spettro estremamente eterogeneo e ampio di azioni tra cui spiccano l'attività antivirale, l'attività antiproliferativa e citomodificatrice e l'attività immunomodulatrice.

L'attività antivirale si esplica attraverso l'inibizione della sintesi proteica necessaria alla replicazione virale, la modificazione della membrana cellulare in modo da inibire la fusione virale e infine l'attivazione del sistema immunitario incrementando l'attività macrofagica (aumentata espressione di recettori Fc), stimolando l'attività citotossica delle cellule NK (*natural killer*) e dei linfociti T citotossici (aumento dei recettori di superficie per TNF- α e IL-2), regolando l'attività dei

linfociti B e aumentando l'espressione di molecole del complesso MHC di classe I sulla superficie cellulare in modo da promuovere la presentazione antigenica [101].

Gli effetti antivirali degli Interferoni dipendono dall'espressione dei geni ISGs (*IFN-stimulated genes*) mediata dall'attivazione del *pathway* Jak-STAT (*Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) in seguito al legame degli IFN con i rispettivi recettori di superficie cellulare. I partner recettoriali differiscono considerando famiglie di IFN diverse (I, II, III). Gli IFN di tipo I α e β riconoscono rispettivamente il recettore IFN di tipo I che è un eterodimero transmembrana formato dalle subunità IFNAR1 e IFNAR2. L'IFN- γ lega invece il recettore omodimerico IFNGR1/2, mentre gli IFN- λ interagiscono con il recettore eterodimerico formato dalle catene IL10R β e IL28R α . Una volta legato il proprio recettore IFNR (*IFN cell-surface-receptor*), ne determinano la dimerizzazione e l'attivazione delle tirosin-chinasi Jak1 (*Janus-activated kinase 1*) e Tyk2 (*Tyrosine kinase 2*) associate al recettore stesso. Le chinasi fosforilano e attivano i trasduttori del segnale STAT1 e STAT2; il complesso STAT1/2 lega IRF-9 (*IFN-regulatory factor 9*) formando il complesso ISGF3 che, una volta traslocato nel nucleo, riconosce e lega gli ISRE o *IFN-stimulated response elements*, sequenze specifiche nel promotore dei geni ISGs, determinandone la trascrizione. (Fig. 1.22).

Le proteine ISG stabiliscono non solo uno stato generale antivirale, ma anche intervengono in altri processi come l'apoptosi, la risposta infiammatoria e il metabolismo lipidico; un esempio di proteina ISGs è l'enzima PKR (*Protein Kinase R*) che blocca la sintesi delle proteine virali inibendo il fattore eucariotico di inizio della traduzione eIF2 [84][102].

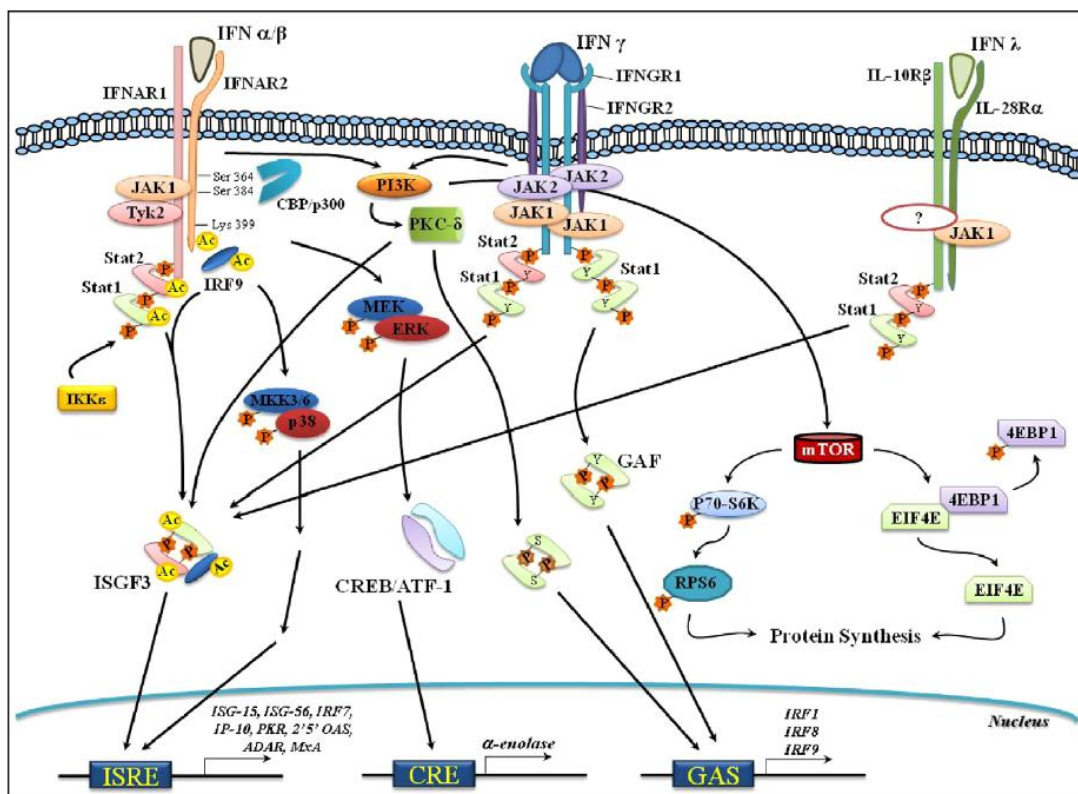


Fig. 1.22: Espressione dei geni stimolati dall'IFN attraverso il pathway JAK/STAT [102].

1.10.1.3. INTERFERONI di TIPO III

La relazione esistente tra alcuni polimorfismi posti a monte del gene IL28B e la probabilità di eradicare il virus HCV spontaneamente o in seguito al trattamento, ha portato i ricercatori a indagare meglio il ruolo degli IFN- λ s o IFN tipo III.

FUNZIONI DEGLI INTERFERONI DI TIPO III

E' stato osservato che l'attività biologica degli IFN- λ s è parzialmente sovrapponibile a quella degli IFN- α e IFN- β e include un'attività antivirale, una antitumorale (antiproliferatrice) e un'azione immunomodulatrice.

Diversi studi supportano un ruolo diretto di IFN- λ nel controllo della replicazione di HCV attraverso la stimolazione dell'immunità adattativa (aumento dell'espressione di molecole MHC I, stimolazione dell'attività citotossica delle cellule NK e CTL) e l'induzione della trascrizione di geni ISGs come le proteine OAS, la GTPasi MxA e la proteina chinasi R (PKR).

Le proteine OAS (2'-5' oligoadenylate-synthetase) si attivano in presenza di dsRNA virali formando dei tetrameri che attivano le RNasi L, enzimi deputati al taglio degli RNA virali. La proteina PKR viene anch'essa attivata da dsRNA e gioca un ruolo chiave nell'inibizione della sintesi proteica cellulare e quindi virale. MxA è presente nel citoplasma a livello del reticolo endoplasmatico dove forma degli oligomeri che intrappolando sia particelle che componenti virali, ostacolano così la replicazione e la trascrizione virale. Da studi in vitro su epatociti umani è emerso, inoltre, che gli effetti indotti sull'espressione delle ISGs dagli IFN- λ s sono più marcati e di più lunga durata rispetto a quelli indotti da IFN- α e che, inoltre, gli effetti degli IFN- λ s sinergizzano con l'azione di IFN- α garantendo un'efficace soppressione della replicazione virale [103].

ESPRESSIONE DEGLI INTERFERONI DI TIPO III

Gli IFN- λ s, come gli IFN di tipo I, vengono espressi a bassi livelli in diversi tessuti umani che comprendono il polmone, l'ovaio, il testicolo, il tessuto cerebrale, l'ipofisi, il pancreas e il sangue; in risposta a infezioni virali l'espressione degli IFN- λ s viene significativamente indotta, soprattutto nei PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*), nelle MD-DC (*Monocyte-Derived Dendritic Cells*) e nelle pDCs (*Plasmacytoid Dendritic-Cells*), in modo del tutto simile a quanto avviene per gli IFN tipo I. La trascrizione dei geni che codificano per gli IFN di tipo III, infatti, dipende dagli stessi fattori *trigger* e dai medesimi *pathways* intracellulari che determinano l'espressione degli IFN di tipo I, ossia la stimolazione dei recettori TLR3 e TLR4 nelle cellule dendritiche e nei macrofagi da parte dei loro agonisti (es. LPS, lipopolisaccaride o poly[I:C], un immunostimolante dsRNA-like).

Siren et al., ha poi dimostrato che sia l'IFN- α che l'IFN- λ sono in grado di autopotenziare la loro produzione attraverso meccanismi a feedback positivo mediati dal legame al corrispondente recettore; a differenza però del recettore per IFN α/β o di IL10R β che sono espressi ubiquitariamente, l'espressione del recettore IFN λ R1 o IL28R α è tessuto dipendente ed è confinata alle cellule epiteliali, agli epatociti e alle cellule mononucleate del sangue, pertanto l'azione dell'IFN- λ è limitata a pochi *target* cellulari [104].

Studi di Tissari et.al, inoltre, hanno permesso di individuare in cellule esposte a poly[I:C] una regolazione positiva dell'IFN- α sull'espressione di IFN- β e IFN- λ [105]. L'induzione degli IFN di tipo I sembra quindi oltre che simile anche collegata all'induzione degli IFN di tipo III e può essere presa a modello per la spiegazione del *pathway* di induzione dell'espressione dei geni *IL28A*, *IL28B* e *IL29*. La produzione degli IFN di tipo I e III è controllata soprattutto a livello trascrizionale dove

un ruolo cruciale è svolto da fattori di trascrizione chiamati IRFs (*Interferon Regulatory Factors*). La famiglia degli IRFs comprende 9 membri, di cui 4 (in primis IRF3 e IRF7 e poi IRF1 e IRF5) agiscono come regolatori positivi della trascrizione. IRF3 è espresso in modo costitutivo ma rimane nel citosol in una forma latente; in seguito all'infezione virale e quindi all'ingresso nella cellula di componenti virali (dsRNA, ssRNA, proteine virali) IRF3 viene fosforilato a livello del dominio C-terminale, dimerizza con altre molecole di IRF3 o IRF7 (per mezzo del dominio idrofobico IAD) e l'omo/etero dimer così formato trasloca nel nucleo dove forma un complesso, con i coattivatori della trascrizione CBP o p300, che lega il promotore di geni degli IFNs (soprattutto IFN- β e IL29), di citochine e chemochine inducendo un cambiamento locale della cromatina e promuovendone la trascrizione. IRF7 è espresso a livelli basali bassi e la sua espressione è indotta dall'Interferone stesso in un meccanismo a *feedback* positivo che amplifica la trascrizione dei geni per gli IFNs. Come descritto per IRF3, IRF7 si attiva per fosforilazione di residui di serina posti nel dominio C-terminale formando omodimeri o eterodimeri con IRF3 che traslocano nel nucleo, inducendo la trascrizione di geni della risposta infiammatoria (IFN- α/β , IL28A/B, IL29, citochine e chemochine). Sia nel caso di IRF3 che di IRF7, la piccola quantità di IFNs prodotti, viene secreta e va a stimolare il recettore per gli IFNs (IFNAR1/IFNAR2 o IL28R α /IL10R β) sia con meccanismi autocrini che paracrini determinando l'attivazione di un fattore di trascrizione etero-trimerico (ISGF3) formato da IRF9, STAT1 e STAT2 che promuove l'ulteriore trascrizione del gene per IRF7. IRF3 e IRF7 agiscono quindi con tempistiche differenti; IRF3 è responsabile principalmente dell'induzione iniziale di IFN- β e IFN- λ e in misura minore di IFN- α , mentre IRF7 entra in gioco in una fase tardiva e induce in modo egualmente efficiente l'espressione di *IFN-I* e *IFN-III* (*two-steps model*).

La trascrizione dei geni che codificano per gli IFN di tipo III è guidata dalla presenza di sequenze regolatrici chiamate PRD (*positive regulatory elements*) a livello delle quali IRFs, NF- κ B (*nuclear factor κ B*), AP-1 (eterodimero tra c-JUN e ATF2) e HMG-I formano il cosiddetto "*enhanceosoma*". Quest'ultimo recluta le proteine HATs (*Histone Acetyl Transferases*) GCN5 e CBP che, acetilando residui di lisina negli istoni H3 e H4, rimodellano la cromatina e promuovono il reclutamento di un complesso di modificazione del nucleosoma: (BRG)-Brahma (BMR)-associated factor (BAF) complex che forza l'apertura del nucleosoma al sito di inizio della trascrizione e il legame del fattore di trascrizione TFIID al promotore.

Il legame degli IRFs alle sequenze PRD è mediato dalla presenza nel dominio N-terminale di un motivo a doppia alfa-elica che riconosce e lega specifiche sequenze *consensus*; il legame induce una distorsione del DNA che favorisce il legame cooperativo di altri IRFs. E' possibile che gli IRFs interagiscano in modo cooperativo anche con altri fattori di trascrizione (come AP-1 o NF- κ B) contribuendo così a un'attivazione efficiente della trascrizione dei geni per gli Interferoni. Dall'altro lato, l'over-espressione degli IFNs, che potrebbe essere dannosa per l'ospite, è garantita dalla breve emivita degli IRFs (30-60 min per IRF7) [106].

1.10.1.4. STUDI DI CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Studi GWAS (*Genome-Wide Association Studies*) hanno identificato delle varianti genetiche dell'ospite che risultano predittive sia della clearance spontanea del virus HCV che della risposta al trattamento combinato Peg-IFN alfa e Ribavirina. Due polimorfismi localizzati nel cromosoma 19 in una regione a monte del gene *IL28B*, identificano queste varianti e sono associati ad una riduzione del tasso di guarigione (SVR) di circa il 50%. Inoltre, le differenze osservate nel *rate* di

SVR raggiunto in pazienti caucasici, africani americani e asiatici con epatite C cronica correlano con le frequenze alleliche di tali varianti nelle diverse etnie [107]. Ne consegue che per ciascun paziente è possibile stabilire a priori la probabilità di successo della terapia e quindi predire l'outcome terapeutico fornendo al clinico un'informazione aggiuntiva per valutare meglio il rapporto rischio-beneficio del trattamento rispetto al non trattamento. Pazienti con genotipo sfavorevole (rs12979860-TT), in assenza di indicazioni di danno epatico serio, potrebbero essere i candidati ottimali per una terapia con agenti antivirali di nuova generazione (DAAs) perché la loro sensibilità all'IFN è bassa; al contrario, in pazienti con genotipo sfavorevole e con una condizione clinica compromessa, che non hanno raggiunto l'RVR, sarebbe indicato interrompere il trattamento [108].

Il primo e il più ampio studio GWAS è stato eseguito sfruttando i dati dello studio IDEAL, che si proponeva di comparare due regimi di trattamento basati l'uno su Peg-IFNalfa-2b/RBV e l'altro Peg-IFN alfa-2a/RBV. L'analisi genetica è stata compiuta su un totale di 1.137 pazienti con infezione da HCV di genotipo 1 suddivisi per etnia (Caucasici, Ispanici, Africani Americani o AA) e ha portato ad individuare una correlazione significativa tra la risposta alla terapia e 7 SNPs di cui uno, l'rs12979860 C>T, fortemente associato alla SVR. Inoltre, il genotipo IL28B è risultato avere valore predittivo anche in quei pazienti che non avevano raggiunto l'RVR: i pazienti rs12979860-CC, infatti, mostravano tassi di SVR maggiori più del doppio rispetto ai non-CC. Nell'analisi condotta, sono emersi come significativi anche altri SNPs tra cui rs8099917, ma la loro associazione era legata al *linkage disequilibrium* con lo SNP rs12979860; in numerosi studi, infatti, lo SNP rs8099917 è risultato correlato all'outcome terapeutico, tuttavia in analisi multivariate l'impatto dello SNP rs12979860 è stato talmente forte da mascherare l'effetto dello SNP rs8099917 sulla SVR [109]. Il ruolo di rs12979860 è stato valutato anche da McCarthy e colleghi che ne hanno confermato il valore di forte predittore pretrattamento di risposta virologica, indipendente da altri fattori clinici basali e dal genotipo virale [110].

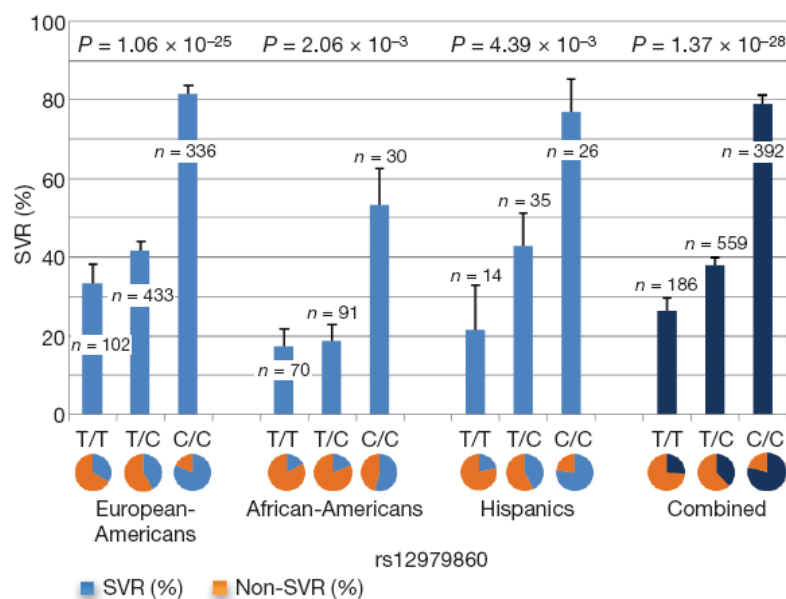


Fig. 1.23: tassi di SVR stratificati per genotipo ed etnia. I pazienti con il genotipo rs12979860-CC raggiungono tassi di SVR maggiori di due o tre volte rispetto a quelli ottenuti dai pazienti rs12979860-CT o TT, indipendentemente dall'etnia [109].

Il polimorfismo rs12979860, inoltre, mostra una distribuzione differenziale tra diversi gruppi etnici molto marcata che spiegherebbe circa la metà delle differenze inter-popolazioni osservate nel rate di SVR [109].

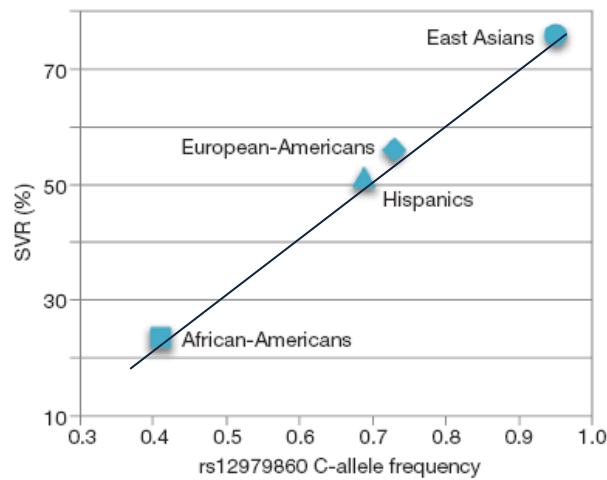


Fig. 1.24: percentuale di SVR per popolazione rispetto alla frequenza dell'allele rs12979860 C [109].



Fig. 1.25: distribuzione delle frequenze alleliche delle varianti rs12979860 C e rs12979860 T [112].

Il valore predittivo dello SNP rs12979860 si mantiene anche nel caso di pazienti in trattamento con triplice terapia (PEG-IFN, RBV, BOC o TVR). Da un'analisi post-hoc del trial PROVE-2 è emerso, infatti, che il 100% dei pazienti nel braccio di trattamento a 12 settimane, con genotipo rs12979860-CC, hanno raggiunto l'SVR suggerendo che i portatori dell'allele C rappresentano un gruppo di pazienti che potrebbero raggiungere elevati tassi di guarigione in periodi di trattamento relativamente brevi. Dal momento però che la triplice terapia è generalmente più efficace della duplice terapia, la rilevanza dello SNP rs12979860 come marker predittivo di risposta al trattamento e di efficacia del trattamento è meno significativa [111].

L'associazione dello SNP rs8099917 con la risposta alla terapia è stata valutata da Tanaka *et al* in uno studio GWAS condotto su più di 300 pazienti Giapponesi usando la piattaforma di genotipizzazione Affymetrix 6.0, che non includeva lo SNP rs12979860; il polimorfismo è risultato fortemente associato al fallimento terapeutico (riduzione inferiore a 2 log dell'HCV-RNA dopo 12 settimane di trattamento) con un rischio 2 volte maggiore per gli omozigoti G/G di non rispondere al trattamento in confronto agli eterozigoti G/T e agli omozigoti T/T [113]. Suppiah *et al.*, e Rauch *et al.*, hanno replicato i risultati ottenuti da Tanaka su una corte eterogenea di pazienti confermando lo SNP rs8099917 un forte predittore di risposta alla terapia, indipendente da altre variabili ($P < 0.0001$) [114][115].

La predittività del polimorfismo rs8099917 è stata valutata anche nel caso di triplice terapia con Peg-IFN alfa 2b/RBV e Telaprevir; 94 pazienti giapponesi con infezione da HCV genotipo 1, sia trattamento naive che precedentemente già trattati, sono stati genotipizzati per lo SNP e i dati raccolti hanno permesso di confermare l'associazione tra il genotipo rs8099917-TT e la probabilità di raggiungimento dell'SVR (Fig. 1.26) [89]. Da un'analisi multivariata è emerso, inoltre, che individui rs8099917-GT/TT avevano comunque una buona probabilità di raggiungere l'SVR in presenza di sostituzioni aminoacidiche a livello della proteina core del virus (Arg70) (50% Vs. 12%, $P = 0.038$) [116].

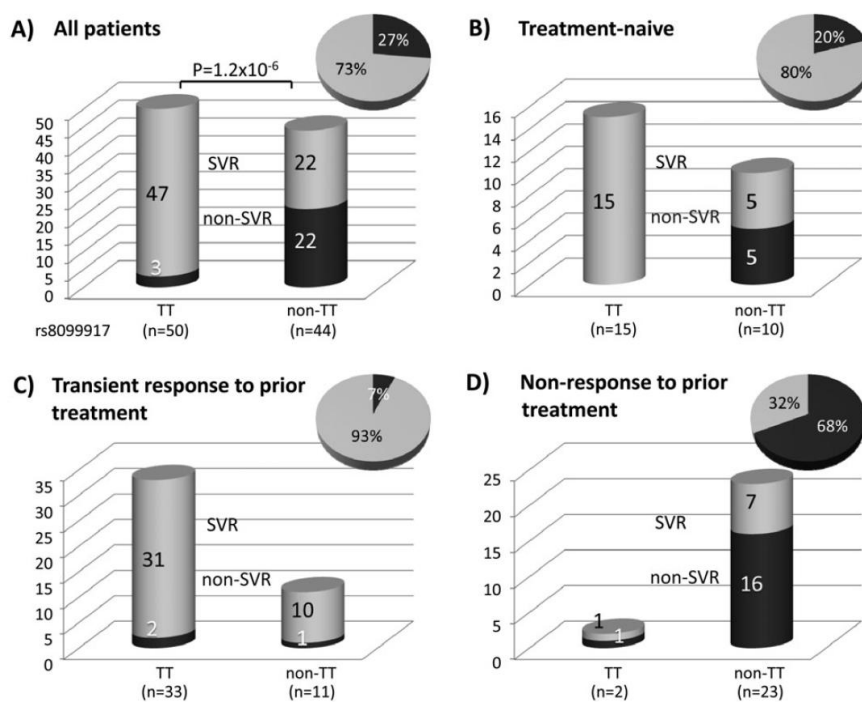


Fig. 1.26: SVR rates in pazienti in trattamento con triplice terapia, raggruppati sulla base della risposta ad un eventuale precedentemente trattamento e stratificati sulla base del genotipo a livello del polimorfismo rs8099917 nel gene IL28B.

Gran parte degli studi effettuati per confermare il valore predittivo dei polimorfismi nel gene IL28B sono stati condotti in pazienti con infezioni da HCV GT1; ulteriori dati stanno tuttavia emergendo riguardo la rilevanza dei medesimi polimorfismi in pazienti con infezione da HCV di tipo 2 o 3. Lo SNP rs12979860, ma non lo SNP rs8099917, correla significativamente con la SVR in seguito a trattamento combinato di Peg-IFN/RBV. Naturalmente, dal momento che il trattamento

è generalmente più efficace verso i genotipi 2 e 3, in questi casi la capacità dei polimorfismi del gene IL28B di predire l'efficacia della terapia è ridotta (tasso di SVR ≈90% per il genotipo rs12979860-CC Vs. ≈70% per i genotipi rs12979860-TT); valutando però la percentuale di non risposta, i dati sono più consistenti: ben l'85% dei pazienti che non hanno raggiunto l'SVR erano rs12979860-CT o -TT rispetto al 47,5% dei pazienti con genotipo rs12979860-CC [96]. Inoltre, la capacità predittiva del polimorfismo rs12979860 è maggiore nei pazienti che non raggiungono l'RVR; esiste quindi una correlazione significativa tra il genotipo rs12979860-CC e la probabilità di raggiungere l'SVR in pazienti con HCV GT 2/3 che non eradicano il virus entro le prime 4 settimane di trattamento (SVR rates in non RVR: CC, 87%; CT, 67%; and TT, 29%; P = .0002 Vs. SVR rates in RVR: CC, 82%; CT, 75% e TT, 58% P = 0.0046) [117].

Per quanto riguarda la *clearance* spontanea del virus, è stata valutata la relazione tra il polimorfismo rs12979860 e la capacità di eradicare il virus in uno studio condotto da Thomas e colleghi su 1.008 individui già precedentemente arruolati in altri studi clinici. I risultati ottenuti hanno permesso di dimostrare che i portatori del genotipo rs12979860-CC avevano una probabilità tre volte maggiore di guarigione spontanea dall'infezione di fase acuta rispetto ai non-CC (rs12979860-CC Vs. CT + TT, OR 0.33 p < 10⁻¹²). L'allele rs12979860 C correla quindi significativamente con la *clearance* spontanea del virus e questo trova riscontro anche nella sua frequenza allelica che è più alta in coloro che eradicano spontaneamente il virus rispetto a coloro che cronicizzano, anche considerando gruppi etnici differenti (80.3% vs. 66.7% in bianchi, p = 7×10⁻⁸; 56.2% vs. 37% in neri, p = 1×10⁻⁵) [118].

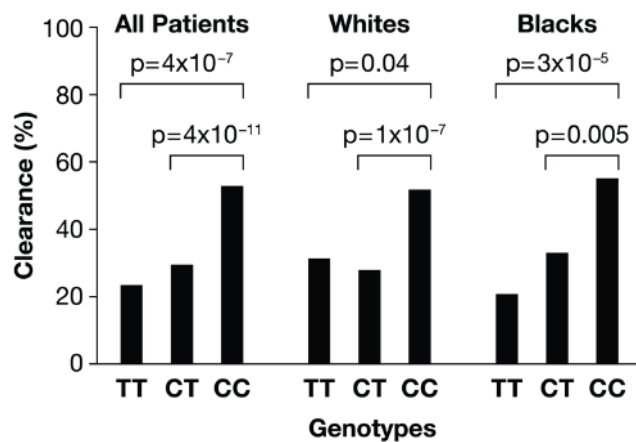


Fig. 1.27: tassi di *clearance* spontanea del virus HCV suddivisi per etnia e totali, rispetto al genotipo rs12979860.

Anche la cinetica virale sembra essere influenzata dal genotipo IL28B. Thompson e colleghi hanno confrontato i dati della cinetica virale in individui con genotipo rs12979860-CC, -CT e -TT dopo due settimane dall'inizio della terapia con PEG-IFN α e RBV individuando una correlazione tra il genotipo rs12919860-CC e i livelli di HCV RNA nel siero; indipendentemente dall'etnia, i pazienti CC mostravano un'elevata riduzione dei livelli di RNA virale nel siero che si rifletteva in più alti tassi di RVR ed EVR rispetto a quelli osservabili in pazienti con genotipo rs12979860-CT o -TT (Fig. 1.28) [119]. La caduta dei livelli di RNA virale è evidente soprattutto nelle prime 24-48 ore dall'inizio del trattamento ed è caratterizzata da un declino della carica virale rapido e dose dipendente che riflette l'inibizione della replicazione virale; in seguito a questa prima fase segue

una seconda fase (7-28 giorni) di declino esponenziale dei livelli di RNA virale meno accentuato che rappresenta l'eliminazione delle cellule infettate (Fig. 1.29) [108].

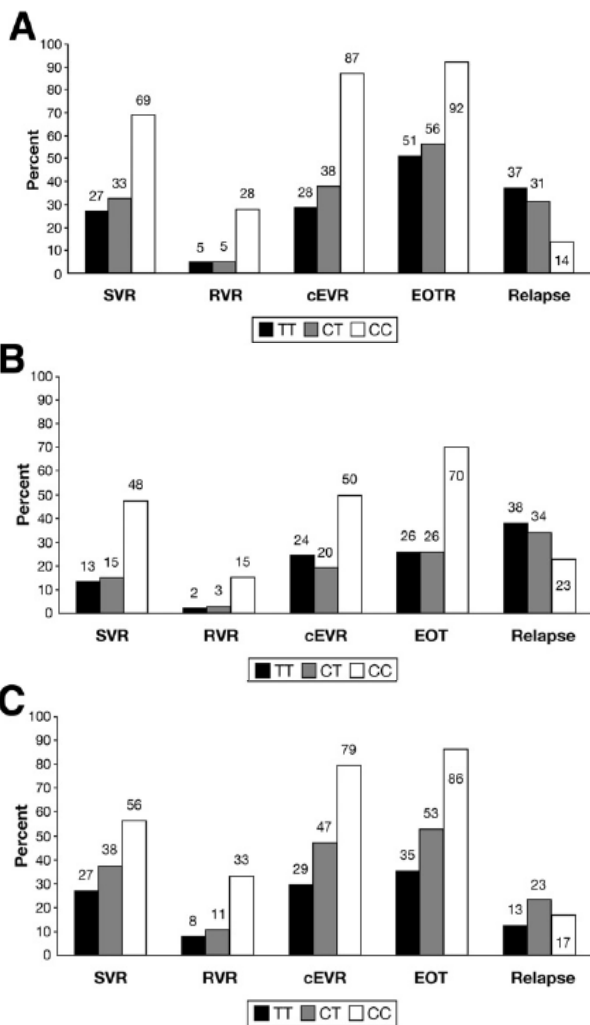


Fig. 1.28: andamento della cinetica virale in risposta al trattamento con PEG-IFN e RBV sulla base del genotipo *IL28B* rs12979860 in diverse etnie (A) Caucasici, (B) African American, (C) Ispanici. EOTR, *End-Of-Treatment Response* dopo 48 settimane di terapia.

Il genotipo rs12979860-CC rappresenta il più potente predittore di RVR, EVR, ETR e SVR in pazienti con epatite C cronica da HCV GT1 trattati con PEG-IFN/RBV. I pazienti rs12979860-CC mostrano tassi di RVR, cEVR e SVR maggiori di quelli riscontrabili in pazienti con genotipo rs12979860-non CC indipendentemente dall'etnia; in generale, quindi, il genotipo rs12979860-CC è associato a più alti tassi di risposta al trattamento a 4, 12 e 48 settimane (da 2 a 3 volte maggiori).

Stratificando i pazienti sulla base dell'RVR, che rappresenta il più importante predittore di SVR, nei pazienti che raggiungono l'RVR, i tassi di SVR sono elevati indipendentemente dallo SNP, invece nei pazienti che non raggiungono l'RVR i tassi di SVR sono maggiori nei pazienti CC *IL28B* (es. Caucasici non-RVR:SVR = 66% for CC vs 31% for CT vs 24% for TT; $P < .0001$). La variante rs12979860-C si associa, quindi, ad un maggiore tasso di RVR che generalmente prelude al raggiungimento della SVR e ad un aumento di circa 2 volte nel *rate* di SVR in circa l'80% dei pazienti C/C che non mostrano l'RVR. L'effetto del polimorfismo si mantiene in tutte le etnie sebbene la diversa distribuzione dell'allele C contribuisca in modo sostanziale alle differenze inter-etnia nel tasso di risposta alla terapia.

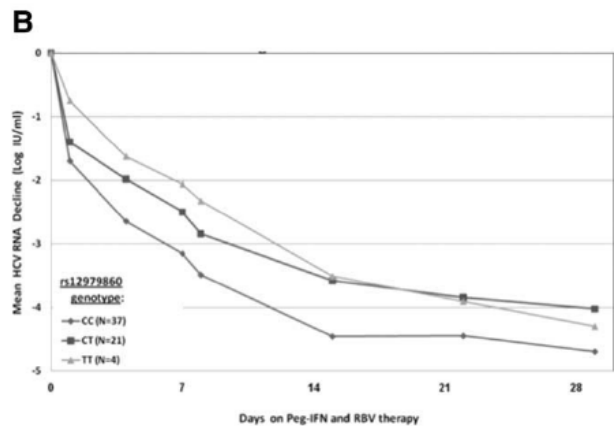
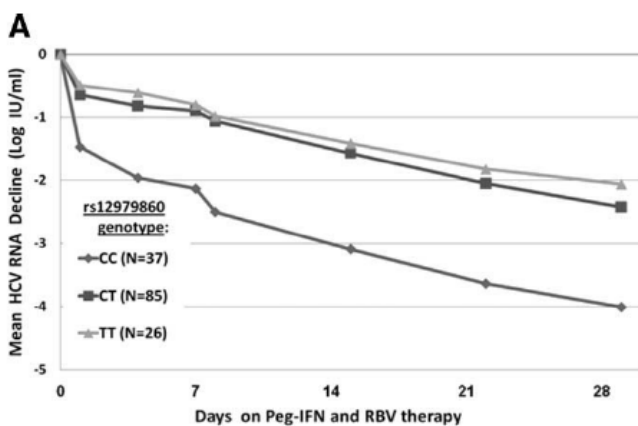


Fig. 1.29: cinetica della soppressione virale sulla base dello SNP rs12979860. Dopo l'inizio della terapia con PEG-IFN e RBV, i pazienti con genotipo CC mostrano un declino dei livelli di HCV RNA nel primo mese di trattamento maggiore di quello osservato nei pazienti con genotipo rs12979860-CT o -TT. Nei pazienti di origine caucasica, inoltre, le differenze sono più marcate nelle infezioni da HCV genotipo 1 (A) rispetto ad HCV genotipo 2 o 3 (B).

La base biologica della relazione tra i polimorfismi di *IL28B* e la risposta al trattamento antivirale non è ancora stata chiarita e soprattutto non è noto il modo in cui gli SNPs esercitino la loro influenza. E' stato ipotizzato che rs12979860 e rs8099917, essendo localizzati in una regione posta rispettivamente a 3kb e a 8kb dal gene *IL28B*, possano modulare l'espressione genica: in effetti livelli ridotti dell' IFN- λ 3 mRNA sono stati riscontrati in individui omozigoti per l'allele rs8099917-G, sia con epatite C che sani. I genotipi rs12979860-TT e rs8099917-GG si associano poi, in pazienti con epatite cronica, ad elevati livelli epatici pretrattamento delle proteine ISGs che è noto essere correlati a una parziale risposta alla terapia standard.

E' stato quindi proposto un modello secondo cui nei soggetti rs12979860-CC o rs8099917-TT, la presenza del virus provochi un'induzione forte dei geni IFN- α e IFN- λ 3 che si riflette in un'aumentata espressione delle ISGs e quindi nella *clearance* spontanea del virus. Nel caso in cui il virus riuscisse a instaurare un'infezione cronica (legata per esempio ad un'elevata carica virale, oppure a fattori sfavorevoli dell'ospite come l'età o la presenza di coinfezioni), si avrebbe un'espressione continua di IFN- α endogeno e un'attivazione downstream delle ISGs, minore però nei pazienti con genotipo rs12979860-CC e rs8099917-TT. In tal caso i livelli basali bassi delle ISGs associati ai genotipi rs12979860-CC e rs8099917-TT garantirebbero una potente attivazione del *signaling pathway* dell'IFN in seguito al trattamento; viceversa, nei soggetti portatori delle varianti alleliche "non response", l'espressione basale già elevata delle ISGs impedirebbe l'ulteriore stimolazione del sistema dell'IFN indotta dalla terapia, determinando invece l'attivazione di *pathways* inibitori della cascata del segnale innescata dall'Interferone [87].

1.10.2.GENE ITPA

ITPA (Inosine Triphosphatase Nucleoside Triphosphate Pyrophosphatase) è un gene di 8 esoni che mappa nel cromosoma 20 in posizione 20p13 e codifica per un enzima di 194 aa che catalizza l'idrolisi dell'inosina trifosfato (ITP), un nucleotide purinico non canonico e della sua forma deossi (dITP), così come della 2'-deossi-N-6-idrossi-amino-purina trifosfato (dHATP) e della xantosina 5'-trifosfato (XTP) nei rispettivi derivati nucleotidici monofosfato e difosfato. L'enzima non distingue tra la forma deossi e quella ribosio, pertanto è probabile che la sua funzione sia quella di escludere nucleotidi purinici non canonici dal *pool* di precursori nucleotidici prevenendone la loro incorporazione nell'RNA e nel DNA. Il profilo di espressione rivela un certa eterogeneità sebbene l'enzima sia particolarmente abbondante negli organi/tessuti metabolizzatori (fegato, rene, pelle, sangue) come è suggerito dal ruolo che ITPA ha nel metabolismo delle purine, dell'ATP/ITP e dei nucleotidi. [Arenas]

1.10.2.1. CORRELAZIONI GENOTIPO-FENOTIPO

Studi di popolazione hanno evidenziato che circa il 5% degli individui di una popolazione "sana" mostra un deficit di attività ITPasica a livello eritrocitario che determina un accumulo di ITP [120]. Studi GWAS hanno permesso di individuare due varianti alleliche del gene ITPA associate a una diminuita attività ITPasica: una sostituzione missenso nell'esone 2 (rs1127354, c.94C>A, P32T) e una variante di splicing (rs7270101, c.124+21A>C) nel secondo introne del gene ITPA [121]. Arenas e colleghi hanno proposto un modello in base al quale la sostituzione da citosina ad

adenina in posizione c.94, distruggendo un elemento ESS (*Exonic Splicing Silencer*) nell'esone 2, causi l'attivazione di due siti di splicing vicini e l'esclusione degli esoni 2 e 3 dall'mRNA maturo. Anche il polimorfismo rs7270101 determina alterazioni dello splicing che risultano però nell'eliminazione dell'esone 3 dall'mRNA maturo. In entrambi i casi la proteina che ne deriva è strutturalmente e funzionalmente alterata [122].

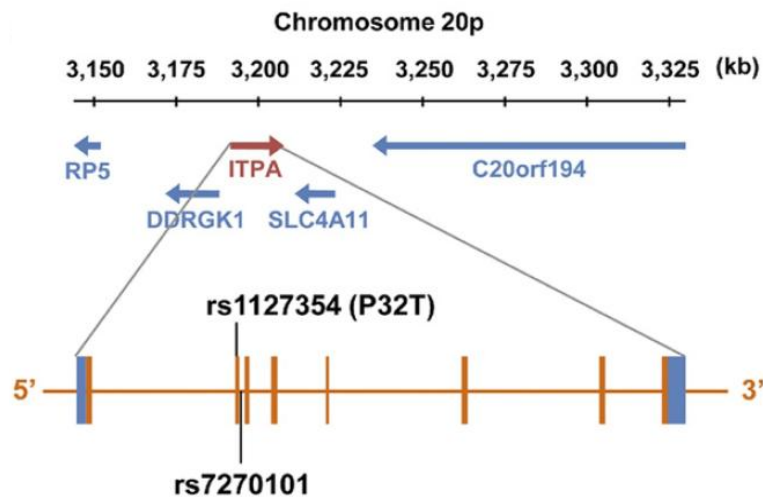


Fig. 1.30: localizzazione cromosomica del gene ITPA e dei polimorfismi rs1127354 e rs7270101.

Fellay e colleghi hanno individuato un'associazione significativa e indipendente tra i medesimi polimorfismi e la protezione dallo sviluppare un'anemia emolitica indotta da Ribavirina, in pazienti con epatite C cronica e in trattamento con duplice terapia (IFN/RBV) (Fig. 1.31) [123]. Il razionale della protezione non è del tutto noto; si ipotizza che l'eccesso di ITP determinato dalla riduzione di attività ITPasica, sia usato nella via dell'adenilsuccinato sintasi per produrre ATP, contribuendo così a ristabilire il pool di nucleotidi trifosfato nell'eritrocita; la Ribavirina, infatti, inibendo l'enzima IMPDH (*Inosina Monofosfato Deidrogenasi*), blocca la sintesi di GTP a partire da GMP e quindi compromette il bilancio energetico intra-cellulare innescando una serie di eventi che culminano nella lisi eritrocitaria (Fig. 1.32) [124][125]. Un altro modello propone che l'emolisi indotta da RBV derivi da un danno ossidativo indotto dalla forma trifosfato della Ribavirina e che l'accumulo di Inosina trifosfato riduca lo *storage* eritrocitario di fosfato libero, limitando la reazione di conversione della Ribavirina alle forme 5'-mono/di/tri-fosfato (RMP-RDP-RTP) catalizzata dall'adenosina chinasi [126]. Questi meccanismi potrebbero spiegare perchè individui omozigoti AA per lo SNP rs1127354 o omozigoti CC per lo SNP rs7270101, manifestino una minore se non assente riduzione dei valori di emoglobina (Hb) rispetto a individui rispettivamente CC-CA e AA-AC, durante il trattamento combinato IFN/RBV.

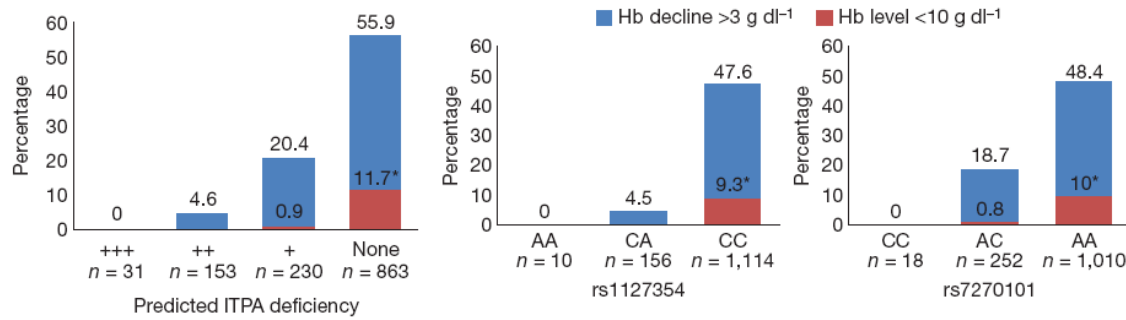


Fig. 1.31: stratificazione dei pazienti sulla base del deficit predetto di attività ITPasica; viene riportata anche la percentuale di pazienti, stratificati in accordo al genotipo dei polimorfismi rs1127354 e rs7270101, con riduzioni > 3 g/dl (blu) o con concentrazioni di Hb < 10 g/dl (rosso) alla settimana 4 di trattamento con duplice terapia [123].

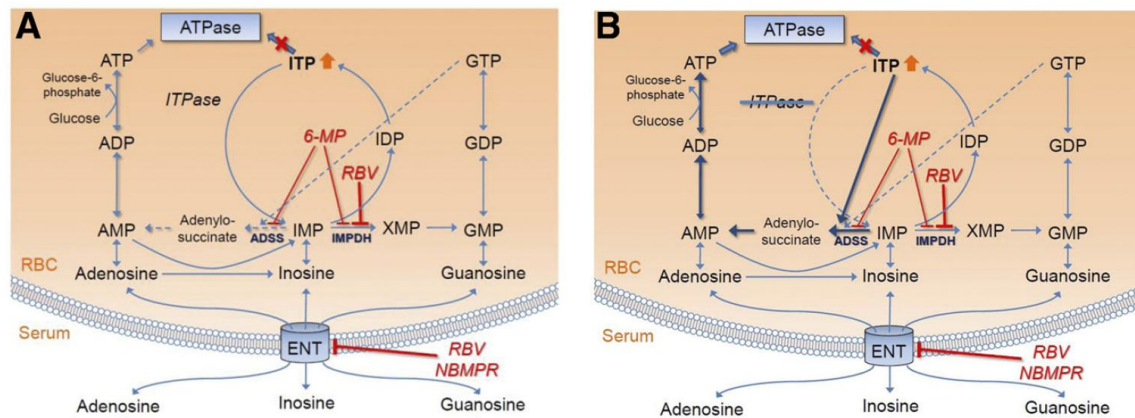


Fig. 1.32: modello che spiega la correlazione tra l'accumulo di ITP che si verifica in presenza delle varianti alleliche del gene ITPA e la protezione nei confronti dell'anemia indotta da Ribavirina. A: in presenza della forma *wild-type* dell'enzima, l'ITP non si accumula negli eritrociti che pertanto manifestano una severa riduzione dello storage di ATP indotto dalla Ribavirina. B: in presenza delle varianti funzionali dell'enzima, l'ITP si accumula negli eritrociti e viene usato dall'enzima ADSS per produrre ATP in condizioni in cui il GTP viene a mancare, per cui la riduzione di ATP indotta da RBV è mitigata. ENTs: trasportatori di adenosina, inosina e guanosina. RBV inibisce sia gli ENTs che l'enzima IMPDH (Inosina Monofosfato Deidrogenasi).

L'associazione individuata da Fellay *et. al.*, è stata valutata da Thompson e colleghi in una coorte di pazienti infetti da HCV genotipo 1 [127]. I dati ottenuti hanno permesso di confermare la predittività indipendente dei due polimorfismi per la protezione dall'anemia emolitica RBV-indotta, alla 4a settimana di trattamento ($P = 10^{-7}$ per rs7270101, $P = 10^{-6}$ per rs1127354). Inoltre, combinando i singoli polimorfismi all'interno di un'unica variabile definita "*ITPase-deficiency*", i ricercatori hanno osservato un'associazione significativa e ancora maggiore rispetto a quella ottenuta considerando i polimorfismi singolarmente, in grado di spiegare circa il 20% della variabilità nella riduzione di Hb in pazienti in corso di trattamento (Tab. 1.27).

Tab. 1.27: livello predetto di attività enzimatica dell'inosina trifosfatasi in accordo all'aplotipo definito dai polimorfismi rs1127354 e rs7270101. Non esistono aplotipi definiti dalla presenza sullo stesso cromosoma degli alleli minori per entrambi gli SNPs.

rs1127354	rs7270101	Prediction	
		ITPase Activity (%)	ITPase Deficiency
Wild type (C/C)	Wild type (A/A)	100	-
Wild type (C/C)	Heterozygosity (A/C)	60	+
Heterozygosity (C/A)	Wild type (A/A)	30	++
Wild type (C/C)	Homozygosity (C/C)	30	++
Heterozygosity (C/A)	Heterozygosity (A/C)	10	+++
Homozygosity (A/A)	Wild type (A/A)	<5	+++

Siccome l'anemia è una reazione avversa abbastanza frequente, la cui gravità richiede o l'interruzione della terapia quando l'emoglobina scende sotto ai 8,5 g/dl o scali della dose di Ribavirina che possono anche compromettere l'efficacia della terapia, nella corte di pazienti analizzata è stato valutato anche se gli aplotipi protettivi correlassero con l'*outcome* clinico (pazienti portatori dell'aplotipo protettivo mostrassero tassi di SVR maggiori); nessuna associazione tuttavia è stata riscontrata tra il tasso di RVR o SVR e l'*ITPase-deficiency*.

In conclusione l'*ITPasi-deficiency* correla con una cinetica di declino di Hb ritardata durante le prime 12 settimane di trattamento e con una riduzione assoluta di Hb minore, considerando le 48 settimane di trattamento, rispetto a quanto osservato in pazienti con attività ITPasica *wild-type* (calo HB >3g/dl: 45% *wild-type* e 2% ITPase-deficiency). Ciò si riflette anche in una maggiore probabilità di terminare il trattamento e/o di ricevere un dosaggio di RBV quanto più vicino (>80% della dose prevista) a quello stabilito in pazienti con *ITPasi deficiency* rispetto a quelli con attività ITPasica normale.

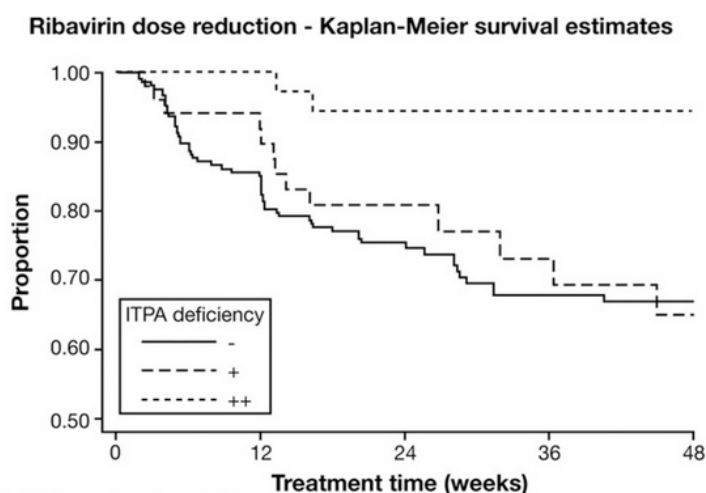


Fig. 1.33: proporzione di individui che sono andati incontro ad uno scalo di Ribavirina durante il trattamento combinato di Peg-IFN/RBV, stratificati per la variabile "ITPase-Deficiency".

Thompson e colleghi hanno poi condotto uno studio retrospettivo per investigare l'associazione tra le varianti alleliche del gene *ITPA* che causano deficienza enzimatica e l'anemia emolitica indotta dal trattamento, in una coorte di pazienti con epatite C cronica da genotipi 2-3 di HCV e in cura con Peg-IFN alfa-2b e RBV. Le varianti alleliche sono state messe in correlazione con la riduzione di emoglobina alla settimana 4 di trattamento e durante tutta la durata del trattamento (12 o 24 settimane sulla base della RVR), con la necessità di riduzione di dose di RBV e con la SVR. I dati raccolti hanno permesso di estendere l'associazione individuata e dimostrata precedentemente in pazienti con HCV genotipo 1 anche a pazienti con CHC infetti da genotipo 2 e 3. Nella coorte studiata, le varianti funzionali del gene *ITPA* sono state associate con la protezione dal rischio di anemia alla 4^a settimana di trattamento e per tutta la durata del trattamento; inoltre, sebbene non si sia individuata alcuna correlazione tra l'attività enzimatica e il tasso di riduzione di dose di RBV nei pazienti anemizzati, il deficit enzimatico è stato associato ad un ritardo nello scalo di RBV rispetto ad individui con un'attività normale dell'inosina trifosfatasi. Le varianti funzionali del gene *ITPA* non sembrano invece correlate all'*outcome* terapeutico e alla probabilità di raggiungere l'SVR [126].

L'effetto delle varianti funzionali del gene *ITPA* è stato considerato anche in pazienti con epatite C cronica, trattati con PEG-IFN/RBV per 24 settimane di cui le prime dodici in associazione a Telaprevir. Anche in questo studio, è emersa un'associazione positiva tra la protezione dall'anemia RBV-indotta e il polimorfismo rs1127354 (l'unico presente nella coorte di individui giapponesi indagata). La protezione conferita dal polimorfismo è maggiore nelle prime settimane di trattamento con Telaprevir; infatti, sebbene tutti i pazienti indagati nello studio abbiano sperimentato un calo nei livelli di emoglobina, i pazienti con genotipo CA/AA hanno necessitato di un aggiustamento posologico (scalo della dose di RBV) ritardato di circa 2 settimane rispetto ai pazienti CC. Da un'analisi multivariata è, inoltre, emerso che lo SNP rientra tra i fattori che influenzano il livello di Hb assieme all'età, alla BMI e al sesso. Le varianti funzionali del gene *ITPA* possono quindi fornire delle informazioni aggiuntive per stabilire il corretto regime posologico in pazienti trattati con triplice terapia. Siccome la somministrazione di Telaprevir in associazione a IFN/RBV comporta un aggravamento delle reazioni avverse e una diminuzione dei livelli di Hb più marcata rispetto a quanto osservato con la duplice terapia, in pazienti privi delle varianti funzionali, sono consigliabili sia un monitoraggio a intervalli di tempo più ravvicinati che una riduzione maggiore della dose di RBV durante le 12 settimane iniziali di trattamento [128].

I dati raccolti dai trials clinici e pubblicati in letteratura propendono per una indicazione ad effettuare il test genetico prima di iniziare la terapia con IFN/RBV. Lo screening genetico pre-trattamento del gene dell'*ITPA* in pazienti con epatite C cronica (CHC), infatti, si dimostra utile per individuare i pazienti maggiormente esposti a manifestare un'anemia emolitica cronica, soprattutto all'interno di categorie già "a rischio" come anziani, pazienti con altre co-morbidità, disfunzioni renali o emoglobinopatie. La conoscenza dello stato genetico è sicuramente un'informazione importante anche per la gestione del paziente con CHC perché consente di individuare i soggetti che potrebbero beneficiare di una terapia di supporto a base di acido folico e/o vit. B12 e/o eritropoietina oppure che necessitano di un monitoraggio più frequente dei parametri biochimici ed ematologici, prima del manifestarsi di gravi eventi avversi che potrebbero anche determinare l'interruzione della terapia antivirale. La validità e l'utilità del test possono essere considerate globali. Sebbene, infatti, ciascuna delle due varianti funzionali mostri una distribuzione geografica eterogenea e le frequenze alleliche dei due polimorfismi varino in misura molto marcata considerando gruppi etnici differenti, l'attività ITPasica è più o meno simile nelle

varie popolazioni ad indicare che le due varianti funzionali non predispongono a differenze inter-popolazioni nella suscettibilità all'anemia. Da dati riportati in letteratura, l'allele minore per lo SNP rs1127354 ha una frequenza maggiore negli asiatici (MAF: 0.11 - 0.16) rispetto ai caucasici (MAF: 0.07 - 0.08), alle popolazioni latino americane (MAF: 0.04 - 0.06) e agli africani (MAF: 0.03 - 0.05); viceversa lo rs7270101 è quasi assente negli asiatici (MAF: 0.00 - 0.03) ed è più comune negli ispanici (MAF: 0.07 - 0.08), negli africani (MAF: 0.08 - 0.09) e nei caucasici (MAF: 0.11 - 0.12) [123].

Tab. 1.28: distribuzione delle varianti alleliche del gene ITPA in diverse popolazioni (MAF, *Minor Allele Frequencies*) e grado di associazione con la protezione dal rischio di manifestare anemia indotta da Ribavirina [123].

ITPA variant	Population	MAF (%)	P value	Independent P value
rs1127354	European-Americans	7.6	4.6×10^{-52}	2.3×10^{-68}
	African-Americans	4.6	2.7×10^{-7}	5.1×10^{-7}
	Hispanics	4.0	1.2×10^{-3}	5.6×10^{-5}
	All (combined)	6.9	1.7×10^{-58}	5.9×10^{-26}
rs7270101	European-Americans	12.3	6.8×10^{-22}	3.6×10^{-38}
	African-Americans	7.9	3.0×10^{-5}	6.6×10^{-5}
	Hispanics	8.0	3.8×10^{-4}	1.9×10^{-5}
	All (combined)	11.2	8.5×10^{-76}	2.6×10^{-43}

Tab. 1.29: riassunto dei dati pubblicati sull'impatto delle varianti funzionali del gene ITPA sull'attività ITPasica dell'inosina trifosfatasi in diverse popolazioni. RBC: *Red Blood Cells*; MAF: *Minor Allele Frequencies*; Mut: *homozygous for the minor allele*; cHet: *combined heterozygous*, heterozygous for both rs7270101 e rs1127354; wt: *wild-type* [123].

Reference	Measures		Subjects		rs1127354			rs7270101	
	ITPA activity	ITP in RBC			MAF	effect on ITPA	effect on ITP in RBCs	MAF	effect on ITPA
Sumi et al. Hum Genet 2002	yes	no	100	Caucasian <i>Controls</i>	0.06	Mut: N/A Het: 23% of wt cHet: 9% of wt	very high concentration in Mut (253 +/-151 uM) vs <0.1 for Het or wt	0.13	Mut: N/A Het: 60% of wt cHet: 9% of wt
	yes	yes	15	Mixed ITPA deficient families	n.a.	Mut: 0% of wt Het: 30% of wt cHet: 11% of wt		n.a.	Mut: 63% of wt Het: 79% of wt cHet: 11% of wt
Maeda et al. Mol Gen Metab 2005	yes	yes	100	Japanese	0.16	Mut: 0% of wt Het: 27% of wt	very high concentration in Mut (110 +/-63 uM) vs <0.1 for Het or wt	0	
Shipkova et al. Clin Chem 2006	yes	no	130	Caucasian	0.06	Mut: 0% of wt Het: 26% of wt cHet: 8% of wt		0.13	Mut: 30% of wt Het: 61% of wt cHet: 8% of wt
Atanasova et al. Ther Drug Monit 2007	yes	no	185	Bulgarian	0.04	Mut: N/A Het: 27% of wt cHet: 7% of wt		0.13	Mut: 27% of wt Het: 61% of wt cHet: 7% of wt

2. SCOPO DELLA RICERCA

L'attività di ricerca ha avuto come oggetto di studio la progettazione e lo sviluppo di due test farmacogenetici per predire il dosaggio di farmaci utilizzati in ambito clinico e per i quali si rende necessaria la personalizzazione della terapia su base genetica.

La prima parte dell'attività tecnico-scientifica è stata rivolta allo sviluppo di un dispositivo diagnostico *in vitro*, per l'analisi simultanea dei quattro polimorfismi più significativi per predire il corretto dosaggio del farmaco Warfarin: rs9923231 nel gene VKORC1, rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 e infine rs2108622 nel gene CYP4F2.

Il secondo progetto invece, ha riguardato lo sviluppo di un sistema diagnostico per la discriminazione allelica delle varianti genetiche associate alla variabilità inter-individuale nella risposta alla terapia con Peg-Interferone (PEG-IFN) e Ribavirina (RBV) in pazienti con Epatite C cronica: rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B e rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA.

A tal scopo, per ciascun test, si è proceduto mediante:

- 1) **Attività di Benchmarking:** analisi della concorrenza per valutare i sistemi diagnostici già presenti nel mercato e le loro caratteristiche (metodica, numero di target, limiti diagnostici, costo);
- 2) **Definizione della Metodica:** saggio di discriminazione allelica mPCR-RLB (*Multiplex PCR - Reverse Line Blot*) che combina una multiplex PCR a un saggio di ibridazione su strip mediante oligonucleotidi sequenza-specifici adesi ad un supporto di membrana;
- 3) **Definizione del Prototipo:** in questa fase sono stati progettati i *primers* e le sonde funzionali rispettivamente all'amplificazione delle regioni di interesse e all'identificazione delle varianti alleliche analizzate dal test, e sono state definite le condizioni sperimentali del saggio;
- 4) **Valutazione del Prototipo** su campioni informativi per i polimorfismi indagati;
- 5) **Validazione del Saggio** su almeno 100 campioni informativi e precedentemente genotipizzati con un metodo di riferimento;
- 6) **Analisi delle Performance del Saggio:** specificità analitica, sensibilità analitica, specificità diagnostica, sensibilità diagnostica, riproducibilità;
- 7) **Studio di Compatibilità:** analisi delle performance del saggio cambiando reagenti di amplificazione o supporto per le *probes*;
- 8) **Studio di Stabilità:** prove per valutare e definire la *shelf life* del dispositivo;
- 9) **Sviluppo di Software Interpretativi** nel caso si rendesse necessario facilitare la lettura del *pattern* di bande evidenziato su strip;
- 10) **Preparazione dei Documenti necessari alla Marcatura CE IVD del Kit** (dossier di prodotto, analisi del rischio);
- 11) **Marcatura CE IVD del Kit:** notifica al ministero della Salute e marcatura CE IVD come dispositivo diagnostico *in vitro*;

3. MATERIALI E METODI

3.1. RACCOLTA E TRATTAMENTO DEI CAMPIONI

GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20

I campioni analizzati in questo studio sono stati forniti dal Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

I campioni derivano da pazienti italiani di origine caucasica e di età media di 73 anni (29-93), in terapia con anticoagulanti orali (OAT) e sotto monitoraggio clinico (*target INR* di 2.5, *INR range*: 2.0 – 3.0) presso il Dipartimento di Medicina di Laboratorio dell'Azienda Ospedaliera di Padova da Aprile 2008 a Dicembre 2008. Le indicazioni al trattamento comprendevano principalmente fibrillazione atriale e trombosi venosa profonda.

Tutti i campioni sono stati processati dal laboratorio di provenienza. Il DNA è stato estratto da sangue intero periferico, raccolto in apposite provette contenenti una soluzione anticoagulante (Potassio-EDTA 0.78M), utilizzando il sistema semiautomatico BioSprint 15 DNA Blood Kit (QIAGEN) che sfrutta la tecnologia della particelle magnetiche (KingFisher®; ThermoLabSystems, Vantaa, Finland) ed è stato conservato a -20°C.

Per ciascun paziente, inoltre, sono stati genotipizzati i polimorfismi di interesse (rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9, rs2108622 nel gene CYP4F2 e rs9923231 nel gene VKORC1) mediante metodica Real Time a sonde Taqman (TaqMan® Drug Metabolism Genotyping Assay, (C_25625805_10, C_27104892_10, C_16179493_40 e C_30403261_20 Life Technologies) su strumento ABI Prism® 7900 HT.

Tab. 3.1: numerosità, dato genetico e provenienza dei campioni analizzati in questo studio.

Numero Campioni	Tipizzazione Fornita dal Laboratorio di Provenienza				Laboratorio di Provenienza
	CYP2C9 rs1799853 C>T	CYP2C9 rs1057910 A>C	CYP4F2 rs2108622 C>T	VKORC1 rs9923231 G>A	
77	X	X	X	X	Azienda Osp. Padova
47	X	X	X	X	Azienda Osp. Padova
1	X	X	X	X	AB ANALITICA
Tot. 125	Tot. 125	Tot. 125	Tot. 125	Tot. 125	

GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20

I campioni analizzati in questo studio sono stati forniti dal Dipartimento di Medicina-DIMED dell'Università Ospedaliera di Padova e dal Laboratorio di Epatologia Molecolare dell'Istituto Veneto di Medicina Molecolare (V.I.M.M.).

Tutti i campioni indagati sono stati precedentemente processati dai laboratori di provenienza.

Nel caso dei campioni forniti dal Dipartimento di Medicina-DIMED dell'Università Ospedaliera di Padova il DNA è stato estratto con metodiche standard *home made* a partire da sangue intero e la genotipizzazione dei polimorfismi rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B è stata eseguita con tecnologia Real Time a sonde Taqman® utilizzando il TaqMan Allelic Discrimination Assay (Life Technologies, Foster City, CA).

Per quanto riguarda i campioni provenienti dal Laboratorio di Epatologia Molecolare dell'Istituto Veneto di Medicina Molecolare (V.I.M.M.), il DNA è stato estratto da sangue intero mediante il kit commerciale Qiamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), utilizzando 200 µl di campione e seguendo il protocollo fornito dalla ditta. La genotipizzazione dello SNP rs12979860 del gene IL28B è stata eseguita utilizzando il LightMix in vitro diagnostics kit IL28B (Roche), mentre per gli SNPs rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA si sono utilizzati i kit LightMix rs7270101 ITPA (Roche) e LightMix rs1127354 ITPA (Roche).

Tab. 3.2: numerosità, dato genetico e provenienza dei campioni analizzati in questo studio.

Numero Campioni	Tipizzazione Fornita dal Laboratorio di Provenienza				Laboratorio di Provenienza
	IL28B rs12979860 C>T	IL28B rs8099917 T>G	ITPA rs7270101 A>C	ITPA rs1127354 C>A	
107	X		X	X	VIMM
52	X	X			DIMED
1	X	X	X	X	AB ANALITICA
Tot. 160	Tot. 160	Tot. 53	Tot. 108	Tot. 108	

Per alcuni dei campioni (1_DIMED – 52_DIMED, 53_LEM – 79_LEM, Appendice B) è stato necessario riestrarre il DNA.

Il DNA è stato estratto da sangue intero periferico, raccolto in apposite provette contenenti una soluzione anticoagulante, utilizzando il kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN) e da pellet linfocitario utilizzando il sistema automatico EZ1 Advanced XL System (QIAGEN) in associazione all'EZ1 DSP DNA Blood Kit (QIAGEN) e alla EZ1 Advanced DSP DNA Blood Card (QIAGEN).

L'EZ1 Advanced XL System (QIAGEN) è una workstation robotizzata in grado di processare fino a 14 campioni contemporaneamente; il sistema è basato sulla tecnologia delle particelle magnetiche e consente di isolare e purificare acidi nucleici a partire da quantità iniziali di campione che variano in una *range* da 200 µl a 350 µl. Una volta estratto, il DNA è stato dapprima quantificato allo spettrofotometro mediante lettura della densità ottica (OD) alla lunghezza d'onda di 260nm e in seguito stoccato a -20°C. Per ciascun campione si sono ottenute concentrazioni di DNA comprese tra 50ng/µl e 100ng/µl.

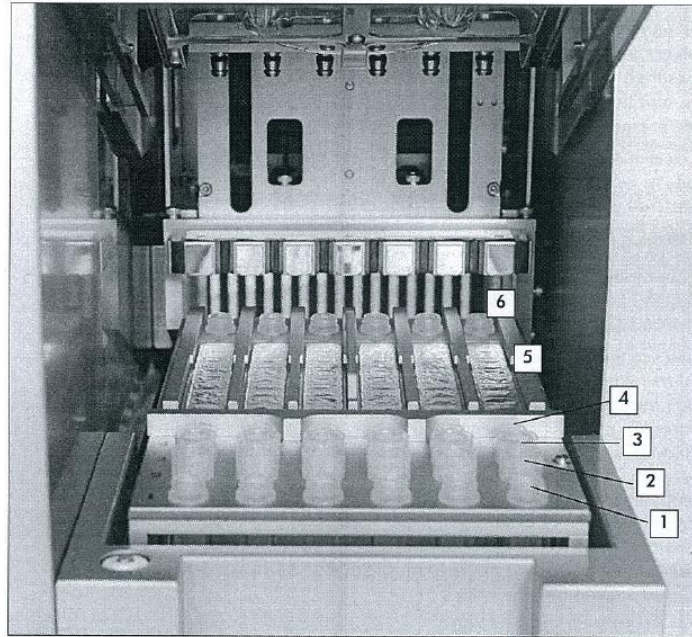


Fig. 3.1: piano di lavoro di un BioRobot EZ1 DSP. 1] provette di eluizione (1.5ml); 2] porta-puntali e puntali; 3] provette contenenti una soluzione all'80% di etanolo per le fasi di lavaggio; 4] provette dei campioni (2ml); 5] reagenti di estrazione (RCB, Reagent Cartridges); 6] blocco riscaldante con provette vuote da 2ml.

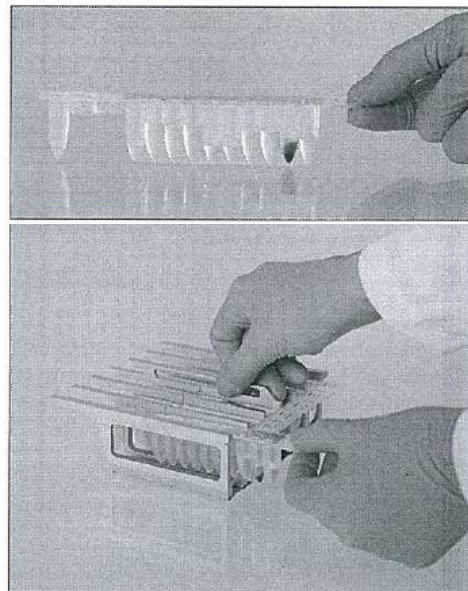


Fig. 3.2: RCB, Reagent Cartridges. I reagenti sono pre-dosati e sigillati in provette da 1.5ml. Una cartridge è sufficiente a processare un campione e viene caricata in un apposito rack che viene poi inserito nello strumento.

3.2. PROGETTAZIONE DEI PRIMERS

In questo progetto di dottorato sono stati genotipizzati 8 polimorfismi a singolo nucleotide (SNP) che hanno richiesto la progettazione di un totale di 15 *primers* necessari all'amplificazione delle sequenze genomiche di interesse a cavallo dei medesimi SNPs (Tab. 3.3).

Come riferimento per la costruzione dei *primers* sono state utilizzate le *RefSeq* dei geni presenti nel *database* UCSC (Human Genome Browser, *release* GRCh37/hg19). Nel caso in cui fossero disponibili in rete più *RefSeq* è stato verificato che le sequenze nucleotidiche fossero le medesime e differissero solo nel numero di esoni/introni.

Nello specifico per i polimorfismi dei geni CYP2C9, CYP4F2 e VKORC1 si è fatto riferimento rispettivamente alle *RefSeq* NM_000771.3, NM_001082.3 e NM_024006.4; per i polimorfismi dei geni IL28B e ITPA si è fatto riferimento alle *RefSeq* rispettivamente NC_000019.9 e NM_033453.3. I *primers* sono stati progettati avvalendosi dei programmi Primer3 v0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) ed Olygo Analyzer v1.0.2.

Primer3 è una risorsa *on-line* gratuita in grado di progettare coppie di *primers* a partire da una sequenza *target* scelta dall'operatore. L'operatore, inoltre, può modificare diversi parametri (lunghezza dell'amplificato e dei *primers*, temperatura di *annealing* etc.) in modo da selezionare la coppia di *primers* che meglio garantisce l'amplificazione ottimale della sequenza bersaglio.

Oligo Analyzer v1.0.2 è un programma in grado di individuare eventuali regioni di *auto-annealing* e di valutare la formazione di dimeri tra *primers*, che potrebbero precludere la reazione di PCR, fornendo un corrispettivo valore di ΔG . Oltre a ciò il programma rileva eventuali siti di appaiamento interni alla sequenza bersaglio che potrebbero portare alla produzione di amplificati aspecifici durante la reazione.

Una volta progettate, le sequenze dei *primers* sono state allineate con l'intera sequenza del genoma umano per escludere l'appaiamento dei *primers* a regioni diverse dalla sequenza bersaglio o ad altri elementi ripetuti interspersi quali le sequenze LINE e SINE. Sempre per assicurare un'amplificazione specifica i *primers* sono stati progettati escludendo dall'analisi tutte le regioni genomiche in cui mappavano SNP noti sulla base delle releases del *database* dpSNP 132-138.

Nel rispetto e nelle tutela del segreto industriale, le sequenze dei *primers* utilizzati nel dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 e nel dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod.04-47A-20 non vengono di seguito riportate.

HUMAN GENOME BROWSER (UCSC)

Human Genome Browser (UCSC, <http://genome.uscs.edu>) è un *database* creato dall'Università di Santa Cruz (California) che riporta l'annotazione delle sequenze del genoma umano e di altri organismi modello. Per ogni regione vengono riportate le posizioni di geni, mRNA, EST, SNPs, marcatori molecolari etc. ad oggi conosciuti e per ciascuno di essi viene fornita una serie di *links* ipertestuali che permettono di ottenere informazioni da diversi *databases* disponibili in rete, come per esempio PubMed, AceView, OMIM e GeneCards. UCSC consente, quindi, di accedere all'enorme quantità di informazioni che riguardano il genoma e di selezionare e visualizzare in maniera rapida tutto ciò che è inerente a una specifica sequenza o annotazione.

Nel *database* UCSC sono implementati, inoltre, diversi *tools* bioinformatici per facilitare il confronto o l'analisi di specifiche regioni nucleotidiche. In particolare, il tool "In-Silico PCR" permette di effettuare una PCR virtuale e fornisce come *output* un *file*, in formato FASTA, contenente una lista di tutte le sequenze presenti nel *database* incluse tra la coppia di *primers* scelta e inserita in *input* nel *tool*. Un altro strumento bioinformatico molto utile è "blat", un *tool* di allineamento che permette di individuare tra tutte le sequenze presenti nel *database* quelle con identità di sequenza superiore al 95% alla sequenza di interesse, definendone per ciascuna la posizione e la regione di omologia.

DbSNP

DbSNP (*Single Nucleotide Polymorphism Database*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) è un *database* creato nel 1998 dal *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) in collaborazione con il *National Human Genome Research Institute* (NHGRI). DbSNP rappresenta un archivio completo non soltanto di tutti i polimorfismi di sequenza ad oggi individuati nelle diverse specie, ma anche di una serie di variazioni molecolari che comprendono corte delezioni, corte inserzioni e marcatori microsatelliti. Il *database*, inoltre, fornisce informazioni aggiuntive circa lo stato di validazione, i metodi impiegati per l'analisi e la frequenza allelica popolazione-specifica dei diversi polimorfismi. Attraverso il link all'MMDB (*Molecular Modeling Database*), è poi possibile visualizzare su modelli proteici tridimensionali gli aminoacidi che risultano modificati a seguito della presenza di SNPs [129].

Tab. 3.3: descrizione dei polimorfismi indagati nei dispositivi diagnostici sviluppati in questo studio: *GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20* per i polimorfismi dei geni CYP2C9, CYP4F2 e VKORC1 e *GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20* per i polimorfismi dei geni IL28B e ITPA. * descrizione delle varianti alleliche riportate per ciascun polimorfismo nel *database* dbSNP. ** localizzazione cromosomica dei polimorfismi come riportato in UCSC (Human Genome Browser). *** frequenza riportata nel *database* UCSC per ciascuna variante allelica.

SNP	GENE	ALTERNATE NAMES (Allelic Variant)*	REFERENCE SEQUENCE (RefSeq-GeneBank ID)	GENOMIC POSITION**	GENIC FUNCTION	ALLELE FREQUENCIES***	AMPLIFIED PRODUCT	IVD
rs1799853	CYP2C9	CYP2C9*2 c.430C>T p.Arg144Cys p.R144C	NM_000771.3 NP_000762.2	chr10:96,702,047-96,702,047 band:10q23.33 exon 3	missense variant	C: 91.548% T: 8.452%	182 bp	GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE COD. 04-74A-20
rs1057910	CYP2C9	CYP2C9*3 c.1075A>C p.Ile359Leu p. I359L	NM_000771.3 NP_000762.2	chr10:96,741,053-96,741,053 band: 10q23.33 exon 7	missense variant	A: 95.426% C: 4.574%	236 bp	
rs2108622	CYP4F2	CYP4F2*3 c.1297G>A p.Val433Met p.V433M	NM_001082.3 NP_001073.3	chr19:15,990,431-15,990,431 band: 19p13.12 exon 11	missense variant	C: 77.943% T: 22.057%	173 bp	
rs9923231	VKORC1	c.-1639G>A	NM_024006.4	chr16:31,107,689-31,107,689 band: 16p11.2 promoter region	upstream gene variant	C: 56.524% T: 43.476%	301 bp	
rs12979860	IL28B	g.39738787C>T g.12007005C>T	NC_000019.9 NT_011109.16	chr19:39,738,787-39,738,787 band: 19q13.2 promoter region	upstream gene variant	C: 65.078% T: 34.922%	118 bp	GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE COD. 04-47A-20
rs8099917	IL28B	g.39738787T>G g.12007005T>G	NC_000019.9 NT_011109.16	chr19:39,743,165-39,743,165 band: 19q13.2 promoter region	upstream gene variant	T: 87.212% G: 12.788%	126 bp	
rs7270101	ITPA	c.124+21A>C c.73+21A>C	NM_033453.3 NM_181493.2	chr20:3,193,893-3,193,893 band: 20p13 intron region (intron 2)	intron variant (splicing variant)	A: 90.379% C: 9.621%	241 bp	
rs1127354	ITPA	c.94C>A p.Pro32Thr P32T	NM_033453.3 NP_258412.1	chr20:3193842-3193842 band: 20p13 exon 2	missense variant	C: 93.274% A: 6.714%	241 bp	

3.3. AMPLIFICAZIONE DI SEQUENZE SPECIFICHE DI DNA MEDIANTE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è una metodologia che permette l'amplificazione specifica ed esponenziale di sequenze di DNA di lunghezza variabile a partire da una quantità esigua del DNA in esame. La specificità si deve all'utilizzo di corte sequenze nucleotidiche (15-30 nt), dette *primers*, che si appaiano in maniera specifica su filamenti opposti di DNA delimitando la sequenza da amplificare. Esse, inoltre, fungono da innesco per la DNA Polimerasi che catalizza l'aggiunta di deossinucleotidi al filamento nascente.

La reazione di PCR si svolge in tre fasi: denaturazione, *annealing* ed estensione; la ripetizione di queste per un numero di volte che va da 30 a 35 permette di aumentare in modo esponenziale la popolazione di sequenze amplificate di DNA di interesse.

Nei protocolli di amplificazione sono state utilizzate tre diverse Taq polimerasi di tipo *Hot Start*, cioè enzimi forniti in stato inattivo, grazie al legame o con inibitori chimici o con anticorpi, che richiedono un'attivazione di tipo termico perché si inneschi l'attività polimerasica. L'utilizzo di questo tipo di enzimi evita l'amplificazione aspecifica durante le fasi che precedono l'incubazione della PCR e semplifica la procedura di allestimento delle reazioni che può essere compiuta a temperatura ambiente. Il tempo di attivazione è diverso per le singole Taq ed è specificato nella Tabella 3.5. Per garantire un'amplificazione efficiente di alcune sequenze che presentavano un'elevata percentuale di guanine e citosine, è stato impiegato un *buffer* di reazione specifico fornito insieme alla Taq DNA Polimerasi contenente l'agente denaturante dimetilsolfossido (DMSO). Per tutte le amplificazioni è stato utilizzato un protocollo di PCR Multiplex che garantisce l'amplificazione contemporanea di tutte le regioni genomiche di interesse (Tab. 3.4 - 3.5, Tab. 3.6 - 3.7). A tutela del segreto aziendale non vengono riportati i nomi delle Mix di Reazione e delle Taq polimerasi impiegate, la composizione qualitativa e quantitativa delle oligomix e i protocolli di amplificazione utilizzati per ciascuna Taq Polimerasi: Le Taq polimerasi e/o le mix di reazione impiegate verranno pertanto indicati come M1, M2 e M3.

Per l'amplificazione delle regioni a cavallo dei polimorfismi nei geni CYP2C9 e IL28B si è proceduto con una PCR-SSP (*Specific Primer PCR*) al fine di aumentare la specificità della reazione di PCR ed evitare l'amplificazione aspecifica di sequenze omologhe a quelle di interesse.

Le sequenze che codificano per i citocromi P450, infatti, presentano un'elevata omologia di sequenza, evidente soprattutto per i geni CYP2C9, CYP2C19, CYP2C8 e CYP2C18, che ne rende difficile la discriminazione (Fig. 3.3 e Fig. 3.4). Nel caso del gene IL28B invece, a circa 15.000 basi a monte della sequenza di interesse, è presente un blocco ripetuto con un'omologia di sequenza maggiore al 90% (Fig. 3.5).

La PCR-SSP, nota anche come PCR ARMS (*Amplification Refractory Mutation System*), impiega *primers* la cui estremità 3' si allinea esattamente in corrispondenza di basi discriminanti tra sequenze omologhe come mutazioni a singolo nucleotide o SNPs, permettendo così l'amplificazione selettiva della variante allelica identificata da quella specifica variazione di sequenza.

Le sequenze omologhe sono state allineate avvalendosi del *tool* bioinformatico ClustalW, individuando così le basi corrispondenti ai punti di *mismatch* tra le sequenze e su questi ultimi sono stati progettati *ad hoc* i *primers*.

```

hg19_refGene_NM_000771_2      TGTTAGGAATTGTTTTTCAGCAATGGAAGAAATGGAAGGAGATCCGGCGT 244
hg19_refGene_NM_000769_2      TGTTAGGAATCGTTTTTCAGCAATGGAAGAGATGGAAGGAGATCCGGCGT 244
hg19_refGene_NM_000770_2      TATTAGGAATCATTTCCAGCAATGGAAGAGATGGAAGGAGATCCGGCGT 244
hg19_refGene_NM_000772_2      TGCTAGGAATCCTTTTCAGCAATGGAAGAGATGGAAGGAGATCCGGCGT 244
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_2      TTCTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGA 294
hg19_refGene_NM_000769_2      TTCTCCCTCATGACGCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGA 294
hg19_refGene_NM_000770_2      TTCTCCCTCACACCTTGCAGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGA 294
hg19_refGene_NM_000772_2      TTCTGCCTCATGACTCTGCGGAATTTTGGGATGGGGAAGAGGAGCATTGA 294
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_2      GGACCGTGTTCAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAA 344
hg19_refGene_NM_000769_2      GGACCGTGTTCAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAA 344
hg19_refGene_NM_000770_2      GGACCGTGTTCAGAGGAAGCTCACTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAA 344
hg19_refGene_NM_000772_2      GGACCGTGTTCAGAGGAAGCCCGCTGCCTTGTGGAGGAGTTGAGAAAAA 344
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_2      CCAAGGGTGGGTGACCCACTACTCCATATC----ACTGACCTTACTGGACTA 390
hg19_refGene_NM_000769_2      CCAAGGGTGGGTGAACATACTCTCTATC----ACTGACCTTCTGGACTG 390
hg19_refGene_NM_000770_2      CCAAGGGTGGGTGACTCTACTCTGCGTC----ATTGACCTTAACAGTTAC 390
hg19_refGene_NM_000772_2      CCAATGGTGGGTGACTTTTTTTTTCCTGAAAAATGTTTTCTAAAATTTA 394
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Fig. 3.3: parte dell' allineamento multiplo tra le sequenze dei geni CYP2C9 (NM_000771_2), CYP2C19 (NM_000769_2), CYP2C8 (NM_000770_2), CYP2C18 (NM_000772_2). La base in verde rappresenta il *mismatch* tra le sequenze omologhe sfruttato per realizzare l'SSP-PCR, mentre la base evidenziata in rosso rappresenta lo SNP rs1799853. Le basi evidenziate in grigio rappresentano il codone interessato dal polimorfismo [CYP2C9 (NM_000771): missense_variant R (CGT) --> C (TGT)].

```

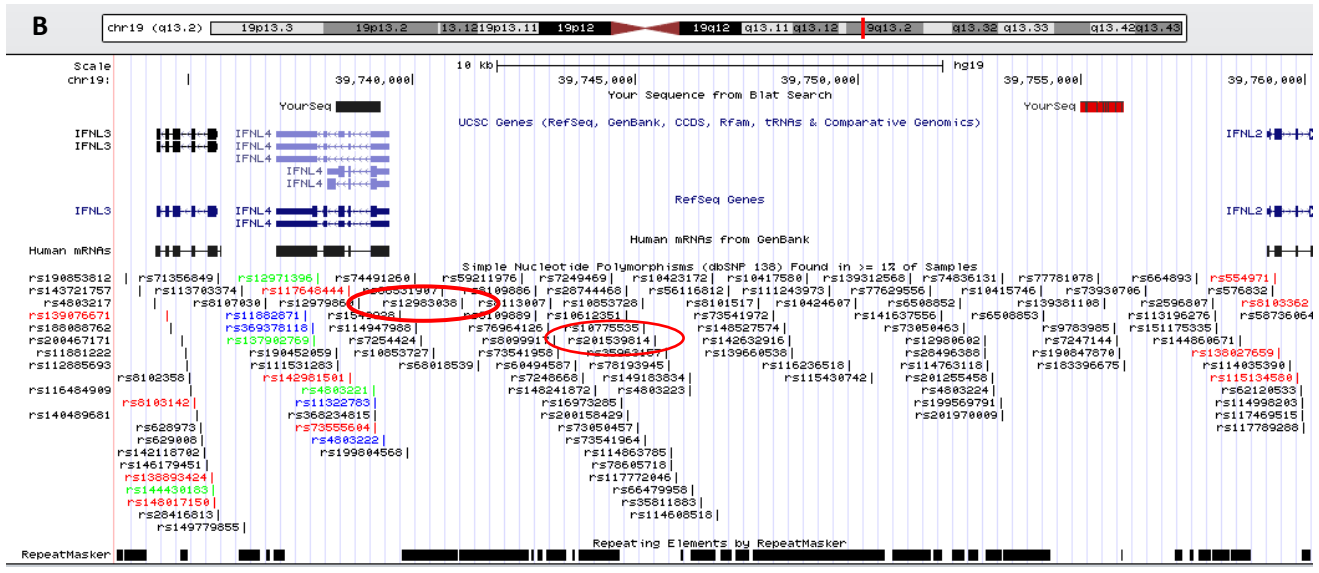
hg19_refGene_NM_000771_6      TTATCAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCG 243
hg19_refGene_NM_000769_6      TTGTGAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAACGTGTGATTGGCAGAAACCG 243
hg19_refGene_NM_000772_6      TTATCAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGAATGTGTAGTTGGCAGAAACCG 243
hg19_refGene_NM_000770_6      TTGTGAGCTAAAGTCCAGGAAGAGATTGTATCATGTAATTGGCAGACACAG 243
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_6      GAGCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGG 293
hg19_refGene_NM_000769_6      GAGCCCTGCATGCAAGACAGGAGCCACATGCCCTACACAGATGCTGTGG 293
hg19_refGene_NM_000772_6      GAGCCCTGTATGCAAGACAGGAGTCACATGCCCTACACAGATGCTGTGG 293
hg19_refGene_NM_000770_6      GAGCCCTGCATGCAAGATAGGAGCCACATGCCCTTACACTGATGCTGTAG 293
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_6      TGCACGAGGTCCAGAGATACATTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCCAT 343
hg19_refGene_NM_000769_6      TGCACGAGGTCCAGAGATACATTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCCAT 343
hg19_refGene_NM_000772_6      TGCACGAGATCCAGAGATACATTGACCTTCTCCCCACCAGCCTGCCCCAT 343
hg19_refGene_NM_000770_6      TGCACGAGATCCAGAGATACATTGACCTTGTCCCCACCGGTGCCCCAT 343
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_6      GCAGTGACCTGTGACATTAATTCAGAAACTATCTCATTCCCAAGGTAAG 393
hg19_refGene_NM_000769_6      GCAGTGACCTGTGACATTAATTCAGAAACTACCTCATTCCCAAGGTAAG 393
hg19_refGene_NM_000772_6      GCAGTGACCTGTGATGTTAAATTCAGAAACTACCTCATTCCCAAGGTAAG 393
hg19_refGene_NM_000770_6      GCAGTGACCACTGATACTAAGTTCAGAAACTACCTCATTCCCAAGGTAAG 393
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_6      TTTGTTTCTCCTACACTGCAACTCCATGTTTTTCGAAGTCCCCAAATTCAT 443
hg19_refGene_NM_000769_6      TTTGTTTCTCCTACACTGCAACTCCATGTTTCTTTTATTCCTCAAATTCAC 443
hg19_refGene_NM_000772_6      CTTGTTTCTCCTACACTACATCTCCATGCTCTTCAAGTCCCCAAATTCAT 443
hg19_refGene_NM_000770_6      CTTGTTTCTCCTACACTATATTTCTGTACTTCTGAAATTTCCATAGTGCT 443
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
hg19_refGene_NM_000771_6      AGTATCATTTTTAAACCTCTACCATCACCGGGTGAGAGAAGTGCATAACT 493
hg19_refGene_NM_000769_6      AGTATGATTTCTTAC-CCTCTACCATCACTGGGTGAGAGAAGTGCATTACT 492
hg19_refGene_NM_000772_6      AGTATAGTCCCAAT-CCTCTAACAACACATGATGAGAGAAGTGTAAAAT 492
hg19_refGene_NM_000770_6      GGTTTGGTTCCAAC-CCTCTAACAACACAAGATGAGAGAAGTGCATAACT 492
*      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *

```

Fig. 3.4: parte dell' allineamento multiplo tra le sequenze dei geni CYP2C9 (NM_000771_2), CYP2C19 (NM_000769_2), CYP2C8 (NM_000770_2), CYP2C18 (NM_000772_2). La base in verde rappresenta il *mismatch* tra le sequenze omologhe sfruttato per realizzare l'SSP-PCR, mentre la base evidenziata in rosso rappresenta lo SNP rs1057910. Le basi evidenziate in grigio rappresentano il codone interessato dal polimorfismo [CYP2C9 (NM_000771): missense_variant I (ATT) --> L (CTT)].

A

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN
browser details	YourSeq	1000	1	1000	1000	100.0%	19	+	39738287	39739286	1000
browser details	YourSeq	810	1	1000	1000	91.7%	19	-	39754964	39755953	990
browser details	YourSeq	33	673	770	1000	94.8%	9	+	95965660	95965822	163
browser details	YourSeq	31	91	347	1000	51.6%	7	+	99097395	99097483	89



C

```

gi|224514627_12006600-12007400      CCTCTGGGGCGGAAGGAGCAGTTGCGCTGCCCCAGCTCAGCGCCTCTT 250
gi|224514627_12023300-12024000      CCTCTGGGGCGGACGGGAGCAGTTGCGCGCAGCTCCAACCTCAGCGCCTCTT 174
*****
gi|224514627_12006600-12007400      CCTCTGCGGGACAAGCGGCGCTTATCGCATACGGCTAGGCCCCCTCGCC 300
gi|224514627_12023300-12024000      CCGCTGCGGGACAAGCGGCGCTTATCGCATACGACTGGGCCCCCTCGCC 224
**
gi|224514627_12006600-12007400      AGGGCCCTAACCTCTGCACAGTCTGGGATTCCTGGACGTGGATGGGTAC 350
gi|224514627_12023300-12024000      AGGGCCCTAACCTCTGCACAGTCTGGGATTCCTGGACGTGGATGGGTAC 274
*****
gi|224514627_12006600-12007400      TGGCAGCCGCGGTCGTCCTGTCTGTACTGAACCAGGGAGCTCCCCGA 400
gi|224514627_12023300-12024000      TGGCAGCCGCGGTCGTCCTGTCTGTACTGAACCAGGGAGCTCCCCGA 324
*****
gi|224514627_12006600-12007400      AGGCCGAACCAGGGTTGAATTGCACCTCCGCGCTCCCCAGCAAGGCCCC 450
gi|224514627_12023300-12024000      AGGCCGAACCAGGGTTGAATTGCACCTCCGCGCTCCCCAGCAATGCCCT 374
****
gi|224514627_12006600-12007400      TCGCCC-CGACCTGGAGCCGAGTCCCTCCCGCAGGGCTCCCTTCTGTGAT 499
gi|224514627_12023300-12024000      GCGCCCGCACCTGGAGCCGAGTCCCGCCTGCAGGGCTCC-TTTTGTGAC 423
*****
gi|224514627_12006600-12007400      TGACCTGAGCCTGCGTTTCGCGCTGACGACGGGGACTGCGGGGATCTCGT 549
gi|224514627_12023300-12024000      TGACCTGAGCCTGCGTTTCGCGCTGACGACGGGGACTGCGGGGATCTCGT 473
*****
gi|224514627_12006600-12007400      GGTGGGAATGTGGGCGCTGACATAGGAGAGGCGCCTGCTGGGCGCTAGG 599
gi|224514627_12023300-12024000      GGTGGGAATGTGGGCGCTGACATAGGAGAGGCGCCTGCTGGGCGCTAGG 523
*****

```

Fig. 3.5: A - output del database UCSC della ricerca su tutto il genoma di sequenze con identità maggiore al 90% alla sequenza di interesse posta a cavallo del polimorfismo rs12979860. B - visualizzazione grafica di quanto riportato in A. C - allineamento tra la sequenza relativa al gene IL28B in cui mappa lo SNP rs12979860 (>gi|224514627:12006600-12007400 *Homo sapiens* chromosome 19 genomic contig, GRCh37.p5) e la corrispettiva sequenza omologa (>gi|224514627:12023300-12024000 *Homo sapiens* chromosome 19 genomic contig, GRCh37.p5). Le basi in verde rappresentano i mismatches tra le sequenze sfruttati per realizzare l'SSP-PCR, mentre la base evidenziata in rosso rappresenta lo SNP rs12979860 (intron variant).

Nelle tabelle sottostanti sono riportati le miscele di reazione e i protocolli termici delle reazioni di amplificazione, utilizzati per l'amplificazione in multiplex dei geni CYP2C9, CYP4F2 e VKORC1 e separatamente dei geni IL28B ed ITPA.

Tab. 3.4: condizioni utilizzate nelle reazioni di amplificazione con le Taq DNA Polimerasi M1, M2 e M3. La Master Mix è costituita da: Taq Polimerasi, Buffer di Reazione, dNTPs, Magnesio (MgCl₂) e Acqua milli-Q (H₂O), in proporzioni variabili a seconda della Miscela di Reazione.

PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE DEI GENI CYP2C9 - CYP4F2 - VKORC1			
	Miscela di Reazione M1	Miscela di Reazione M2	Miscela di Reazione M3
<i>Master Mix</i>	32 µl	17,5 µl	17,5 µl
<i>Oligomix</i>	16 µl	2.5 µl	2.5 µl
<i>DMSO</i>	//	3 µl	3 µl
<i>DNA</i>	2 µl	2.0 µl	2.0 µl
<i>Volume Finale</i>	50 µl	25 µl	25 µl

Tab. 3.5: programma di amplificazione standard relativo alle Mix di Reazione (M1, M2 e M3) testate ed utilizzate nel dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20. * il tempo di Hot start è di 10 minuti per la Taq Polimerasi M1 e di 5 minuti per le Taq Polimerasi M2 e M3.

PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE MULTIPLEX DEI GENI CYP2C9 – CYP4F2 – VKORC1			
	Temperatura	Tempo	Numero di Cicli
<i>Hot start</i>	95°C	5-10 minuti*	1
<i>Denaturazione</i>	95°C	30 secondi	40
<i>Annealing</i>	61°C	60 secondi	
<i>Estensione</i>	72°C	30 secondi	
<i>Estensione Finale</i>	72°C	10 minuti	1
<i>Storage</i>	10°C	∞	1

Tab. 3.6: condizioni utilizzate nelle reazioni di amplificazione con le Taq DNA Polimerasi M2 e M3. La Master Mix è costituita da: Taq Polimerasi, Buffer di Reazione, dNTPs, Magnesio (MgCl₂) e Acqua milli-Q (H₂O), in proporzioni variabili a seconda della Miscela di Reazione .

PROTOCOLLO DI AMPLIFICAZIONE DEI GENI IL28B – ITPA		
	Miscela di Reazione M2	Miscela di Reazione M3
<i>Master Mix</i>	19 µl	19 µl
<i>Oligomix</i>	2.5 µl	2.5 µl
<i>DMSO</i>	1,5 µl	1,5 µl
<i>DNA</i>	2.0 µl	2.0 µl
<i>Volume Finale</i>	25 µl	25 µl

Tab. 3.7: programma di amplificazione standard relativo alle Mix di Reazione testate ed utilizzate (M2 e M3) nel dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20.

PROGRAMMA DI AMPLIFICAZIONE MULTIPLEX DEI GENI IL28B - ITPA			
	Temperatura	Tempo	Numero di Cicli
<i>Hot start</i>	95°C	5 minuti	1
<i>Denaturazione</i>	95°C	30 secondi	40
<i>Annealing</i>	64°C	90 secondi	
<i>Estensione</i>	72°C	30 secondi	
<i>Estensione Finale</i>	72°C	10 minuti	1
<i>Storage</i>	10°C	∞	1

3.4. SEQUENZIAMENTO DEL DNA

La specificità della reazione di amplificazione è stata valutata mediante sequenziamento diretto dei prodotti di amplificazione di ciascun polimorfismo ottenuti, usando come DNA, il controllo positivo incluso in ciascun kit (campione 125_AB, Appendice A; campione 160_AB, Appendice B). Gli amplificati sono stati dapprima purificati da dNTPs in eccesso e residui di *primers* non appaiati attraverso un metodo enzimatico (ExoSap-IT®, usb-Affymetrix) e successivamente sottoposti a sequenziamento. Il sequenziamento è stato effettuato dal servizio di sequenziamento del BMR Genomics, attraverso l'impiego della tecnologia dei Big Dye terminator v3.1 e dei sequenziatori automatici ABI 3730XL a 96 capillari e ABI 3100 a 16 capillari (Applied Biosystem). I risultati, forniti sotto forma di cromatogrammi in formato *.abi, sono stati analizzati con il programma SeqManII, allineando le sequenze ottenute con le rispettive sequenze di riferimento ottenute dall'NCBI.

3.5. REVERSE LINE BLOT

Il metodo *Reverse Line Blot* (RLB) si basa sul principio dell'ibridazione molecolare tra acidi nucleici di sequenza complementare; in particolare il metodo sfrutta l'ibridazione specifica tra oligonucleotidi sintetici o *probes* adesi ad un supporto di nylon o nitrocellulosa ed una regione genomica precedentemente amplificata mediante PCR.

La tecnica si compone di diverse fasi che comprendono: la denaturazione dei prodotti di amplificazione; l'ibridazione specifica dei filamenti di DNA *single-strand* agli oligonucleotidi sintetici complementari, in specifiche condizioni di temperatura, agitazione e pH; una fase di lavaggio stringente per eliminare l'eccesso di amplificato non legato ed infine una fase di *detection* o rilevazione colorimetrica.

La visualizzazione dell'ibrido DNA-*probe* avviene sfruttando il sistema della biotina-streptavidina-fosfatasi alcalina; a tal scopo l'amplificazione è condotta utilizzando dei *primers* coniugati a biotina che, al termine dell'ibridazione, viene riconosciuta e legata da un complesso streptavidina-fosfatasi alcalina. In ambiente alcalino e in presenza di un substrato cromogeno (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, BCIP e nitroblu tetrazolio cloruro, NBT), l'enzima catalizza la reazione di idrolisi del BCIP, determinando la formazione di un intermedio colorato che riduce l'NTB in NTB formazano, un composto di colore blu intenso che si deposita sul supporto formando dei "*dots*" o delle "*lines*" a seconda della tecnica utilizzata per spottare le sonde sul supporto.

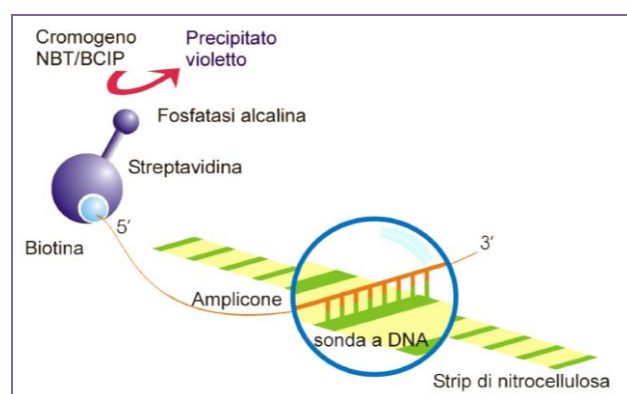


Fig. 3.6: visualizzazione grafica dell'ibridazione allelica specifica su strip.

Tutte le varie fasi analitiche del saggio possono essere condotte sia manualmente che in automatico, a seconda del numero di campioni da processare, utilizzando rispettivamente lo strumento Thermoshaker PST-60HL (Biosan) o lo strumento AUTOBLOT 3000H (MedTEC).

Lo strumento Thermoshaker PST-60HL (Biosan) è un agitatore ed incubatore termostato che permette di processare contemporaneamente fino a un massimo di 16 campioni garantendo il mantenimento della temperatura impostata (da +25°C a +60°C, incremento. 0.1°C), un'agitazione costante e a velocità regolabile (250 -1200 rpm, incr. 10 rpm) e la possibilità di settare il tempo dell'incubazione (1min – 96 h, incr. 1min). Lo strumento AUTOBLOT 3000H rappresenta un sistema chiuso e programmabile che permette di svolgere in automatico tutte le fasi del saggio RLB. Lo strumento può memorizzare fino ad un massimo di 10 programmi, per ciascuno dei quali è possibile stabilire il numero di fasi del saggio, i volumi delle soluzioni da dispensare, i tempi di incubazione (1min – 24h), la velocità di agitazione della piattaforma e la temperatura (30°C - 60°C, $\pm 0.1^\circ\text{C}$). La capacità di processamento dello strumento è di 20 campioni.

PROGETTAZIONE DELLE SONDE

Per ciascun polimorfismo indagato sono state progettate due sonde ASO (*Allele Specific Oligonucleotide*), una sonda specifica per la sequenza *wild-type* e una sonda specifica per la variante allelica, per un totale di 16 *probes*. Per motivi di segreto industriale le sequenze degli oligonucleotidi non vengono riportate. Per il disegno delle sonde sono stati utilizzati tre *tools* bioinformatici: *mfold* (<http://mfold.rna.albany.edu>) per l'analisi del *folding* degli amplificati e quindi per valutare se l'amplificato formasse forcine o *loop* che avrebbero potuto limitare l'appaiamento con la sonda, *blastn* (<http://genome.ucsc.edu>) per valutare l'univocità/specificità degli oligo e *DNA Mate* (<http://melolab.org/dnaMATE/index.html>) per il calcolo della temperatura di melting degli oligo.

Come supporti sono state usate due tipologie di membrana: una membrana in nylon, funzionalizzata con gruppi amminici a carica positiva ed una membrana in nitrocellulosa di natura idrofoba. Anche in questo caso non vengono riportati i nomi commerciali delle membrane per questioni di segreto industriale.

Le sonde sono state depositate sul supporto per mezzo di un dispensatore automatico ad alta precisione e sono state immobilizzate esponendo la membrana a raggi UV che inducono la formazione di legami covalenti tra le sonde e la membrana.

In ciascuna strip sono presenti 8 sonde specifiche per la genotipizzazione dei polimorfismi di interesse, un controllo di colorazione che attesta il corretto funzionamento degli step post-ibridazione e un riferimento colorato fisso per l'allineamento di lettura.

Per l'interpretazione del risultato e quindi del *pattern* di bande ottenuto su strip, è stata creata una maschera interpretativa da sovrapporre a ciascuna striscia allineando la banda del controllo di colorazione, presente sul lucido, con quella della strip (Fig. 3.7). Una banda viene considerata positiva quando, al termine della fase di colorazione, essa appare di colore viola/marrone; l'intensità di colorazione delle bande può comunque differire su una stessa striscia.

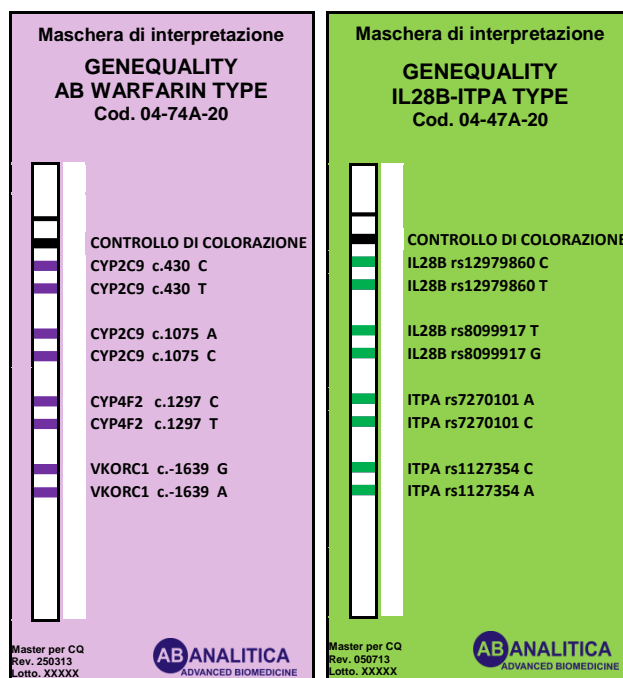


Fig. 3.7: maschere di interpretazione dei kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 e GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20.

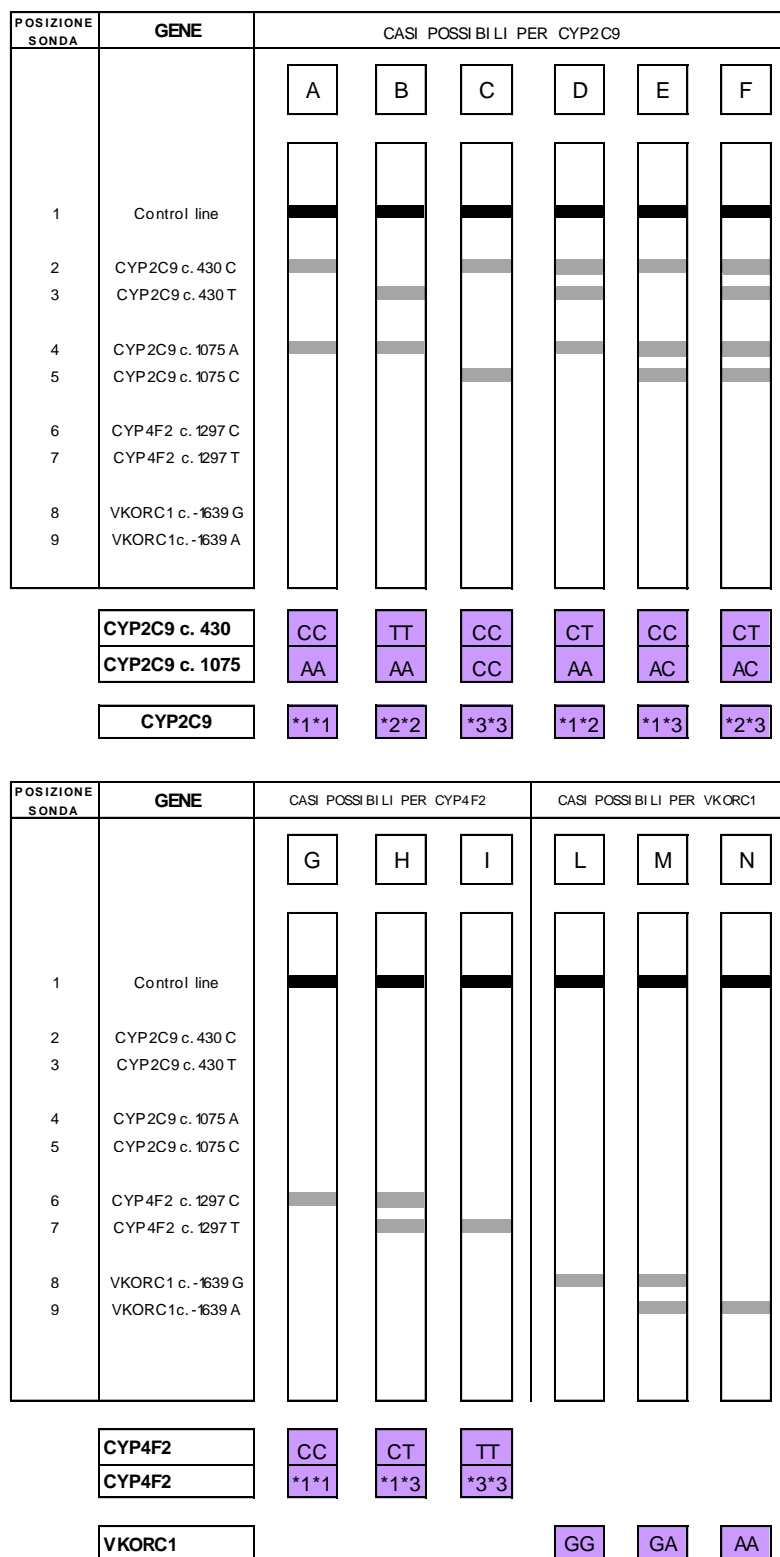


Fig. 3.8: visualizzazione schematica di tutti i possibili esiti del test per ciascun polimorfismo. Per quanto riguarda il gene CYP2C9, i casi geneticamente possibili sono sei, mentre per gli altri geni i casi possibili sono tre; per il gene CYP4F2 un individuo può essere *Wild Type* (caso G) oppure portatore del polimorfismo in eterozigosi (caso H) o in omozigosi (caso I). Per il gene VKORC1 il campione può risultare *Wild Type* (caso L) oppure essere eterozigote (caso M) o omozigote (caso N) per il polimorfismo. Nella figura sono riportati tutti i possibili pattern di bande ottenibili dal test, corredati dal corrispettivo genotipo e dalla relativa configurazione allelica.

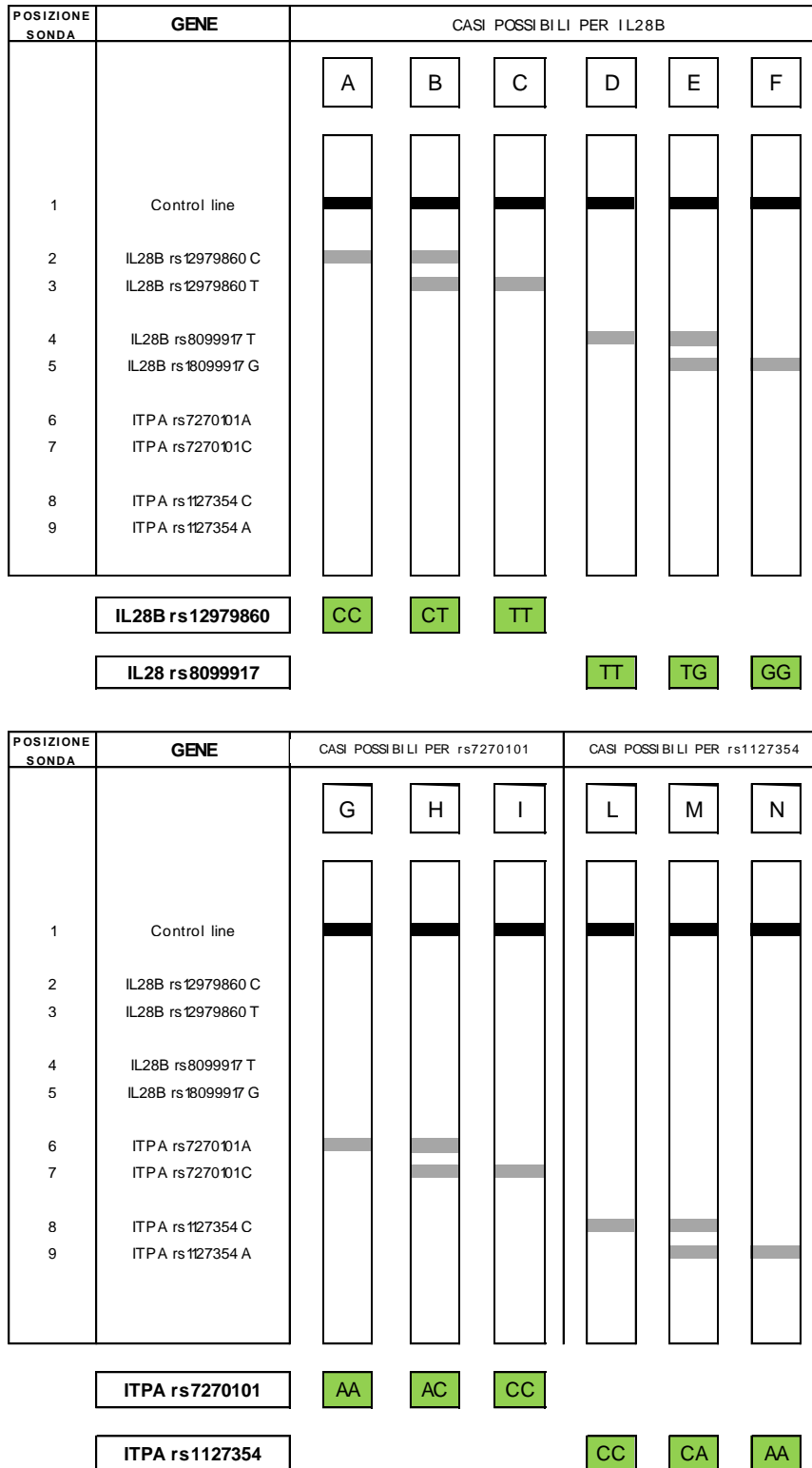


Fig. 3.9: visualizzazione schematica di tutti i possibili esiti del test suddivisi per polimorfismo. La presenza di una sola banda indica lo stato di omozigosità; i casi A, D, G e L si riferiscono ad individui *Wild Type*, mentre i casi C, F, I e N si riferiscono ad individui che sono omozigoti per i polimorfismi. La presenza di due bande indica lo stato di eterozigosità per il polimorfismo corrispondente (casi B, E, H e M).

PROTOCOLLO RLB

La messa a punto di un protocollo RLB richiede il settaggio di numerosi parametri, tra loro interdipendenti, che definiscono la stringenza e la specificità del saggio stesso (Tab. 3.8).

Uno dei prerequisiti della metodica RLB è che tutte le *probes* utilizzate nel saggio, siano sequenza-specifiche sotto le medesime condizioni di ibridazione. A tal scopo il disegno delle sonde deve tener conto di alcuni criteri relativi: alla lunghezza delle *probes*, al contenuto in G:C degli oligo, alla temperatura di melting (T_m) dell'oligo, alla differenza di T_m tra oligo discriminanti la sequenza *wild-type* e la corrispondente variante allelica, alla differenza di T_m tra coppie di oligo che discriminano varianti alleliche differenti, alla quantità di sonda spottata sulla membrana ed infine al grado di omologia *target-probe* che può essere ridotto inserendo dei *mismatch*; a tal proposito è importante definire sia la tipologia che la posizione degli stessi, in quanto alcuni *mismatch* sono meno destabilizzanti di altri sull'ibrido *target-probe* (es. appaiamento G:T oppure *mismatch* in prossimità delle estremità 5' e 3' dell'oligo).

Per minimizzare il rischio di cross-ibridazioni e di ibridazioni aspecifiche, senza compromettere però il legame tra la sonda e il corrispondente filamento di DNA complementare, è necessario che le sonde abbiano una lunghezza di circa 20 bp e una temperatura di melting (T_m) maggiore della temperatura a cui si svolge il saggio di circa 3°C – 4°C e tale per cui la differenza di temperatura di melting dell'oligo con la sequenza ad esso complementare (*wild-type* o variante allelica) sia maggiore di almeno 4°C rispetto alla temperatura di melting dell'oligo con la sequenza che identifica rispettivamente o la variante allelica o la sequenza *wild-type*. A parità di temperatura, sonde di lunghezza maggiore alle 20bp formeranno degli ibridi con il DNA complementare molto più stabili e quindi meno facilmente dissociabili rispetto a sonde di lunghezza inferiore alle 20bp.

La stabilità termica degli ibridi sonda/DNA-*target* può comunque essere alterata variando la forza ionica delle soluzioni di ibridazione e lavaggio e/o la temperatura a cui svolgere il saggio; infatti, una bassa forza ionica ed una temperatura alta hanno un effetto destabilizzante sugli ibridi sonda/DNA-*target* e, pertanto, tali condizioni favoriscono i legami specifici.

Nel caso di sequenze particolarmente ricche in G:C (o in A:T) che rendono difficile il disegno di sonde aderenti ai requisiti standard è possibile o progettare le *probes* sul filamento complementare di DNA oppure utilizzare dei reagenti come la formammide o il TMAC che agiscono sulla stabilità degli ibridi DNA-DNA. La formammide è un agente denaturante che destabilizza i DNA duplex abbassando la temperatura di melting del DNA, aumentando così la specificità dell'ibridazione sonda/DNA-*target*. Il TMAC è un sale d'ammonio quaternario che elimina la dipendenza della temperatura di melting dal contenuto G:C della sequenza riducendo l'energia dei legami ad idrogeno tra le coppie di basi G/C; inoltre il TMAC, legandosi in modo specifico alle coppie di basi A/T, è in grado di aumentarne la stabilità termica. Per tali ragioni il TMAC viene usato per ridurre la temperatura di melting e soprattutto per minimizzare le differenze nella composizione nucleotidica delle sonde, causata dall'eterogeneità della sequenza genomica. Per calcolare la temperatura di melting si può fare riferimento alla classica formula: $T_m = 4(G + C) + 2(A + T) \text{ °C}$, che però non è molto accurata, oppure utilizzare uno dei tanti algoritmi implementati in software disponibili *on-line* (es. dnaMATE-server, Oligo Analyzer 3.1).

Nelle Tabelle 3.9 e 3.10 sono riportati i protocolli di rivelazione su strip messi a punto per i dispositivi rispettivamente GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 e GENEQUALITY IL28B-ITPA cod. 04-47A-20.

Tab. 3.8: elenco dei parametri che condizionano la stringenza del saggio RLB. La messa a punto di un protocollo RLB richiede il settaggio di una serie di parametri interconnessi tra loro che comprendono: la temperatura a cui svolgere il saggio (che per limiti della strumentazione va in genere dai 42°C ai 52°C), la tipologia delle soluzioni (a minore o a maggiore forza ionica), il tempo di incubazione delle strip con le medesime soluzioni (mai superiore ai 60') e infine la quantità di *probe* spottata sulla membrana (optimum per 5µM). La temperatura del saggio è funzione della temperatura a cui il DNA riconosce e lega la sonda complementare, che a sua volta dipende dalla temperatura di melting dell'oligo. Quest'ultima varia in funzione di diversi fattori e può diminuire inserendo dei *mismatch* vicino alla base che identifica la variazione di sequenza che si vuole indagare. In genere affinché il saggio sia specifico è importante che la T_m della sonda superi la T_{opt} di 3°C e che la differenza di T_m della sonda (es. quella che identifica la sequenza *wild-type*) con la sua sequenza target rispetto alla sequenza polimorfica o mutata sia maggiore o al massimo uguale a 4°C.

PARAMETRI SPERIMENTALI che DEFINISCONO LA STRINGENZA DEL SAGGIO RLB

1. Temperatura (°C) del saggio [preferibilmente inferiore a 52°C];

- Temperatura di Ibridazione (T_{opt}) sonda-DNA;
 - T_m oligo ($T_{opt} \geq T_m \geq T_{opt} + 3^\circ\text{C}$);
 - ♦ Lunghezza oligo (min 15bp - max 25bp);
 - ♦ Contenuto G:C oligo (50%);
 - ♦ Omologia di sequenza oligo-DNA *target*;
 - ♦ Numero di *mismatch*;
 - ♦ Tipo di *mismatch*;
 - ♦ Posizione dei *mismatch*;

2. Tipologia delle Soluzioni di Ibridazione e Lavaggio;

- Forza Ionica (concentrazione NaCl [0.3M-0.75M]);
 - Presenza Formammide o Trimetilammoniocloruro (TMAC) [$\approx 3\text{M}$];
-

3. Tempo di Incubazione (min 5'-max 1h);

4. Concentrazione degli oligo sulla membrana [0,35µM - 40µM];

5. ΔT_m dell'oligo con la sequenza *wild-type* rispetto alla sequenza polimorfica/mutata ($\geq 4^\circ\text{C}$);

Tab. 3.9: protocollo di rilevazione su strip del kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20. I reagenti utilizzati sono *home made* ad eccezione del colorante NBT-BCIP e del Coniugato e comprendono: HYB2, soluzione di ibridazione; COND2, soluzione di lavaggio stringente; CON, streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina; RIN, soluzione di lavaggio a pH basico; STOP, soluzione di lavaggio a pH acido. Per ciascun reagente vengono dispensati 2ml.

GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20			
STEP	REAGENTI DA UTILIZZARE	CONDIZIONI D'INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
1) Denaturazione amplificato	10 µl amplificato + 20 µl DEN	Temp. ambiente	5'
2) Ibridazione	HYB-2 (2 ml)	51°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	30'
3) Lavaggio stringente	CON-D2 (2 ml)	51°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	5'
4) Lavaggio stringente	CON-D2 (2 ml)	51°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	5'
5) Incubazione con Streptavidina AP-Coniugata	CON diluito (1 µl CON+ 2 ml CON-D2)	51°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	30'
6) Risciacquo	RIN (2 ml)	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
7) Risciacquo	RIN (2 ml)	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
8) Rivelazione colorimetrica	COLORAZIONE (1 tavoletta NBT/BCIP in 10 ml H ₂ O distillata, 2 ml)	Temp ambiente In agitazione (250 rpm) AL BUIO	10'- 15'
9) Bloccaggio della reazione	STOP (2 ml)	Temp. Ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
10) Risciacquo finale	H ₂ O distillata (2 ml)	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'

Tab. 3.10: protocollo di rilevazione su strip del kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20. I reagenti utilizzati sono *home made* ad eccezione del colorante NBT-BCIP e del Coniugato e comprendono: HYB2, soluzione di ibridazione; COND2, soluzione di lavaggio stringente; CON, streptavidina coniugata a fosfatasi alcalina; RIN, soluzione di lavaggio a pH basico; STOP, soluzione di lavaggio a pH acido. Per ciascun reagente vengono dispensati 2ml.

GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20			
STEP	REAGENTI DA UTILIZZARE	CONDIZIONI D'INCUBAZIONE	TEMPO DI INCUBAZIONE
1) Denaturazione amplificato	10 µl amplificato + 20 µl DEN	Temp. ambiente	5'
2) Ibridazione	HYB-2	46°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	30'
3) Lavaggio stringente	CON-D2	46°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	5'
4) Incubazione con Streptavidina AP-Coniugata	CON diluito (1 µl CON + 2ml CON-D2)	46°C ± 0.5 °C In agitazione (250 rpm)	30'
5) Risciacquo	RIN	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
6) Risciacquo	RIN	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
7) Rivelazione colorimetrica	COLORAZIONE (1 tavoletta NBT/BCIP in 10 ml H ₂ O distillata)	Temp ambiente In agitazione (250 rpm) AL BUIO	10' - 15'
8) Bloccaggio della reazione	STOP	Temp. Ambiente In agitazione (250 rpm)	2'
9) Risciacquo finale	H ₂ O distillata	Temp. ambiente In agitazione (250 rpm)	2'

3.6. AB WARFARIN TYPE STRIP READER

Il kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE è stato corredato da un software interpretativo costituito da un sistema per la lettura delle strip (*strip lector*) e da un modulo diagnostico per l'interpretazione del dato di genotipizzazione dei geni CYP2C9, CYP4F2 e VKORC1.

Il software risponde ai requisiti della norma IEC 62304 – “Medical Device Software – Software Life Cycle Processes” – Ed.1.0 2006-05 e rappresenta un sistema di interpretazione automatica per le strip *Reverse Line Blot* che risponde alle esigenze di:

- a) rendere automatico e ripetibile il processo di lettura e interpretazione del risultato della strip;
- b) archiviare i risultati e prevedere una reportistica stampabile.

Il programma si configura come una finestra principale che contiene l'interfaccia utente di utilizzo comune. Il programma è utilizzabile in modo semplificato da questa interfaccia per una valutazione rapida dei risultati, senza inserire informazioni relative al paziente o alla strip, ma solo come ausilio alla lettura manuale. Una finestra secondaria, accessibile via menù, permette invece di inserire i dati relativi al paziente e alle strip. Il salvataggio dei dati, il loro recupero e la stampa sono gestite da voci di menù apposite.

Il sistema di acquisizione dei dati è stato realizzato con una semplice interfaccia “*point and click*” in cui l'utente vede un'immagine a schermo della strip che si presenta con un numero di bande pari al numero delle sonde presenti sulla striscia, ciascuna identificata dal nome e da un numero progressivo che ne indica la posizione sulla strip (Fig. 3.10).

Ciascuna banda si trova in uno stato “*off*” o non attivo e cliccando con il mouse su di essa, questa cambia di stato passando da non attiva ad attiva, stato “*on*”, e viceversa.

Per ottenere il risultato, l'utente non deve far altro che riportare sull'interfaccia grafica del software il pattern di bande rilevato su strip; utilizzando un comando apposito dell'interfaccia, i dati relativi alle bande vengono poi passati al modulo di lettura diagnostico che interpreta i risultati. La valutazione esprime sia un risultato sintetico sia, dove applicabile, le informazioni di base che hanno portato al risultato stesso, al fine di consentire all'operatore di controllare il processo di valutazione.

L'algoritmo implementato sul software agisce su più step:

- a) verifica, per ogni coppia di bande, la presenza di almeno una delle due bande; se per almeno una coppia di bande si verifica il caso che entrambe le bande siano assenti, il risultato del test è invalidato; tale risultato, infatti, è indice di un problema in fase di amplificazione (mancata amplificazione del gene in questione).
- b) determinazione, per ogni coppia di bande, dei dettagli di valutazione secondo lo schema in A;
- c) determinazione della configurazione allelica per i geni CYP2C9 e CYP4F2 e del genotipo di VKORC1, secondo lo schema in B;

Per ciascun paziente il sistema di lettura archivia, sotto forma di report stampabile, le seguenti informazioni:

- a) i dati identificativi del paziente;
- b) il lotto della strip in esame;
- c) il pattern di bande rilevato su strip (lettura delle bande attive/non attive della strip);
- d) i dati identificativi dell'operatore che effettua il test;
- e) le valutazioni diagnostiche espresse dal programma, sia in sintesi che in dettaglio;

4. RISULTATI

4.1. PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20

SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica del kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 è stata assicurata dalla scelta di *primers* e *probes* specifici, nonché dall'utilizzo di condizioni di genotipizzazione stringenti. La specificità dei *primers* e delle *probes* è stata analizzata utilizzando il *tool* bioinformatico di allineamento "blat" implementato nel *database* UCSC (*Human Genome Browser*) al fine di escludere appaiamenti aspecifici con sequenze omologhe o con identità di sequenza superiore al 90% alle sequenze di interesse.

La sequenza a cavallo di ciascun polimorfismo è stata poi amplificata utilizzando una PCR SSP e i prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto per confermare l'appaiamento univoco dei *primers* al genoma e la specificità della reazione di amplificazione. Come appare evidente dalle Fig. 4.1, 4.2, 4.3 e 4.4, l'*output* del sequenziamento rivela un elettroferogramma definito e chiaro, indice dell'assenza di prodotti di amplificazione multipli e quindi garanzia che l'amplificazione delle sequenze di interesse è avvenuta in modo specifico.

SENSIBILITÀ ANALITICA

La sensibilità analitica del dispositivo diagnostico GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 è stata valutata eseguendo delle prove con concentrazioni scalari di DNA a partire da 500 ng/reazione fino ad 1 ng/reazione. Il DNA è stato ottenuto da campioni informativi per tutti i polimorfismi indagati nel kit al fine di valutare da un lato l'effettiva funzionalità di ciascuna *probe* spottata sulla strip e dall'altro l'assenza di segnali aspecifici e/o cross-reattività da parte delle sonde in presenza di concentrazioni di DNA di partenza superiori a quelle indicate nel manuale di utilizzo del kit (25 ng/μl – 100 ng/μl).

La sensibilità è stata valutata su campioni informativi per tutti e quattro i polimorfismi analizzati dal kit (Fig. 4.5 e Fig. 4.6). Per le prove di sensibilità, il DNA è stato amplificato utilizzando la miscela di reazione M2, secondo il protocollo riportato al Paragrafo 3.3 (Tab. 3.4). Il saggio RLB è stato condotto con lo strumento automatico AUTOBLOT 3000H (MedTEC) secondo il protocollo riportato al Paragrafo 3.5 (Tab. 3.9), utilizzando come supporto di spottaggio delle *probes* la membrana per blotting in nylon a carica positiva.

Il kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 ha dimostrato di garantire una corretta genotipizzazione di tutti i polimorfismi indagati a partire da quantità di DNA di partenza molto eterogenee, comprese in un *range* che va da 0,5 ng/μl a 250 ng/μl. I risultati ottenuti hanno permesso di definire una sensibilità analitica di 1 ng di DNA/reazione e un *range* di quantità ottimale di DNA di partenza che va da 20 a 200 ng di DNA/reazione (Fig. 4.5 e Fig. 4.6).

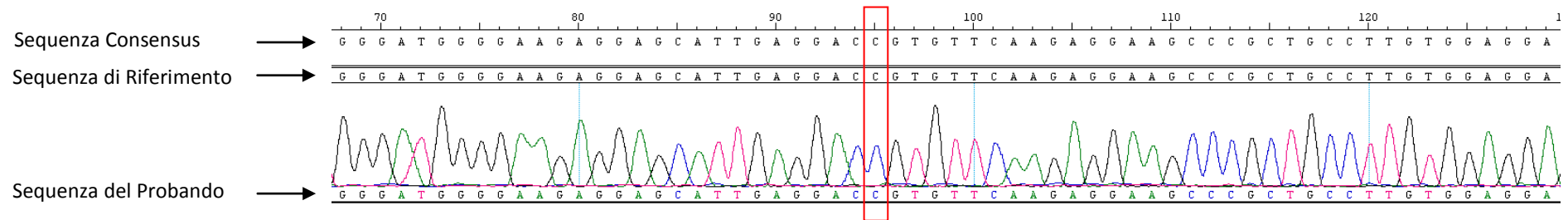


Fig. 4.1: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs1799853 c.430 C>T**, evidenziato in rosso, del gene CYP2C9. Il probando è omozigote C/C (*wild-type*)

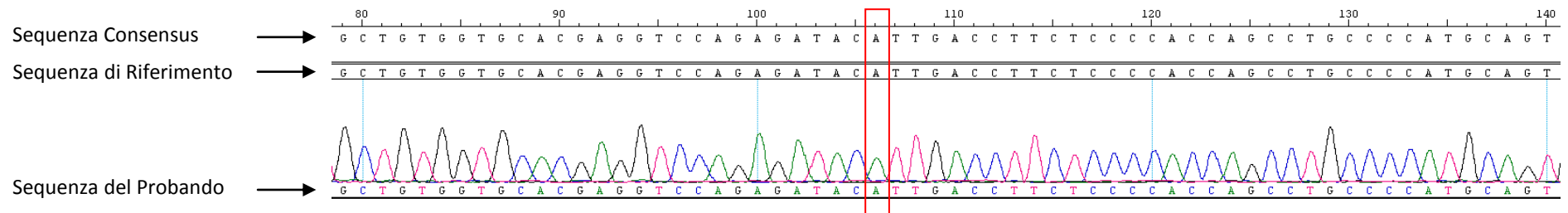


Fig. 4.2: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs1057910 c.1075 A>C**, evidenziato in rosso, del gene CYP2C9. Il probando è omozigote A/A (*wild-type*).

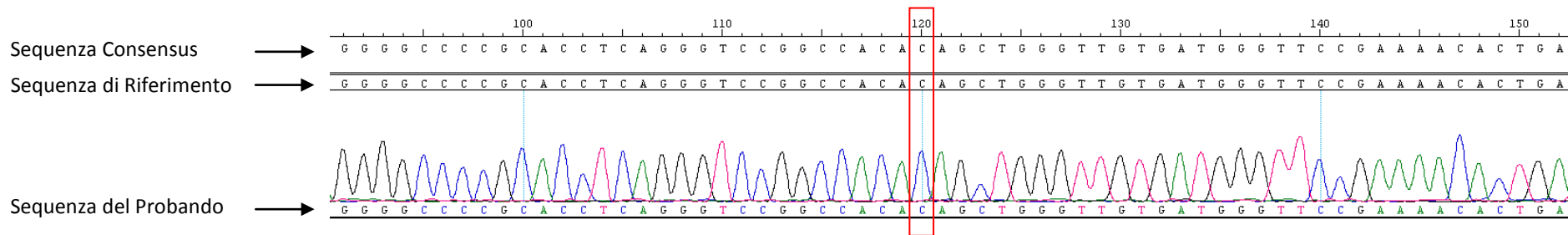


Fig. 4.3: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs2108622 c.1297 C>T**, evidenziato in rosso, del gene **CYP4F2**. Il probando è omozigote **C/C** (*wild-type*).

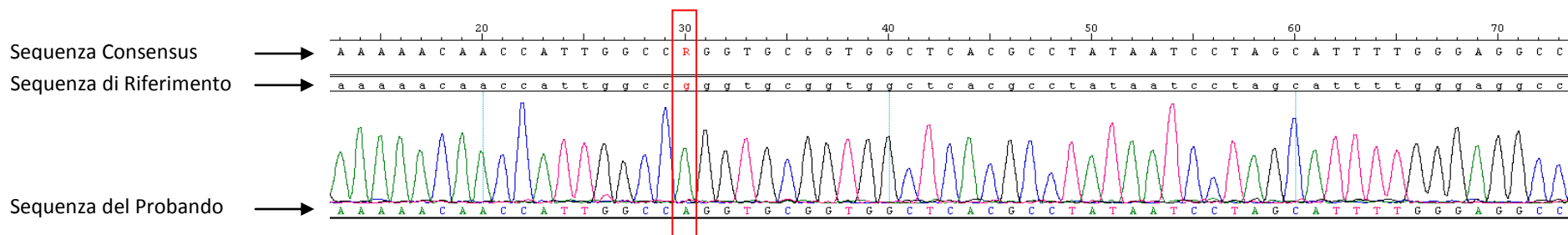


Fig. 4.4: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs9923231 c.-1639 G>A**, evidenziato in rosso, del gene **VKORC1**. Il probando è omozigote **A/A**.

SAMPLE:

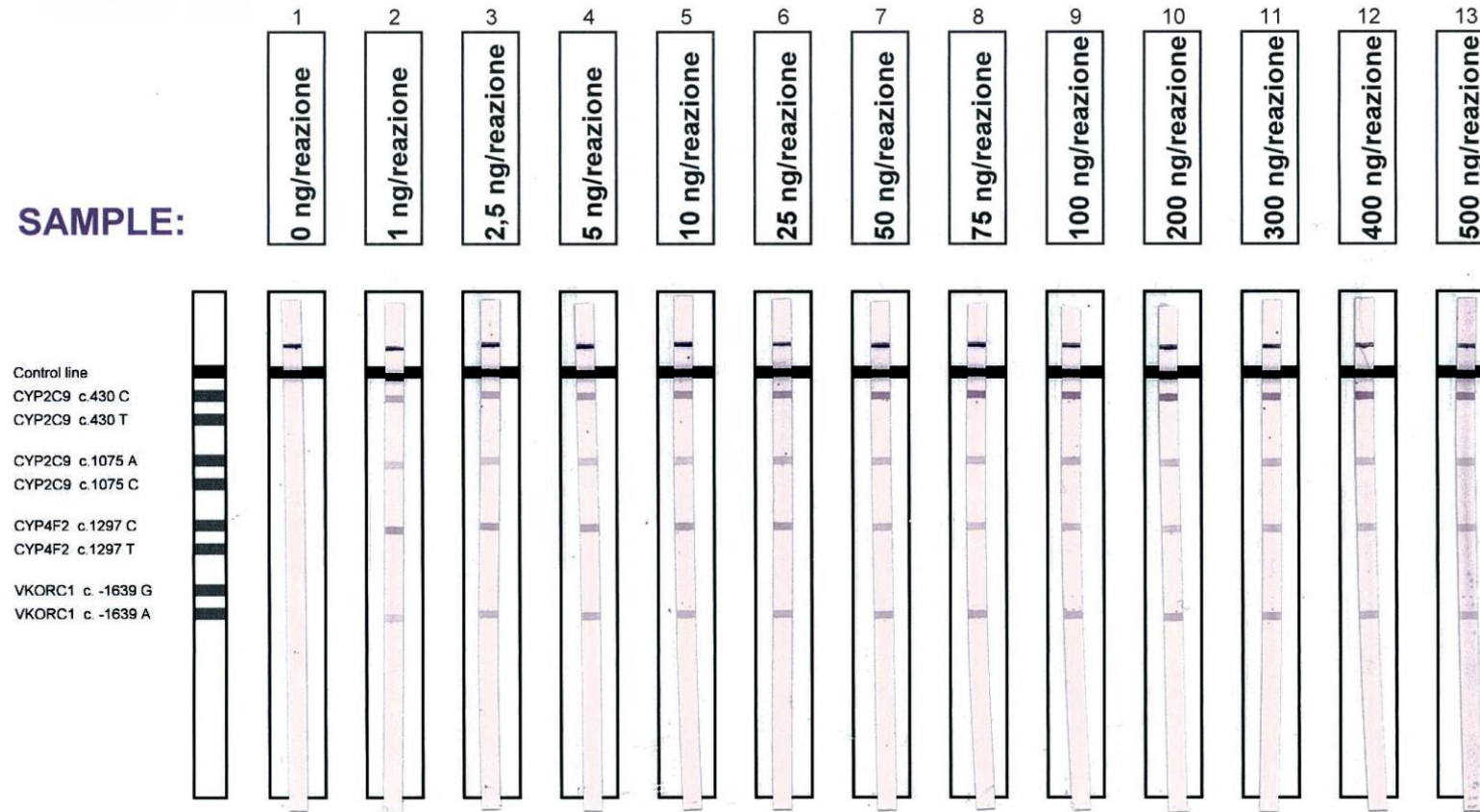


Fig. 4.5: risultati di sensibilità analitica del saggio RLB su DNA genomico (campione 125_AB, Appendice A, controllo positivo del kit).

SAMPLE:

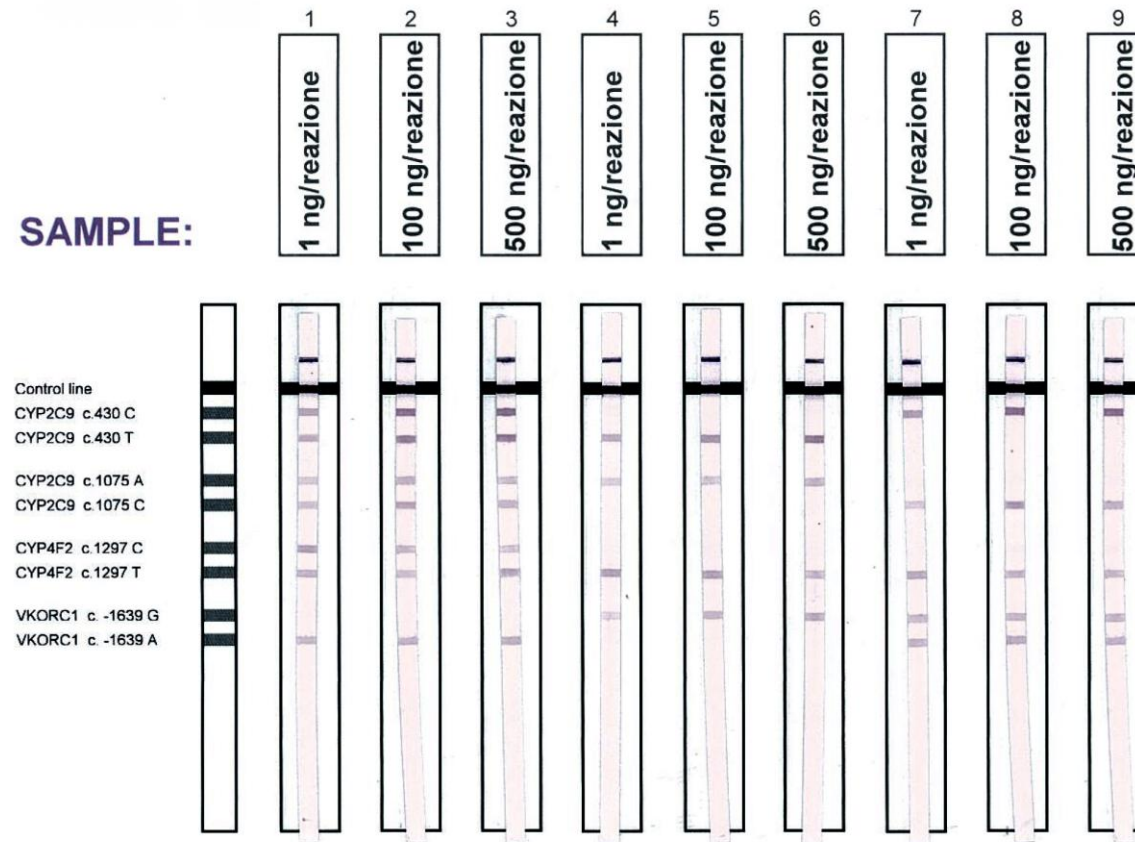


Fig. 4.6: risultati di sensibilità analitica del saggio RLB su DNA genomico. Lane 1, 2 e 3: campione 5_LBM; lane 4, 5 e 6: campione 32_LBM; lane 7, 8 e 9: campione 54_LBM.

SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA

Sono state condotte una serie di prove sperimentali volte a definire le condizioni ottimali di amplificazione in multiplex e di rivelazione su strip.

A tal scopo sono stati valutati differenti profili termici di amplificazione e, per quanto riguarda il saggio RLB, sono state testate le performance del metodo utilizzando diverse combinazioni di reagenti (tipologia delle soluzioni di ibridazione e di lavaggio stringente), variando i tempi di incubazioni delle strip con i prodotti di amplificazione, cambiando le quantità di sonda spottata ed infine, usando diverse coppie di sonde sequenza-specifiche al fine di garantire la massima specificità ed evitare cross-ibridazioni aspecifiche.

Tale fase di messa a punto ha richiesto un notevole impegno sia progettuale che tecnico in quanto il metodo, essendo un saggio di discriminazione allelica basato su sonde che discriminano sequenze che differiscono per una singola base, è fortemente influenzato da tutta una serie di parametri sperimentali che condizionano il legame *probe/DNA-target* (Par. 3.5).

Una volta progettate le otto sonde ASO, due per ciascun polimorfismo indagato, sono state quindi condotte numerose prove sia per valutare l'influenza dei parametri descritti in Tabella. 3.8 sul risultato finale che per definire la temperatura ottimale a cui svolgere il saggio.

Particolare attenzione è stata focalizzata sulla progettazione delle sonde: nel caso delle *probes* volte ad identificare i polimorfismi del gene CYP2C9, infatti, è stato necessario disegnare più volte gli oligonucleotidi adottando particolari accorgimenti tecnici, a causa di problemi di segnale evidenti soprattutto con alcuni campioni (assenza di segnale probe 3: campioni 6_LBM e 32_LBM; segnale aspecifico probe 3: campioni 27_LBM e 54_LBM).

Una volta messo a punto il protocollo sperimentale (Tab. 3.9) e definita la sensibilità analitica del metodo (Fig. 4.5 e Fig. 4.6) si è proceduto valutando le performance del saggio analizzando un totale di 77 campioni geneticamente eterogenei e precedentemente genotipizzati con sistema in Real-Time come già descritto nel Paragrafo 3.1.

Le prove sono state effettuate sia in manuale utilizzando lo strumento Thermoshaker PST-60HL (Biosan) sia in automatico con lo strumento AUTOBLOT 3000H (MedTEC).

Per ciascuno dei campioni indagati, il dato genetico è stato confermato dal saggio RLB sviluppato in questo lavoro di dottorato (Fig. 4.7).

La genotipizzazione dei polimorfismi: rs1799853 (c.430 C>T, Cys144Arg, CYP2C9*2), rs1057910 (c.1075 A>C, Ile359Leu, CYP2C9*3), rs2108622 (c.1297 C>T, Val433Met, CYP4F2*3) e rs9923231 (c.-1639 G>A, VKORC1) con il dispositivo in esame è risultata concorde al 100% al dato fornito dal laboratorio di provenienza per tutti i 77 campioni analizzati.

Per valutare la riproducibilità del saggio, un prototipo del kit è stato inviato al Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova dove sono stati testati 47 campioni precedentemente genotipizzati e selezionati per essere informativi ad indagare la capacità del test di identificare correttamente tutte le varianti alleliche possibili. Le prove sono state condotte in manuale con lo strumento Thermoshaker PST-60HL (Biosan). Anche in tal caso, per tutti i campioni analizzati è stato riportato dal kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE un risultato identico a quello ottenuto con il metodo di riferimento utilizzato presso il Laboratorio di Biochimica Clinica e Biologia Molecolare Clinica dell'Azienda Ospedaliera di Padova.

Per il dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE è stato quindi possibile calcolare un valore di sensibilità e specificità diagnostica del 100%, esprimibile anche come accuratezza del 100% ossia numero di genotipizzazioni corrette sul totale delle genotipizzazioni effettuate (osservato/atteso). Sia nel caso della validazione interna che di quella esterna il DNA genomico è stato amplificato utilizzando la miscela di reazione M2 secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.3 (Tab. 3.4), mentre il saggio RLB è stato condotto secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.5 (Tab. 3.9) utilizzando come supporto di spottaggio delle *probes* la membrana per blotting in nylon a carica positiva.

Per tutti i 125 campioni indagati (77 campioni usati per la validazione interna, 47 campioni usati per la validazione esterna, 1 controllo positivo) è stato possibile analizzare la distribuzione dei genotipi di ciascun polimorfismo e calcolare le relative frequenze genotipiche ed alleliche (Tab. 4.1). Le frequenze alleliche attese sono state calcolate sulla base dei dati riportati nei *database* UCSC e dbSNP.

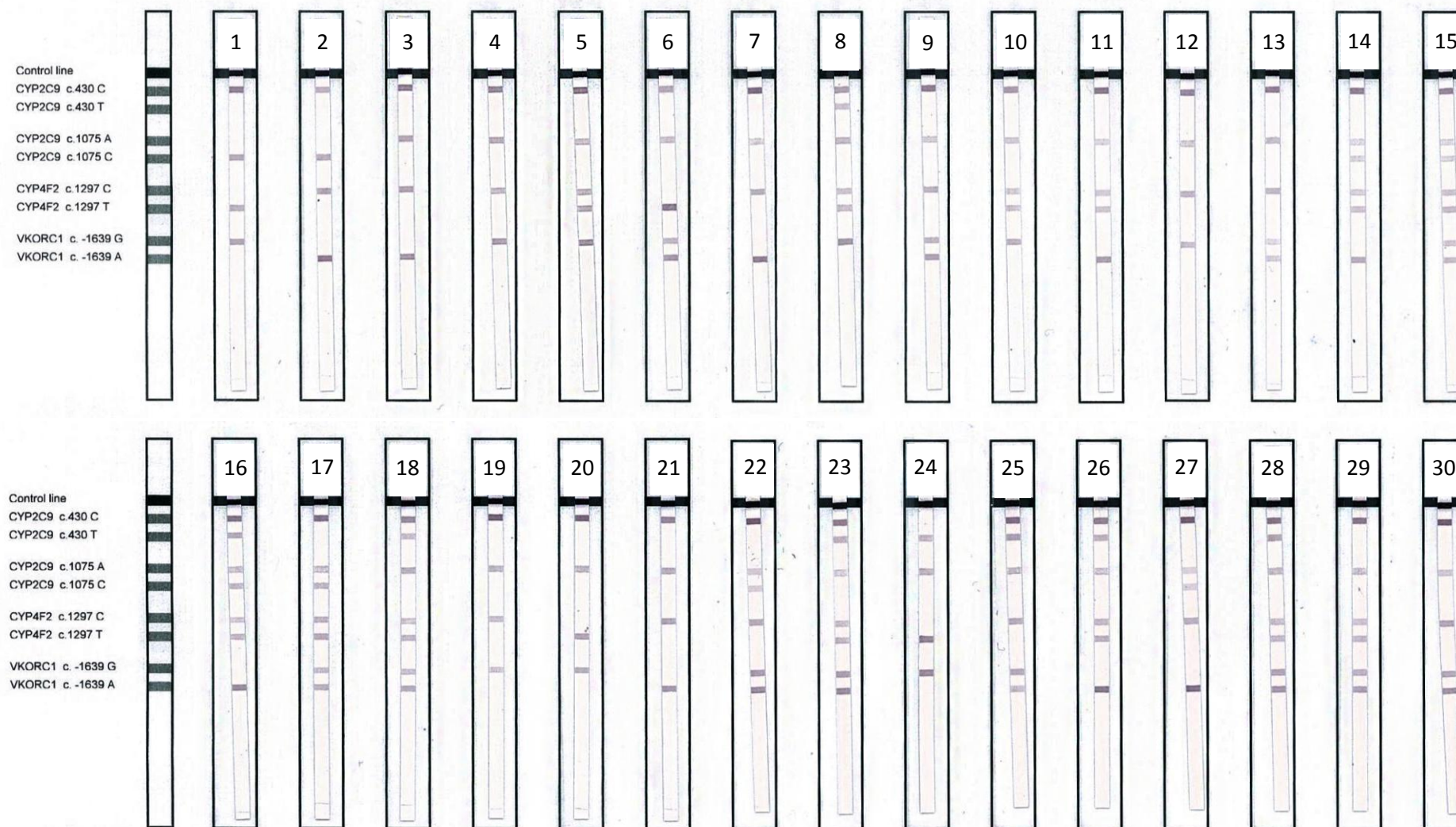


Fig. 4.7: esempi di risultati ottenuti su 30 campioni utilizzati in fase di validazione utilizzando la mix reazione M2 e la membrana per blotting in nylon a carica positiva. Lane 1-15: campioni 20_LBM, 27_LBM, 46_LBM, 59_LBM, 57_LBM, 61_LBM, 64_LBM, 53_LBM, 72_LBM, 73_LBM, 75_LBM, 1_LBM, 2_LBM, 3_LBM, 4_LBM. Lane 16-30: campioni 5_LBM, 8_LBM, 9_LBM, 10_LBM, 12_LBM, 13_LBM, 21_LBM, 26_LBM, 6_LBM, 38_LBM, 49_LBM, 41_LBM, 45_LBM, 58_LBM, 69_LBM (Appendice A).

Tab. 4.1: tabella riassuntiva della distribuzione dei polimorfismi rs1799853 e rs1057910 del gene CYP2C9, rs2108622 del gene CYP4F2 e rs9923231 del gene VKORC1 e delle corrispondenti frequenze genotipiche ed alleliche.

SNP	Genotipo	N° Campioni Validazione Interna	N° Campioni Validazione Esterna	N° Campioni Totali	Frequenza Genotipica Osservata	Frequenza Allelica Osservata	Frequenza Allelica Attesa
rs1799853 (CYP2C9 c.430 C>T)	CC	55	28	83	0.67	f(C) = 0.82 f(T) = 0.18	f(C) = 0.91 f(T) = 0.09
	CT	21	17	38	0.30		
	TT	2	2	4	0.03		
rs1057910 (CYP2C9 c.1075 A>C)	AA	32	60	92	0.74	f(A) = 0.82 f(C) = 0.18	f(A) = 0.95 f(C) = 0.05
	AC	10	11	21	0.16		
	CC	6	6	12	0.10		
rs2108622 (CYP4F2 c.1297 C>T)	CC	27	29	56	0.45	f(C) = 0.66 f(T) = 0.34	f(C) = 0.78 f(T) = 0.22
	CT	15	38	53	0.42		
	TT	6	10	16	0.13		
rs9923231 (VKORC1 c.-1639 G>A)	GG	13	24	37	0.30	f(G) = 0.5 f(A) = 0.5	f(G) = 0.57 f(A) = 0.43
	GA	15	36	51	0.40		
	AA	20	17	37	0.30		
				125			

GENE	Composizione Allelica	N° Campioni Validazione Interna	N° Campioni Validazione Esterna	N° Campioni Totali	Frequenza Genotipica Osservata	Frequenza Allelica Osservata	Frequenza Allelica Attesa
CYP2C9	*1*1	40	16	56	0.45	f(*1) = 64%	f(*1) = 80% - 100%
	*1*2	18	14	32	0.26		
	*1*3	8	7	15	0.12	f(*2) = 18%	f(*2) = 10% - 20%
	*2*2	2	2	4	0.03		
	*3*3	6	6	12	0.09	f(*3) = 18%	f(*3) = < 10%
	*2*3	3	3	6	0.05		
				125			

4.2. STUDIO DI COMPATIBILITÀ

Le performance del dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 sono state anche analizzate variando i reagenti utilizzati sia nella fase di amplificazione che nella fase di rivelazione su strip, al fine di garantire una maggiore fruibilità di utilizzo del kit stesso.

In particolare sono state testate due differenti Taq Polimerasi (mix di reazione M1 e M3) secondo i protocolli riportati al Paragrafo 3.3 (Tab. 3.4) e una membrana in nitrocellulosa idrofoba come supporto solido su cui spottare le sonde sequenza-specifiche.

Le prove sperimentali sono state quindi condotte utilizzando la membrana in nylon in combinazione o con la mix di reazione M1 o con la mix di reazione M3 e la Mix di Reazione M2 in combinazione con la membrana per blotting idrofoba.

Complessivamente sono stati analizzati 50 campioni selezionati *ad hoc*, tra quelli precedentemente testati nelle prove di validazione interna, per essere informativi ad indagare tutte le possibili combinazioni dei quattro polimorfismi (Appendice A).

Le analisi eseguite utilizzando sia la mix di reazione M1 che la mix di reazione M3, lasciando invariati tutti gli altri componenti del kit, hanno mostrato risultati del tutto comparabili a quelli ottenuti in fase di validazione interna (Fig. 4.8 - Fig. 4.9). Dai dati ottenuti, inoltre, è emerso che la mix di reazione M3 garantisce delle migliori performance, in termini di efficienza di amplificazione, rispetto alla mix di amplificazione M1; questo è visibile valutando l'intensità del segnale delle bande che nel secondo caso è minore.

Le analisi eseguite utilizzando la membrana per blotting idrofoba, lasciando invariati gli altri parametri hanno evidenziato dei risultati addirittura migliori di quelli ottenuti in fase di validazione interna in termini di qualità del segnale su strip; le bande accese sono risultate, infatti, di colore più intenso assicurando una migliore discriminazione tra bande accese e bande spente e garantendo così una migliore interpretazione dei risultati (Fig. 4.10).

I dati ottenuti sono riportati nelle figure sottostanti.

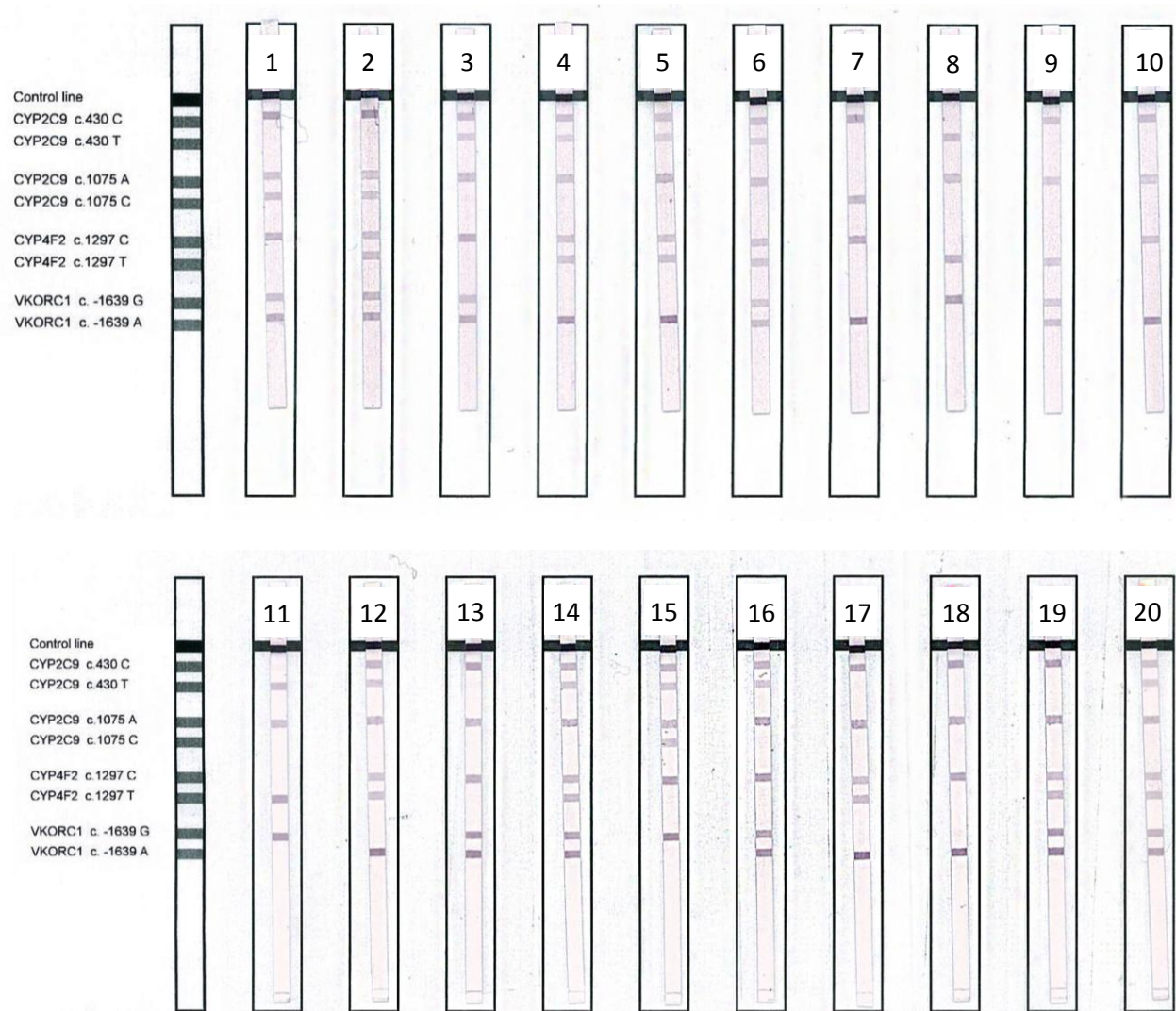


Fig. 4.8: risultati ottenuti dalle prove di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 utilizzando la mix di amplificazione M1 e la membrana in nylon a carica positiva. Lane 1-10: campioni 21_LBM, 22_LBM, 23_LBM, 24_LBM, 25_LBM, 26_LBM, 27_LBM, 6_LBM, 61_LBM, 125_LBM. Lane 11-20: campioni 32_LBM, 33_LBM, 35_LBM, 36_LBM, 37_LBM, 38_LBM, 40_LBM, 42_LBM, 43_LBM, 45_LBM (Appendice A).

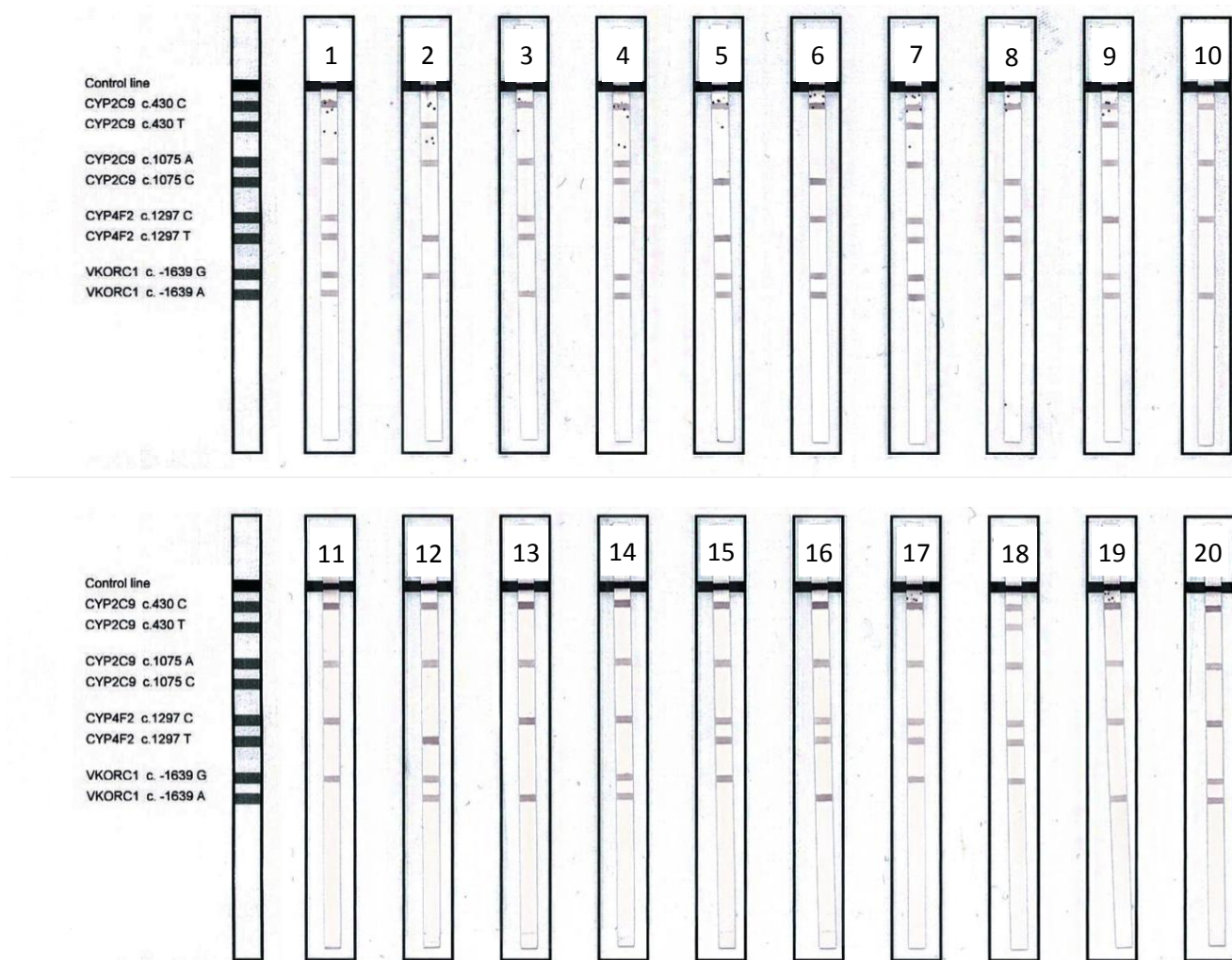


Fig. 4.9: risultati ottenuti dalle prove di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 utilizzando la mix di amplificazione M3 e la membrana in nylon a carica positiva. Lane 1-10: campioni 31_LBM, 32_LBM, 40_LBM, 52_LBM, 54_LBM, 56_LBM, 62_LBM, 66_LBM, 77_LBM, 42_LBM. Lane 11-20: campioni 59_LBM, 61_LBM, 64_LBM, 72_LBM, 73_LBM, 75_LBM, 57_LBM, 53_LBM, 46_LBM, 60_LBM (Appendice A).

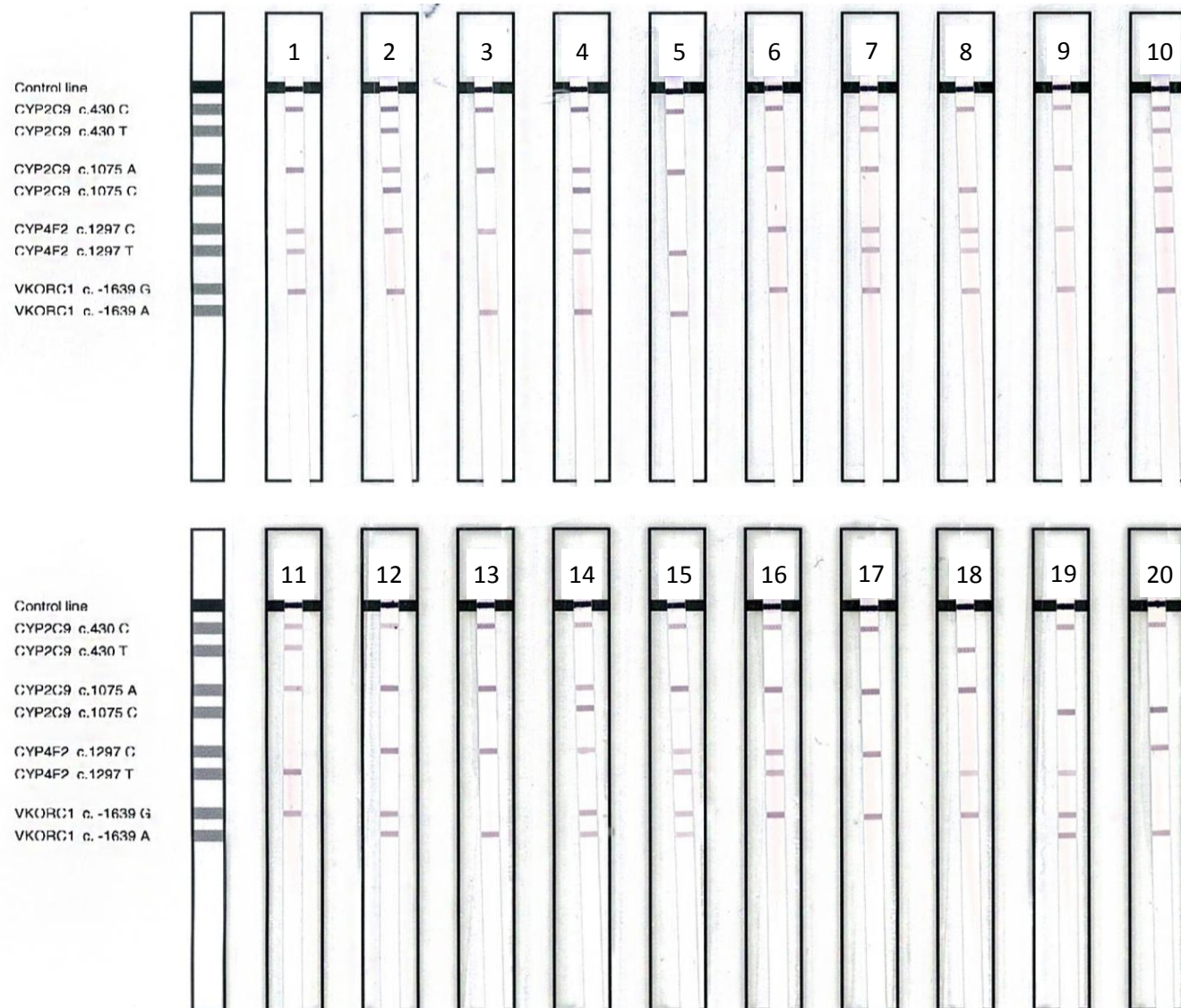


Fig. 4.10: risultati dello studio di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20, utilizzando la mix di reazione M2 e la membrana per blotting in nitrocellulosa idrofoba. Lane 1-10: campioni 44_LBM, 18_LBM, 125_LBM, 3_LBM, 48_LBM, 29_LBM, 53_LBM, 66_LBM, 19_LBM, 37_LBM. Lane 11-20: campioni 70_LBM, 2_LBM, 42_LBM, 52_LBM, 51_LBM, 57_LBM, 1_LBM, 6_LBM, 54_LBM, 27_LBM (Appendice A).

4.3. STUDIO DI STABILITÀ

In riferimento alla norma europea EN 13640:2002 relativa alle prove di stabilità dei reagenti diagnostici *in vitro*, è stato stilato un piano di stabilità allo scopo di poter definire la *shelf life* del prodotto GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20.

Le prove di stabilità sono state condotte a intervalli regolari di 1 mese per un periodo complessivo di 14 mesi e sono state effettuate in triplo variando l'operatore e i lotti dei reagenti utilizzati (*primers*, mix di amplificazione, DNA di riferimento, supporto di membrana, *probes* e soluzioni). Sono stati, quindi, allestiti tre kit di tre lotti diversi (A, B e C) utilizzando come reagenti quelli usati in fase di validazione (mix di reazione M2 e membrana in nylon a carica positiva), ma con lotti differenti in modo tale da favorire la massima variabilità possibile tra kit.

Come DNA di riferimento è stato utilizzato il campione 125_AB (controllo positivo del kit).

L'insieme dei dati ottenuti ha permesso di definire una *shelf life* di 12 mesi (Fig. 4.11).

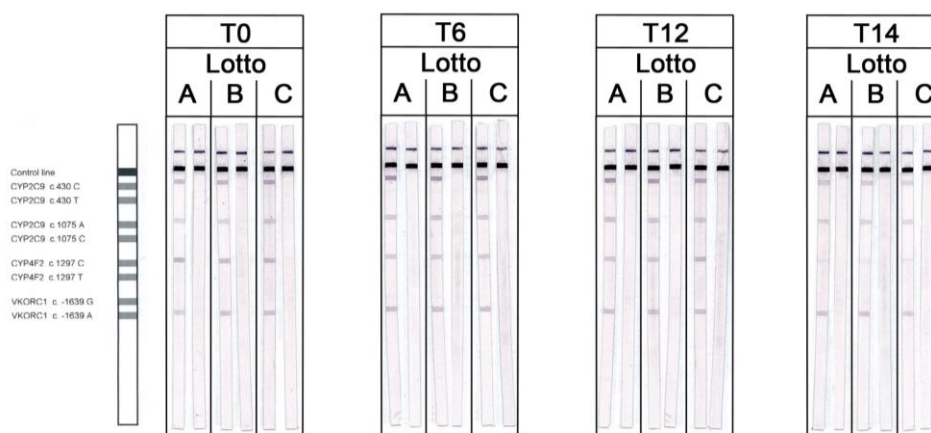


Fig. 4.11: risultati delle prove di stabilità del kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20. Sono riportati i dati relativi al controllo di qualità (T0) e alle prove di stabilità effettuate dopo 6 mesi (T6), 12 mesi (T12) e 14 mesi (T14). A 14 mesi, le prestazioni del dispositivo non sono conformi all'atteso in quanto la banda relativa alla sonda che identifica la variante allelica CYP4F2 c.1297 C è quasi del tutto assente in tutti e tre i lotti A, B e C. Per ciascun lotto, sono riportati il controllo positivo (campione 125_LBM) e il controllo negativo.

4.4. AB WARFARIN STRIP READER V1.0.0

E' stato sviluppato un software interpretativo da abbinare al dispositivo diagnostico GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 al fine di facilitare l'interpretazione del pattern di bande evidenziate sulla strip.

Per valutare l'operatività di tutte le funzioni del programma, è stato condotto un processo di validazione testando dei casi reali ed ipotetici in modo tale da vagliare sia ogni possibile combinazione genetica sia i casi per i quali è prevista una non idoneità del campione.

Sono stati testati un totale di 86 casi e per ciascuno l'esito della diagnosi è risultato congruente con l'atteso. La fase di validazione è stata quindi superata con successo.

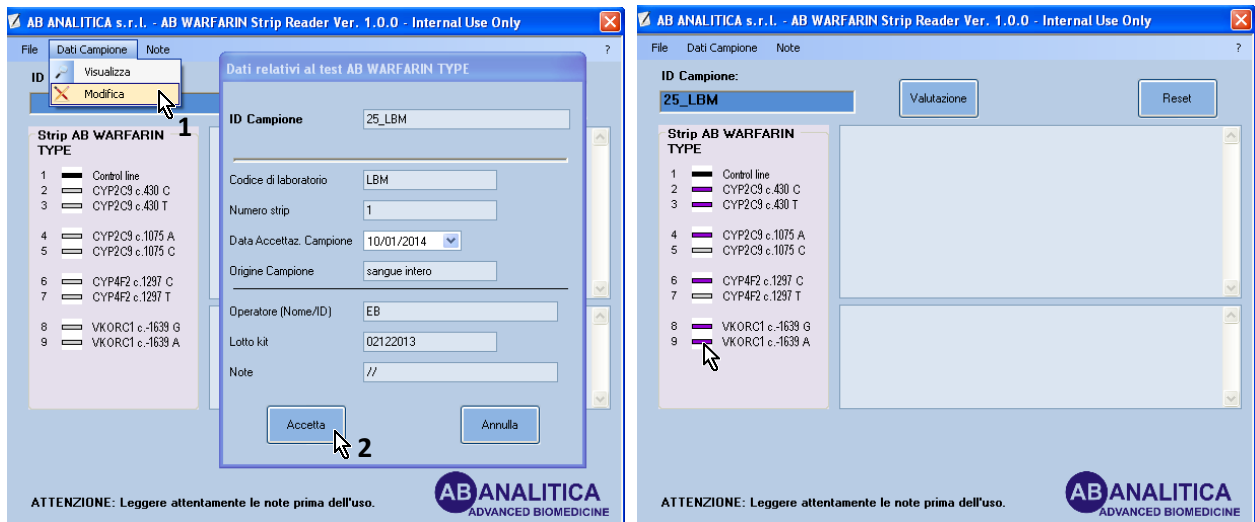


Fig. 4.12: il software si configura come una finestra principale che rappresenta l'interfaccia di utilizzo comune. Per mezzo di una finestra secondaria, accessibile via menù, è possibile inserire i dati identificativi del campione: codice identificativo del campione, laboratorio di provenienza del campione, data di accettazione del campione, origine del campione, lotto del kit, codice assegnato alla strip, codice identificativo dell'operatore che ha eseguito il test ed eventuali note aggiuntive. Cliccando con il mouse sul pulsante "Accetta" i dati del campione vengono inseriti nel software; è quindi possibile procedere riportando su file il pattern di bande visibile sulla strip semplicemente andando a cliccare con il mouse le bande virtuali, facendole passare da uno stato "off" incolore ad uno stato "on" di colore viola.

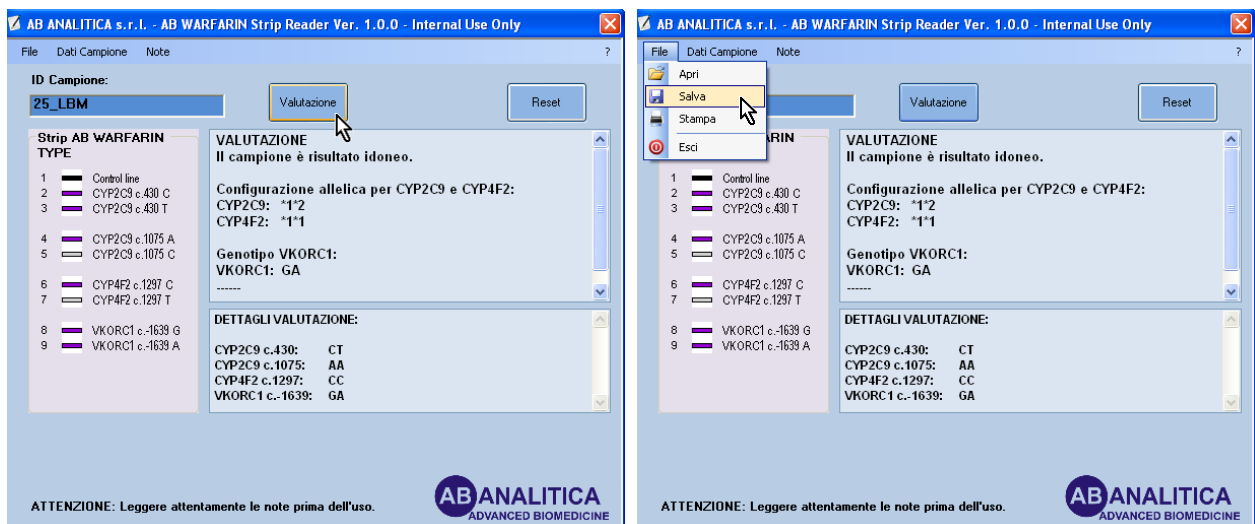


Fig. 4.13: cliccando sul pulsante "Valutazione", l'algoritmo interpretativo implementato sul software, verifica la compatibilità dei dati inseriti e fornisce una prima valutazione sintetica relativa alle varianti alleliche portate dal paziente ed anche un risultato dettagliato riguardante la configurazione genotipica per ciascuna posizione genomica indagata. E' possibile salvare e/o stampare la valutazione sotto forma di report in formato *.pdf.

25_LBM.pdf - Adobe Reader

File Modifica Vista Documento Strumenti Finestra ?

1 / 1 Trova 80%

Data: 30/12/10/01/2014 - 10.00

Report - Test di supporto per la definizione del dosaggio del Warfarin
GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE

ID Campione:	25_LBM	ID Operatore:	EB
Codice laboratorio:	LBM	Lotto kit:	02122013
Numero strip:	1		
Data accettaz. campione:	10/01/2014		
Origine campione:	sangue intero		
Note:	//		

Lettura	Campione
Control line	Control line
CYP2C9 c.430 C	CYP2C9 c.430 C
CYP2C9 c.430 T	CYP2C9 c.430 T
CYP2C9 c.1075 A	CYP2C9 c.1075 A
CYP2C9 c.1075 C	CYP2C9 c.1075 C
CYP4F2 c.1297 C	CYP4F2 c.1297 C
CYP4F2 c.1297 T	CYP4F2 c.1297 T
VKORC1 c.-1839 G	VKORC1 c.-1839 G
VKORC1 c.-1839 A	VKORC1 c.-1839 A

VALUTAZIONE
 Il campione è risultato idoneo.

Configurazione allelica per CYP2C9 e CYP4F2:
 CYP2C9: *1*2
 CYP4F2: *1*1

Genotipo VKORC1:
 VKORC1: GA

Report ad uso esclusivo del personale di laboratorio autorizzato.

AB ANALITICA s.r.l. - AB WARFARIN Strip Reader Ver. 1.0.0 - Internal Use Only Pagina: 1

Fig. 4.14: esempio di report, in versione stampabile, fornito dal software.

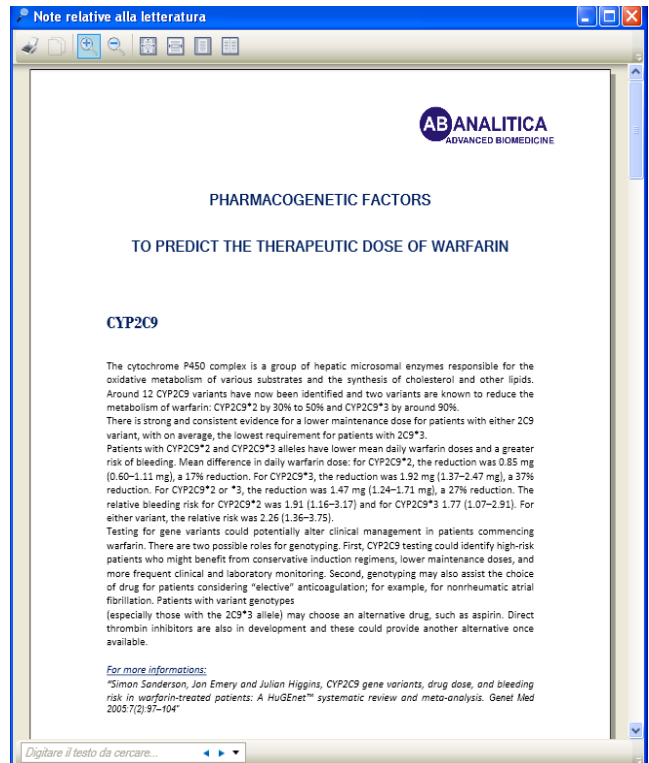
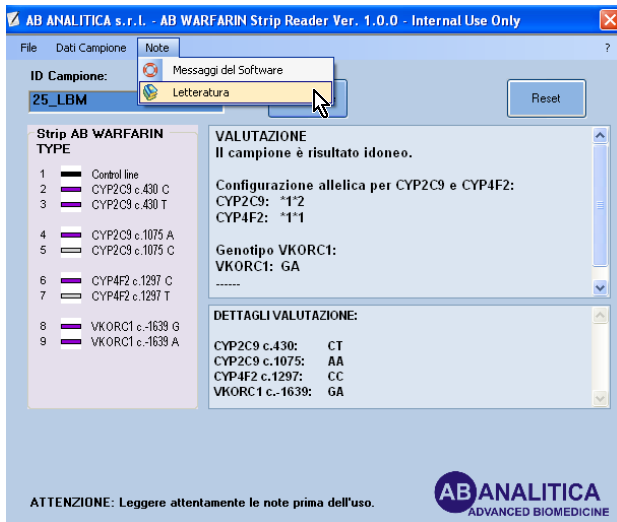


Fig. 4.15: accedendo via menù alla sezione “Letteratura” è possibile risalire a citazioni, note bibliografiche e tabelle esplicative, per ciascun polimorfismo indagato, che riassumono le conoscenze ad oggi sull’argomento e costituiscono una base scientifica di supporto al clinico per utilizzare al meglio il dato genetico.

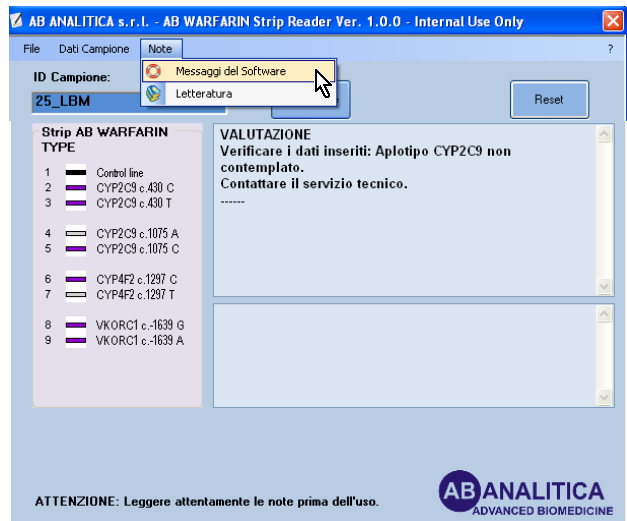
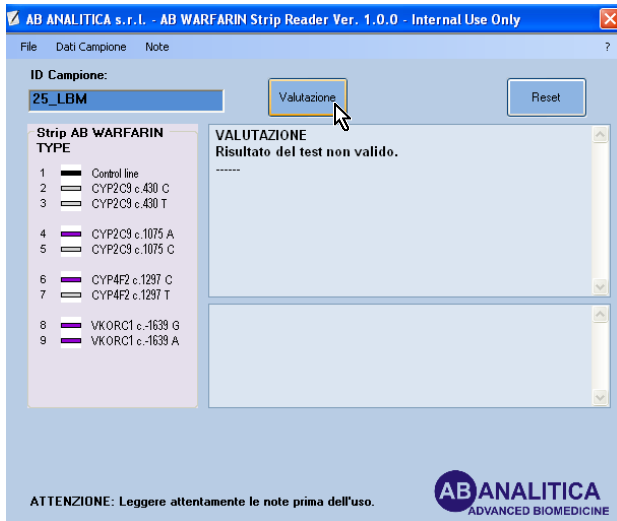


Fig. 4.16: nel caso in cui i dati inseriti fossero incompleti o non contemplati dall’algoritmo interpretativo, il software non fornisce alcun risultato parziale e invalida il test. Per approfondire il significato delle frasi riportate dal software è possibile cliccare su “Note” accedendo così alla sezione “Messaggi del Software”.

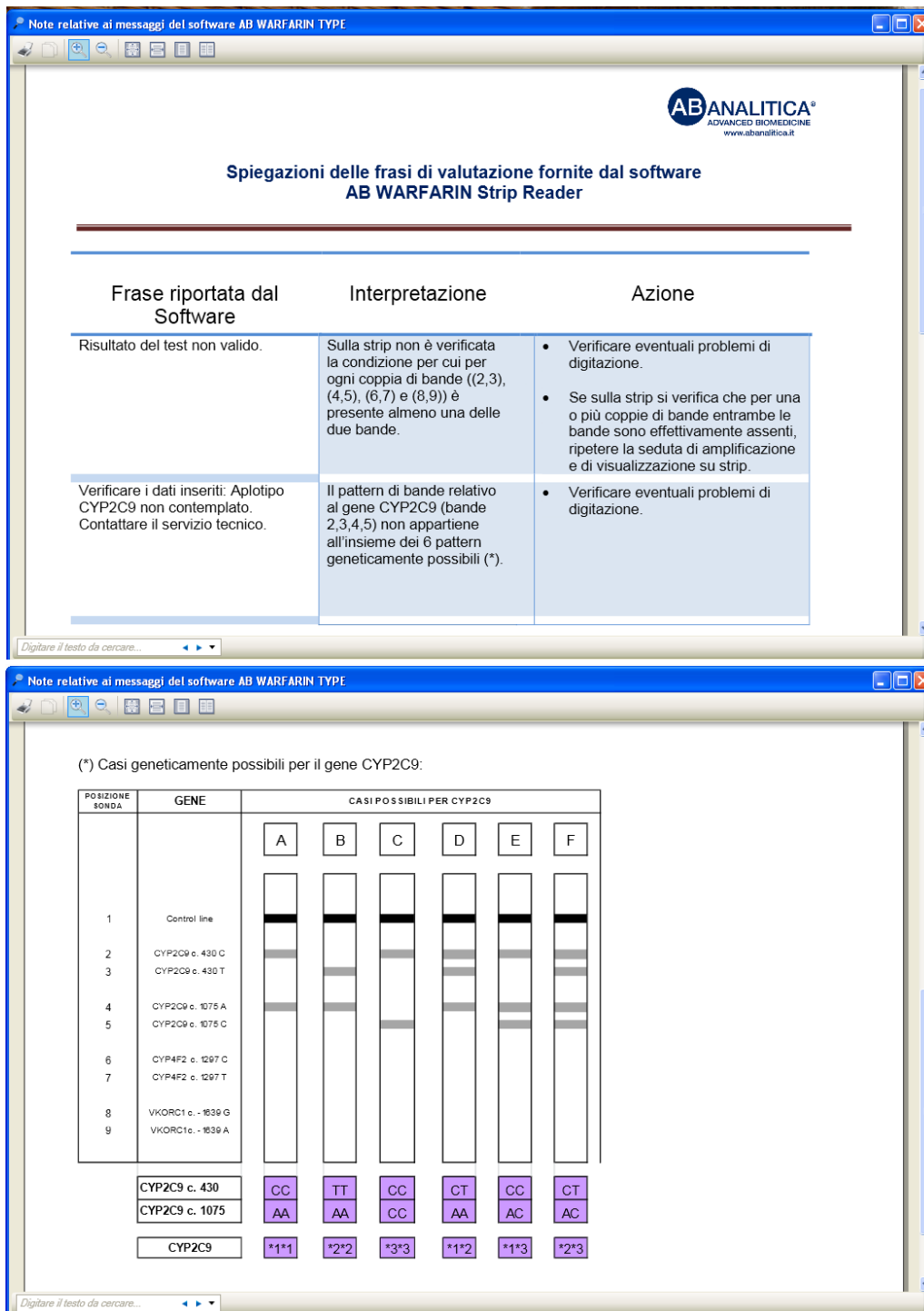


Fig. 4.17: esempi dei messaggi riportati dal software. A causa del *linkage disequilibrium*, le varianti alleliche CYP2C9*2 e CYP2C9*3 identificano due aplotipi caratterizzati rispettivamente dal polimorfismo rs1799853 (c.430 C>T) e rs1057910 (c.1075 A>C). L'annotazione genetica per l'aplotipo identificato dalla variante allelica CYP2C9*2 è definita come segue: CYP2C9*2 (c.430 T, c.1075 A) mentre l'aplotipo identificato dalla variante allelica CYP2C9*3 è definito come: CYP2C9*3 (c.430 C, c.1075 C). Ne deriva che, prendendo in considerazione tutti i possibili casi di combinazioni genetiche per le varianti *2 e *3, su nove combinazioni genetiche possibili, solo sei casi sono geneticamente verificati a meno di eventi mutazionali o di ricombinazione genetica che potrebbero modificare gli aplotipi noti. I casi attesi ma non osservati riguardano le combinazioni di bande in posizione: 3,5; 2,3,5; 3,4,5.

4.5. MARCATURA CE IVD

Il kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 è stato marcato **CE** ai sensi della direttiva 98/79/CE, come dispositivo diagnostico *in vitro* appartenente all'allegato III.

La marcatura **CE** indica la conformità del prodotto ai requisiti di efficacia e di sicurezza esposti nell'allegato I della normativa suddetta, recepita dal D.Lgs.332/2000 (Paragrafo. 1.4).

Per i dispositivi diagnostici non compresi nell'allegato II e non destinati ad essere usato come test autodiagnostici, la marcatura **CE IVD** segue un processo di autovalutazione da parte del fabbricante, di conformità CE, secondo le disposizioni elencate nell'allegato III, che garantiscono l'adempimento e il rispetto della normativa 98/79/CE.

L'autodichiarazione di conformità è stata predisposta preparando i seguenti documenti:

- 1) *la descrizione del prodotto (destinazione d'uso e caratteristiche funzionali: kit per l'identificazione simultanea dei polimorfismi più significativi per la determinazione della risposta farmacologica ai derivati cumarinici mediante ibridazione inversa allele specifica);*
- 2) *la documentazione del sistema di qualità (requisiti e disposizioni adottati dal fabbricante per garantire il sistema di qualità, documentati sotto forma di strategie e di procedure: parte dei documenti costituenti il dossier di prodotto);*
- 3) *le informazioni di progetto del dispositivo (materie prime, prestazioni e limiti del dispositivo);*
- 4) *le informazioni sul metodo di fabbricazione (descrizione delle tecnologie utilizzate);*
- 5) *il dossier di prodotto;*
- 6) *i risultati dell'analisi del rischio;*
- 7) *i dati di valutazione delle prestazioni (specificità e sensibilità analitiche e diagnostiche);*
- 8) *le etichette e il manuale di istruzione per l'uso;*
- 9) *la validazione di processo;*
- 10) *i risultati degli studi di stabilità;*

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' DEL FABBRICANTE*
*Declaration of conformity of the manufacturer**

Noi
We

AB ANALITICA srl
via Svizzera, 16
35127 Padova Italy

dichiariamo sotto la nostra esclusiva responsabilità, che il prodotto
declare in our own responsibility, that the following products:

GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE

Cod. n° 04-74A

CE

ai quali questa dichiarazione si riferisce, è conforme alla direttiva 98/79/CE del 27 Ottobre 1998 relativa ai dispositivi medico-diagnostici in vitro.

to whom this certificate refers are manufactured according to the regulations of the Directive 98/79/EC of 27 October 1998 on in vitro diagnostic medical device.

Data di notifica al Ministero della Salute: Padova 15 novembre 2013

Dott. Vincenzo Putrone
Amministratore Unico

V. Putrone

* In base all'allegato III
according to annex III

AB ANALITICA srl
via Svizzera, 16 - 35127 Padova
Tel ++39 049 761698 - Fax ++39 049 8709510 -
E-mail: info@abanalitica.it Sito: www.abanalitica.it

dichconform tipo rev290310

Fig. 4.18: dichiarazione di conformità del fabbricante per il dispositivo diagnostico in vitro GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20. La dichiarazione comprende i dati relativi al fabbricante, i dati utili a identificare/classificare il dispositivo (nome commerciale) e i dati relativi alla conformità CE (allegato III).



Fig. 4.19: presentazione del kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 nelle sue componenti costituenti: BOX P, BOX R e AB WARFARIN STRIP READER.

Il BOX P include i reagenti necessari all'amplificazione del DNA in formato premix: 20 provette da 0,2 ml pre-aliquotate con la mix di amplificazione + 1 aliquota di oligomix sufficiente per 20 test + 1 DNA di controllo.

Il BOX R contiene i componenti necessari alla fase di rilevazione su strip: soluzione di ibridazione HYB2, soluzione di lavaggio stringente COND2, soluzioni di lavaggio RIN e STOP, colorante NBT-BCIP sotto forma di tavolette da sciogliere in acqua, 20 strip saggio specifiche, 1 aliquota di soluzione denaturante DEN, 1 aliquota di streptavidina coniugata all'enzima fosfatasi alcalina CON, 3 vassoi, 1 manuale d'uso, 1 lucido interpretativo e 1 foglio per l'archivio delle strip.

Ciascun BOX è contraddistinto da un'etichetta informativa che riporta: l'*Intended Use* del dispositivo, il lotto e la scadenza del kit, i reagenti inclusi nel box, i lotti, la scadenza e la quantità dei reagenti, la temperatura di conservazione dei reagenti, il numero di test che il kit permette di effettuare, eventuali frasi o simboli di rischio in base alla norma EN 980:2003, il simbolo CE, l'indicazione IVD e i dati del fabbricante (ragione sociale).

Il software AB WARFARIN STRIP READER V1.0.0 è fornito sotto forma CD-ROM.

4.6. PRESTAZIONI DEL DISPOSITIVO DIAGNOSTICO IN VITRO GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20

SPECIFICITÀ ANALITICA

La specificità analitica del kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 è stata assicurata e garantita dalla scelta accurata e specifica di *primers* e *probes*, nonché dall'utilizzo di condizioni di genotipizzazione stringenti.

I *primers* e le *probes* sono stati allineati con l'intero genoma utilizzando il software "blat" implementato nel database UCSC (*Human Genome Browser*) al fine di escludere appaiamenti aspecifici con sequenze omologhe o con identità di sequenza superiore al 90% alle sequenze di interesse.

La sequenza a cavallo di ciascun polimorfismo è stata poi amplificata utilizzando una PCR SSP e i prodotti di amplificazione sono stati analizzati mediante sequenziamento diretto per confermare l'appaiamento univoco dei *primers* al genoma.

Come appare evidente dalle Fig. 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23, in cui sono riportati i risultati del sequenziamento, per ciascun polimorfismo indagato, l'elettroferogramma è definito e privo di rumore di fondo ad indicare che la reazione di amplificazione è stata specifica e sono state amplificate solo le regioni di interesse

SENSIBILITÀ ANALITICA

Sono state condotte sia delle prove di sensibilità analitica che di sovraccarico del test al fine di valutare da un lato la concentrazione minima di DNA con cui il saggio è in grado di fornire una corretta genotipizzazione di tutti i polimorfismi indagati e dall'altro la concentrazione di DNA massima con cui il test permette di identificare in modo univoco e senza cross-ibridazioni aspecifiche ciascuna variante allelica indagata.

La sensibilità analitica del metodo è stata indagata su amplificati ottenuti da diluizioni seriali di DNA genomico umano concentrato 100 ng/μl successivamente amplificato utilizzando, come miscela di reazione, la mix M3 secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.3 (Tab. 3.6). Il DNA è stato ottenuto da campioni eterogenei e informativi per i polimorfismi rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B e rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA (campioni 160_AB, 14_DIMED, 25_DIMED, 27_DIMED e 55_LEM, Appendice B).

Il saggio RLB è stato condotto con lo strumento automatico AUTOBLOT 3000H (MedTEC) secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.5 (Tab. 3.10), utilizzando come supporto di spottaggio delle *probes* la membrana per blotting in nitrocellulosa idrofoba.

Come si può notare dalle Figure 4.24 e 4.25, il kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 ha dimostrato di garantire una corretta genotipizzazione di tutti i polimorfismi indagati, utilizzando quantità di DNA di partenza molto eterogenee, comprese in un *range* che va da 0,5 ng/μl a 200 ng/μl. I risultati ottenuti hanno permesso di definire una sensibilità analitica del test di 1ng/reazione e un limite massimo di concentrazione di DNA di 400 ng/reazione (Fig. 4.24 e 4.25).

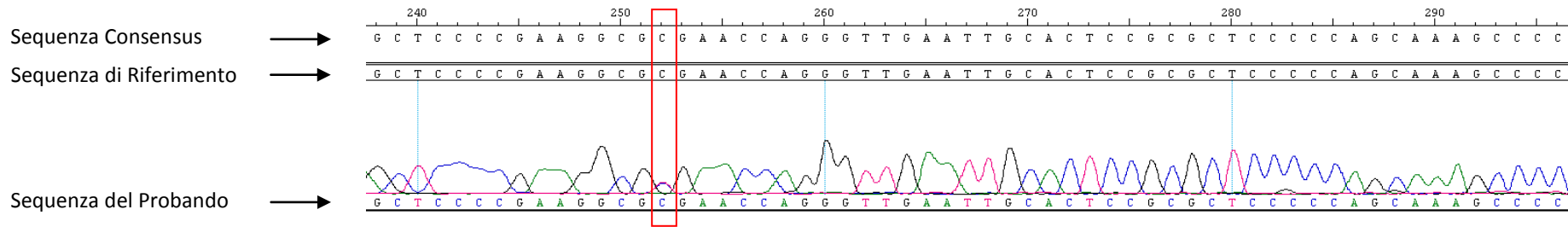


Fig. 4.20: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs12979860 C>T**, evidenziato in rosso, del gene IL28B. Il probando è eterozigote C/T.

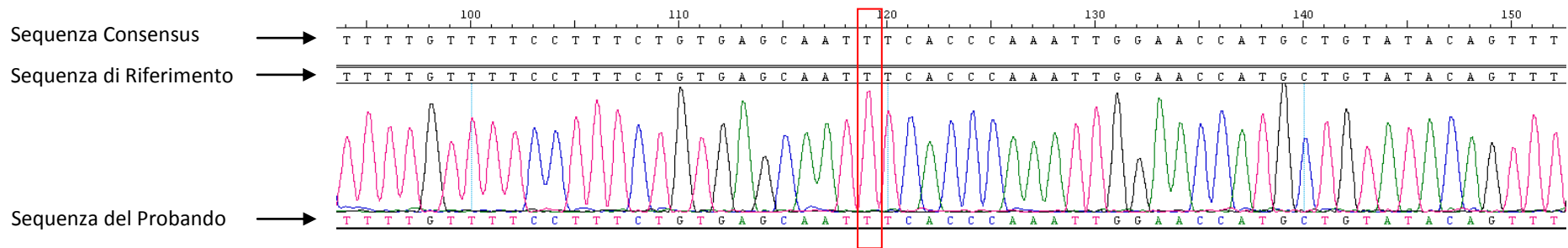


Fig. 4.21: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP **rs8099917 T>G**, evidenziato in rosso, del gene IL28B. Il probando è omozigote T/T (*wild-type*).

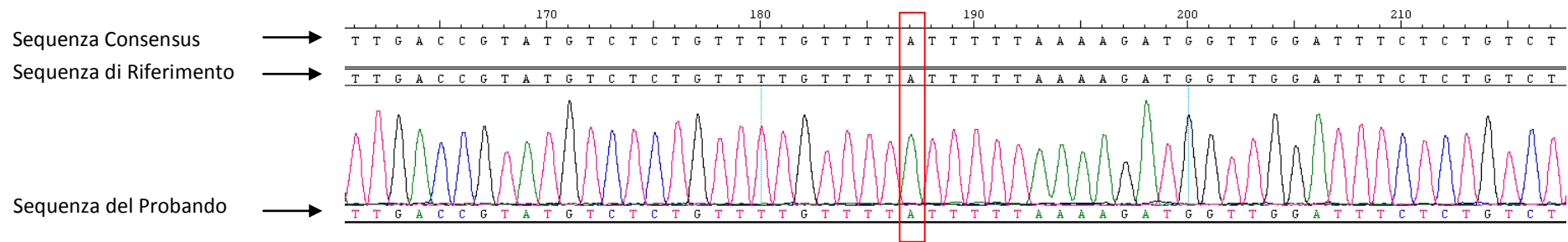


Fig. 4.22: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP rs7270101 A>C, evidenziato in rosso, del gene ITPA. Il probando è omozigote A/A (*wild-type*).

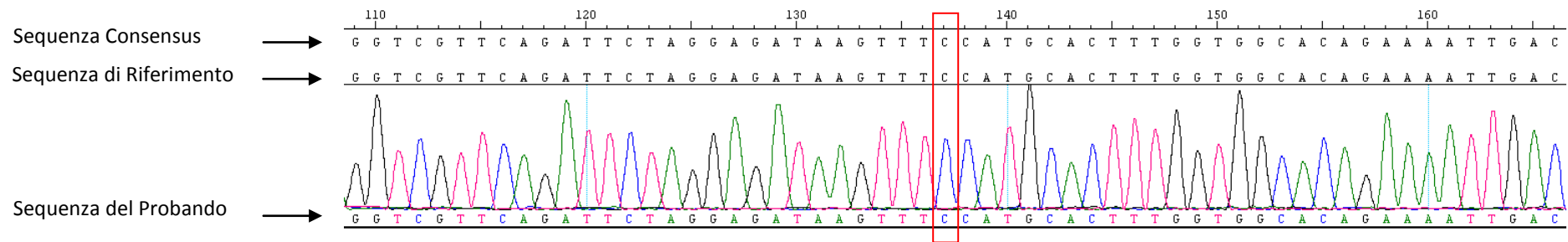


Fig. 4.23: elettroferogramma della sequenza a cavallo dello SNP rs1127354 C>A, evidenziato in rosso, del gene ITPA. Il probando è omozigote C/C (*wild-type*).

SAMPLE:

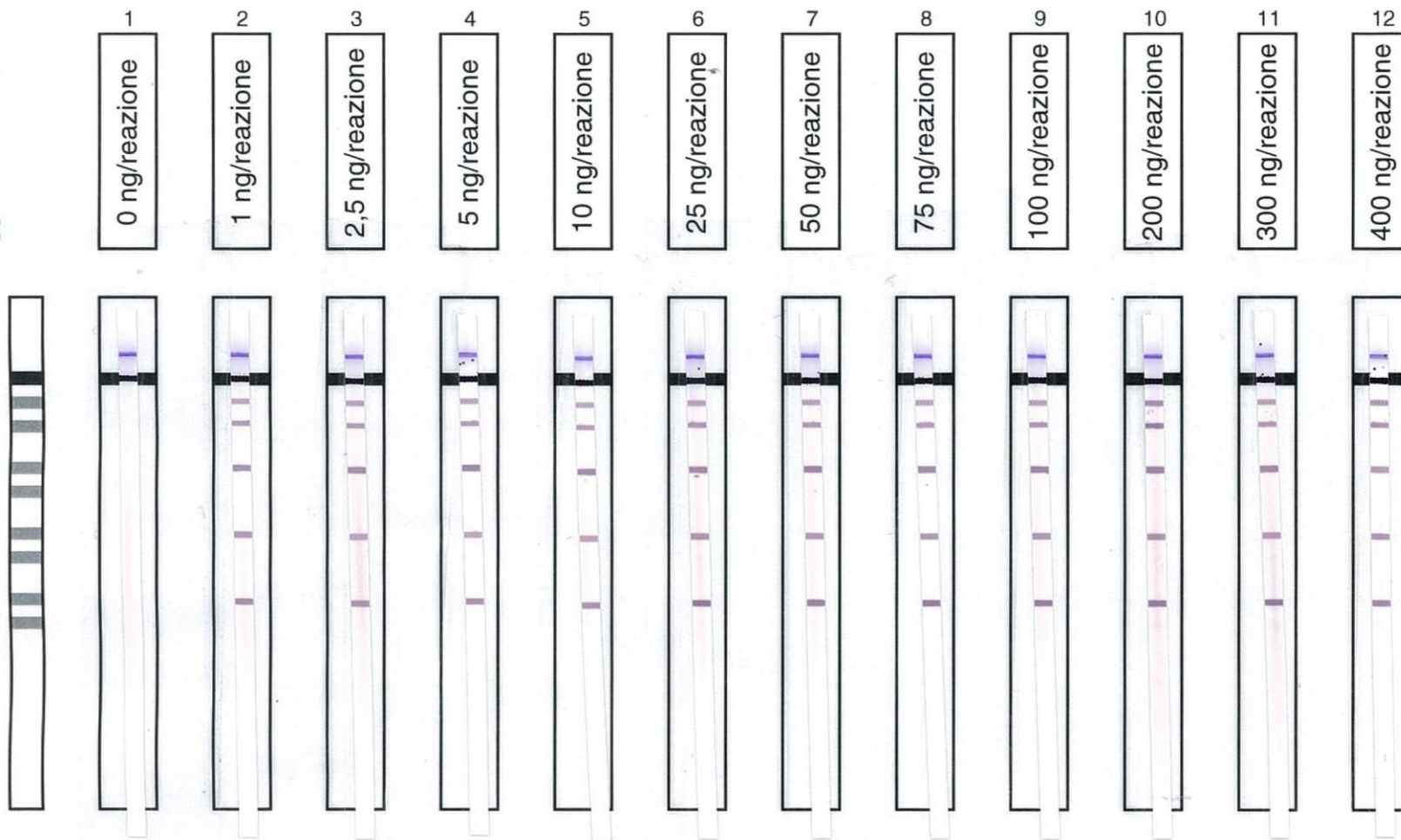


Fig. 4.24: risultati di sensibilità analitica del saggio RLB su DNA genomico (campione 160_AB, Appendice B, controllo positivo del kit).

SAMPLE:

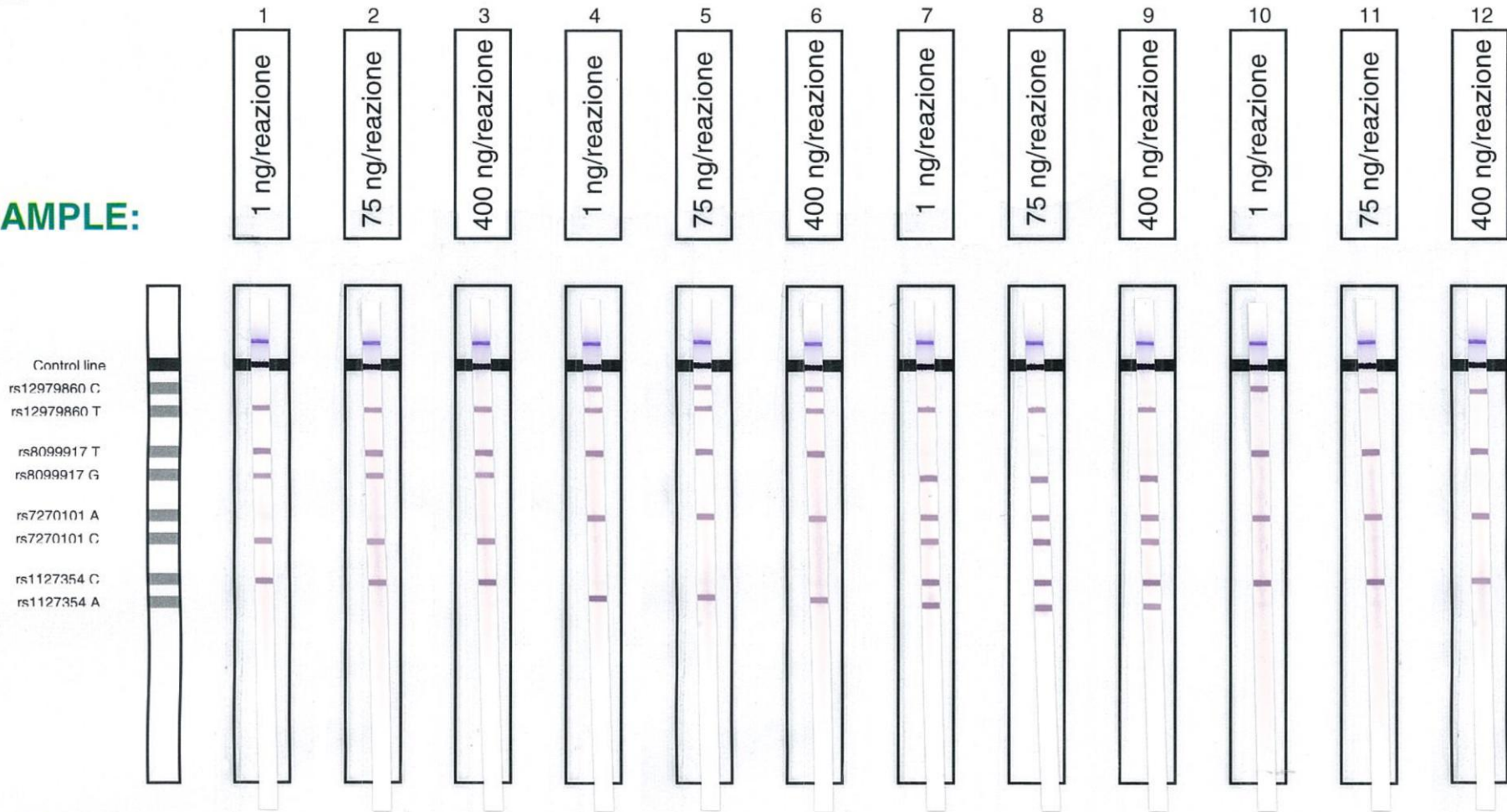


Fig. 4.25: risultati di sensibilità analitica del saggio RLB su DNA genomico. Lane 1, 2 e 3: campione 55_LEM; lane 4, 5 e 6: campione 14_DIMED; lane 7, 8 e 9: campione 27_DIMED; lane 10, 11 e 12: campione 25_DIMED.

SPECIFICITÀ DIAGNOSTICA E SENSIBILITÀ DIAGNOSTICA

Le condizioni sperimentali della metodica sono state messe a punto per mezzo di numerose prove condotte testando da un lato profili termici di amplificazione in multiplex differenti e dall'altro modificando ad uno ad uno i parametri noti per influenzare le performance del saggio RLB (Tab. 3.8).

In particolare sono stati paragonati i risultati ottenuti usando profili di amplificazione Touch Down Vs. Standard e profili Standard che differivano nella temperatura di annealing o nel numero di cicli; sono state confrontate, inoltre, le prestazioni del saggio RLB variando la temperatura di incubazione di $\pm 2^{\circ}\text{C}$ rispetto alla temperatura di ibridazione predetta sulla base della sequenza delle sonde ASO e variando i tempi e il numero dei lavaggi stringenti. Al fine poi di ottenere un segnale intenso abbassando al minimo il rischio di cross-ibridazione ed ibridazioni aspecifiche è stata testata la funzionalità di diverse coppie di sonde per ciascun polimorfismo calibrando attentamente la quantità di sonda spottata.

Una volta messo a punto il protocollo sperimentale e definita la sensibilità analitica del metodo, sono state valutate le prestazioni del metodo su 160 campioni geneticamente eterogenei e precedentemente genotipizzati con un metodo di riferimento come descritto nel Paragrafo 3.1.

La validazione del dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA cod. 04-47A-20 è stata condotta utilizzando come miscela di reazione M3 secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.3 (Tab. 3.6) e, come supporto per le *probes*, la membrana per blotting in nitrocellulosa idrofoba secondo il protocollo riportato nel Paragrafo 3.5 (Tab. 3.10).

Le prove sono state effettuate sia in manuale utilizzando lo strumento Thermoshaker PST-60HL (Biosan) sia in automatico con lo strumento AUTOBLOT 3000H (MedTEC).

Nella Fig. 4.26 è riportata una parte dei risultati ottenuti.

Per tutti i campioni analizzati, il dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 ha fornito un risultato identico a quello ottenuto con il metodo di riferimento. Il polimorfismo rs12979860 nel gene IL28B è stato correttamente genotipizzato dal dispositivo in esame in tutti i 160 campioni utilizzati nello studio; la genotipizzazione del polimorfismo rs8099917 nel gene IL28B è risultata concorde a quella fornita dal laboratorio di riferimento per tutti i 53 campioni di cui era noto il dato genetico; infine i polimorfismi rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA sono stati correttamente identificati nei 108 campioni per i quali era disponibile la genotipizzazione degli SNPs in esame.

E' stato pertanto possibile calcolare per il dispositivo in validazione un valore di sensibilità/specificità diagnostica del 100%.

Per tutti i 160 campioni indagati è stato possibile analizzare la distribuzione dei genotipi di ciascun polimorfismo e calcolare le relative frequenze genotipiche ed alleliche (Tab. 4.2).

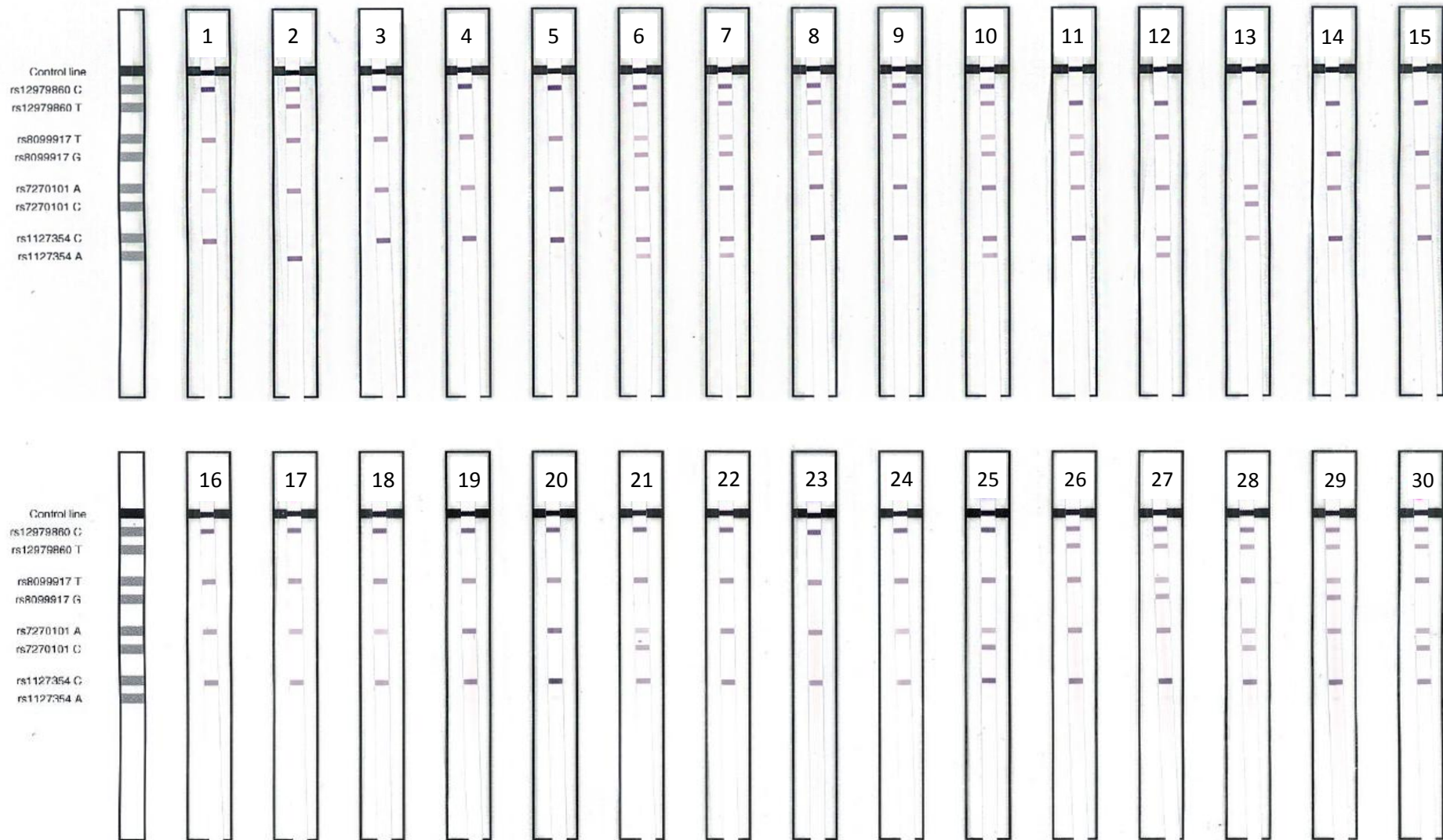


Fig. 4.26: esempi di risultati ottenuti con il dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 su 30 campioni, analizzati in fase di validazione, utilizzando la mix di reazione M3 e la membrana in nitrocellulosa idrofoba. Lane 1-15: campioni 80_LEM, 14_DIMED, 82_LEM, 83_LEM, 84_LEM, 85_LEM, 86_LEM, 87_LEM, 88_LEM, 89_LEM, 90_LEM, 91_LEM, 92_LEM, 93_LEM, 94_LEM. Lane 16-30: campioni 95_LEM, 96_LEM, 97_LEM, 98_LEM, 99_LEM, 100_LEM, 101_LEM, 102_LEM, 103_LEM, 104_LEM, 105_LEM, 106_LEM, 107_LEM, 108_LEM, 109_LEM (Appendice B).

Tab. 4.2: tabella riassuntiva della distribuzione dei polimorfismi dei geni IL28B ed ITPA nel campione indagato e delle corrispettive frequenze genotipiche ed alleliche. Le frequenze alleliche attese sono state calcolate sulla base dei dati riportati nel *database* UCSC.

GENE	SNP	Genotipo	N° Campioni Validazione Interna	Frequenza Genotipica Osservata	Frequenza Allelica Osservata	Frequenza Allelica Attesa
IL28B	rs12979860 C>T	CC	37	0.23	f(C) = 0.49 f(T) = 0.51	f(C) = 0.65 f(T) = 0.35
		CT	85	0.53		
		TT	38	0.24		
	rs8099917 T>G	TT	66	0.41	f(T) = 0.67 f(G) = 0.43	f(T) = 0.88 f(G) = 0.12
		TG	81	0.51		
		GG	13	0.08		
ITPA	rs7270101 A>C	AA	127	0.80	f(A) = 0.89 f(C) = 0.12	f(A) = 0.91 f(C) = 0.09
		AC	30	0.18		
		CC	3	0.02		
	rs1127354 C>A	CC	141	0.88	f(C) = 0.93 f(A) = 0.07	f(C) = 0.94 f(A) = 0.06
		CA	18	0.11		
		AA	1	0.01		
			160			

4.7. ANALISI DI CORRELAZIONE GENOTIPO-FENOTIPO

Per i campioni 1_DIMED – 52_DIMED è stato possibile risalire al dato clinico relativo all'*outcome* terapeutico ed ai livelli di emoglobina nel corso del trattamento con PEG-IFN/RBV.

Si è quindi proceduto eseguendo un'analisi di correlazione genotipo-fenotipo al fine di confermare i dati riportati in letteratura sulla correlazione tra polimorfismi rs12979860 e rs8099917 del gene IL28B e la risposta alla terapia e tra i polimorfismi rs7270101 e rs1127354 del gene ITPA e il rischio di manifestare un'anemia emolitica cronica indotta da Ribavirina.

Per valutare la prima ipotesi è stata compilata una tabella di contingenza inserendo i dati relativi al genotipo in corrispondenza dei polimorfismi rs12979860 e rs8099917 del gene IL28B e all'*outcome* terapeutico, stratificando i pazienti per genotipo virale (GT HCV) (Tab. 4.3).

Tab. 4.3: *outcome* terapeutico della popolazione suddivisa sulla base del genotipo virale.

	HCV GT 1-4	HCV GT 2-3	TOT
N° Pazienti	33	19	52
SVR	9	14	23
% SVR	27%	74%	44%
NR (Non Responders)	16	0	16
% NR	48%	0%	31%
RR (Relapsers)	8	5	13
% RR	24%	26%	25%

Dall'analisi dei tipi di risposta ottenuti con la terapia antivirale standard (SOC), 23 pazienti (44%) hanno raggiunto la SVR (*Sustained Virological Response*, HCV-RNA negativo alla 24^{ma} settimana dalla fine del trattamento), mentre in 29 pazienti la terapia si è dimostrata inefficace (16 soggetti *non responders* e 13 pazienti *relapsers*).

Stratificando i pazienti per genotipo virale, il 74% dei pazienti HCV GT 2-3 ha raggiunto la SVR contro il 27% dei soggetti HCV GT 1-4 e, tra questi, rispettivamente il 48% e il 24% non ha risposto o ha risposto solo parzialmente al trattamento.

I dati raccolti riflettono quindi le evidenze riportate in letteratura in merito alla maggior efficacia della terapia standard nei pazienti HCV GT 2-3; le infezioni a carico dei genotipi HCV 1-4 sono più difficili da trattare e di conseguenza i soggetti con epatite C da HCV GT 1-4 risultano con più probabilità refrattari al trattamento.

Tab. 4.4: *outcome* terapeutico della popolazione stratificando i pazienti sulla base del genotipo virale (HCV GT 1-4) e dei genotipi a livello dei polimorfismi del gene IL28B.

Popolazione		SVR		NR		RR		Tot.
		Intera	HCV GT 1-4	intera	HCV GT 1-4	intera	HCV GT 1-4	
rs12979860 C>T	C/C	8	2	1	1	5	3	14
	C/T	11	6	11	11	7	5	29
	T/T	4	1	4	4	1	0	9
rs8099917 T>G	T/T	11	3	3	3	7	4	21
	T/G	10	5	10	10	5	4	25
	G/G	2	1	3	3	1	0	6

Nella valutazione dello SNP rs12979860, il 27% (14/52), il 56% (29/52) e il 17% (9/52) dei pazienti presenta rispettivamente il genotipo C/C, C/T e T/T. Per quanto riguarda lo SNP rs8099917 invece, il 40% (21/52) dei pazienti presenta il genotipo T/T, il 48% (25/52) è T/G e il 12% (6/52) è G/G. Nel campione analizzato, quindi, la maggior parte dei pazienti, indipendentemente dal genotipo virale, è portatore in eterozigosi di almeno uno dei due polimorfismi.

L'SVR è stata raggiunta nel 57% dei pazienti rs12979860-CC, nel 38% dei soggetti rs12979860-CT e nel 44% dei soggetti rs12979860-TT; per quanto riguarda lo SNP rs8099917, invece, l'SVR è stata raggiunta nel 52% dei soggetti T/T, nel 40% dei soggetti T/G e nel 33% dei soggetti G/G.

Per il 43% e il 48% dei pazienti omozigoti per la variante allelica favorevole rispettivamente rs12979860-C e rs8099917-T, la terapia si è dimostrata inefficace.

La numerosità esigua della popolazione analizzata non ha permesso di trarre delle conclusioni statisticamente significative in merito all'associazione tra i genotipi del gene IL28B e la risposta alla terapia; dai dati raccolti è possibile evidenziare semplicemente un *trend* positivo tra i soggetti rs12979860-CC e la probabilità di rispondere alla terapia e quindi di eradicare il virus in seguito a trattamento (57% SVR Vs. 43% RR + NR).

È stata anche analizzata la distribuzione dei genotipi favorevoli a raggiungere l'SVR (rs12979860-CC e rs8099917-TT) rispetto al genotipo virale; in entrambi i casi però, non si è evidenziata alcuna correlazione significativa tra i due gruppi, analizzati separatamente, e il genotipo del virus HCV (6 soggetti rs12979860-CC sono HCV GT 1-4 e 8 sono HCV GT 2-3; 10 soggetti rs8099917-TT sono HCV GT 1-4 e 11 sono HCV GT 2-3) (Tab. 4.4).

Analizzando la risposta alla terapia virale in relazione agli aplotipi del gene IL28B, i dati non hanno permesso di confermare quanto riportato in letteratura; non vi è, infatti, una vera e propria correlazione tra gli SNPs del gene IL28B e il *rate* di SVR. E' comunque possibile evidenziare una tendenza a raggiungere l'SVR, in seguito a trattamento, nei soggetti con aplotipo favorevole (aplotipo 1: rs12979860-CC/rs8099917-TT e aplotipo 5: rs12979860-CT/rs8099917-GT) (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: *outcome* terapeutico in relazione agli aplotipi del gene IL28B determinato dai polimorfismi rs12979860 e rs8099917.

	APLOTIPI IL28B		RISPOSTA ALLA TERAPIA					
			SVR		NR		RR	
	rs12979860 C>T	rs8099917 T>G	HCV GT 1-4	HCV GT 2-3	HCV GT 1-4	HCV GT 2-3	HCV GT 1-4	HCV GT 2-3
1	C/C	T/T	2	6	1	0	3	2
2	C/C	T/G	0	0	0	0	0	0
3	C/T	T/T	1	1	2	0	1	1
4	C/C	G/G	0	0	0	0	0	0
5	C/T	T/G	5	4	9	0	4	1
5	T/T	T/T	0	1	0	0	0	0
6	C/T	G/G	0	0	0	0	0	0
7	T/T	T/G	0	1	1	0	0	0
8	T/T	G/G	1	1	3	0	0	1

In merito ai polimorfismi del gene ITPA, per valutare l'associazione tra gli SNPs rs7270101 e rs1127354 e il rischio di sviluppare anemia emolitica cronica indotta da Ribavirina, i pazienti sono stati stratificati in tre classi di rischio in base alla percentuale di attività ITPasica predetta su base genetica (100% ITPA, 60% ITPA, ≤ 30% ITPA) e si è graficata la percentuale di riduzione media di emoglobina (Hb) a intervalli di tempo regolari, dopo 1, 3 e 6 mesi dall'inizio del trattamento. Nella Tabella sottostante vengono riportate le percentuali di attività ITPasica predetta sulla base dell'aplotipo ITPA (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: entità predetta di deficit enzimatico in accordo all'aplotipo ITPA e a studi *in vitro* [126]. Si è riportato il numero di soggetti portatori di ciascun aplotipo.

PREDIZIONE				
rs7270101 A>C	rs1127354 C>A	Attività ITPasica (%)	ITPasi Deficit	N° soggetti
A/A	C/C	100	-	36
A/C	C/C	60	+	8
A/A	C/A	30	++	4
C/C	C/C	30	++	1
A/C	C/A	10	+++	2
A/A	A/A	<5	+++	1
				52

Come si può apprezzare dalla Figura 4.27, il calo maggiore di Hb si evidenzia nelle prime settimane di trattamento, mentre dopo 6 mesi i livelli di emoglobina tendono ad equipararsi nei tre gruppi di rischio.

La caduta maggiore nei livelli di emoglobina si registra per il gruppo di rischio 100% ITPA, dopo 4 settimane di terapia; nei soggetti con il 100% di attività enzimatica, il declino di Hb raggiunge quasi il 20% fin dal primo mese di trattamento, mentre nei pazienti che presentano un'attività enzimatica inferiore al 30% rispetto al basale, la riduzione media di Hb è minore del 5% nelle prime 4 settimane di trattamento e non supera il 15% nell'arco delle 24 settimane. E' stata pertanto condotta un'analisi statistica per valutare se l'entità della riduzione media dei livelli di Hb potesse essere correlata in modo significativo all'attività enzimatica ITPasica, predetta su base genetica dall'aplotipo definito dalle varianti polimorfiche rs7270101 e rs1127354 del gene ITPA.

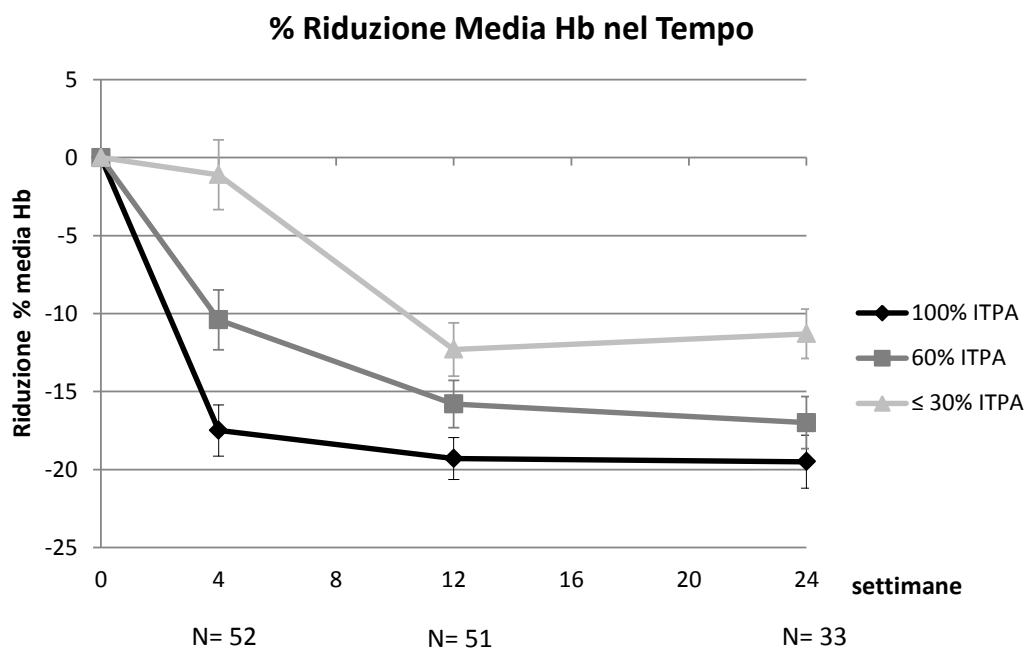


Fig. 4.27: rappresentazione grafica della riduzione media percentuale di emoglobina (Hb) nelle tre classi di rischio (100% ITPA, 60% ITPA e $\leq 30\%$ ITPA) a 4, 12 e 24 settimane dall'inizio del trattamento. Le barre verticali rappresentano il valore medio per ciascun gruppo \pm SEM. N: numero di soggetti compresi nell'analisi a ciascun *time-point*.

L'analisi statistica è stata eseguita confrontando la riduzione media di emoglobina nel gruppo con attività enzimatica "wild-type" (100% ITPA) rispetto ai gruppi di pazienti con un deficit enzimatico lieve (60% ITPA) o moderato ($\leq 30\%$ ITPA), predetto su base genetica, e la protezione dalla riduzione di emoglobina (Hb) indotta da Ribavirina, a 4 e 24 settimane dall'inizio della terapia (Dunnett's Multiple Comparison Test, *** $p < 0.001$ con $\alpha = 0.05$, * $p < 0.05$ con $\alpha = 0.05$) (Fig. 4.28).

I pazienti con profili genetici per le varianti polimorfiche rs7270101 e rs1127354 del gene ITPA, associati ad una riduzione maggiore o uguale al 70% di attività ITPasica, sono quindi protetti dal manifestare una severa anemia emolitica durante la terapia combinata PEG-IFN/RBV, rispetto ai pazienti con attività enzimatica "normale" (100% ITPA, rs7270101-AA e rs1127354-CC) e questo è evidente soprattutto nelle prime settimane di trattamento.

% Riduzione Media Hb nel Tempo

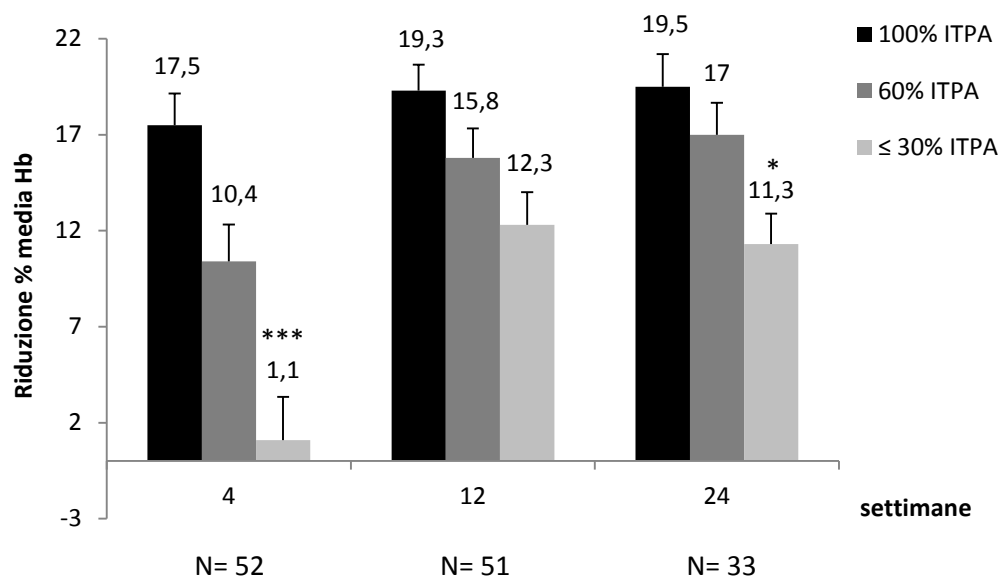


Fig. 4.28: rappresentazione grafica della riduzione % media di Emoglobina (Hb) a 1, 3 e 6 mesi dall'inizio del trattamento, per le tre classi di rischio (100% ITPA, 60% ITPA e ≤ 30% ITPA) in cui sono stati raggruppati i pazienti, sulla base del deficit enzimatico predetto dell'enzima ITPA (Dunnett's Multiple Comparison Test, *** $p < 0.001$ con $\alpha = 0.05$, * $p < 0.05$ con $\alpha = 0.05$). Le barre di errore indicano il valore medio per ciascun gruppo + SEM; N: numero di soggetti compresi nell'analisi a ciascun *time-point*.

4.8. STUDIO DI COMPATIBILITÀ

È stato condotto uno studio di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 con reagenti diversi da quelli usati in fase di validazione. Le performance del dispositivo sono state valutate utilizzando: la mix di amplificazione M2 in combinazione sia con la membrana per blotting in nitrocellulosa idrofoba che con la membrana in nylon a carica positiva e la mix di reazione M3 in combinazione con la membrana in nylon a carica positiva.

Le prove sono state condotte utilizzando 50 campioni informativi per i polimorfismi indagati, scelti tra quelli usati per la validazione interna (Appendice B), secondo i protocolli di amplificazione e di rivelazione su strip descritti rispettivamente al Paragrafo 3.3 (Tab. 3.6 e Tab. 3.10).

Come si può apprezzare dalle Figure 4.29, 4.30 e 4.31 le analisi eseguite sia cambiando o la mix di amplificazione o la membrana per blotting, lasciando invariati tutti gli altri componenti del kit, sia modificando la mix di amplificazione e la membrana per blotting, hanno permesso di ottenere dei risultati conformi a quelli ottenuti in fase di validazione interna.

Le prestazioni migliori si sono ottenute utilizzando la membrana per blotting idrofoba; inoltre, dalle prove incrociate effettuate è stato possibile capire che entrambe le master mix di amplificazione garantiscono delle performance equiparabili e che le principali differenze in termini di intensità del segnale sono determinate dalla tipologia del materiale su cui sono spottate le sonde.

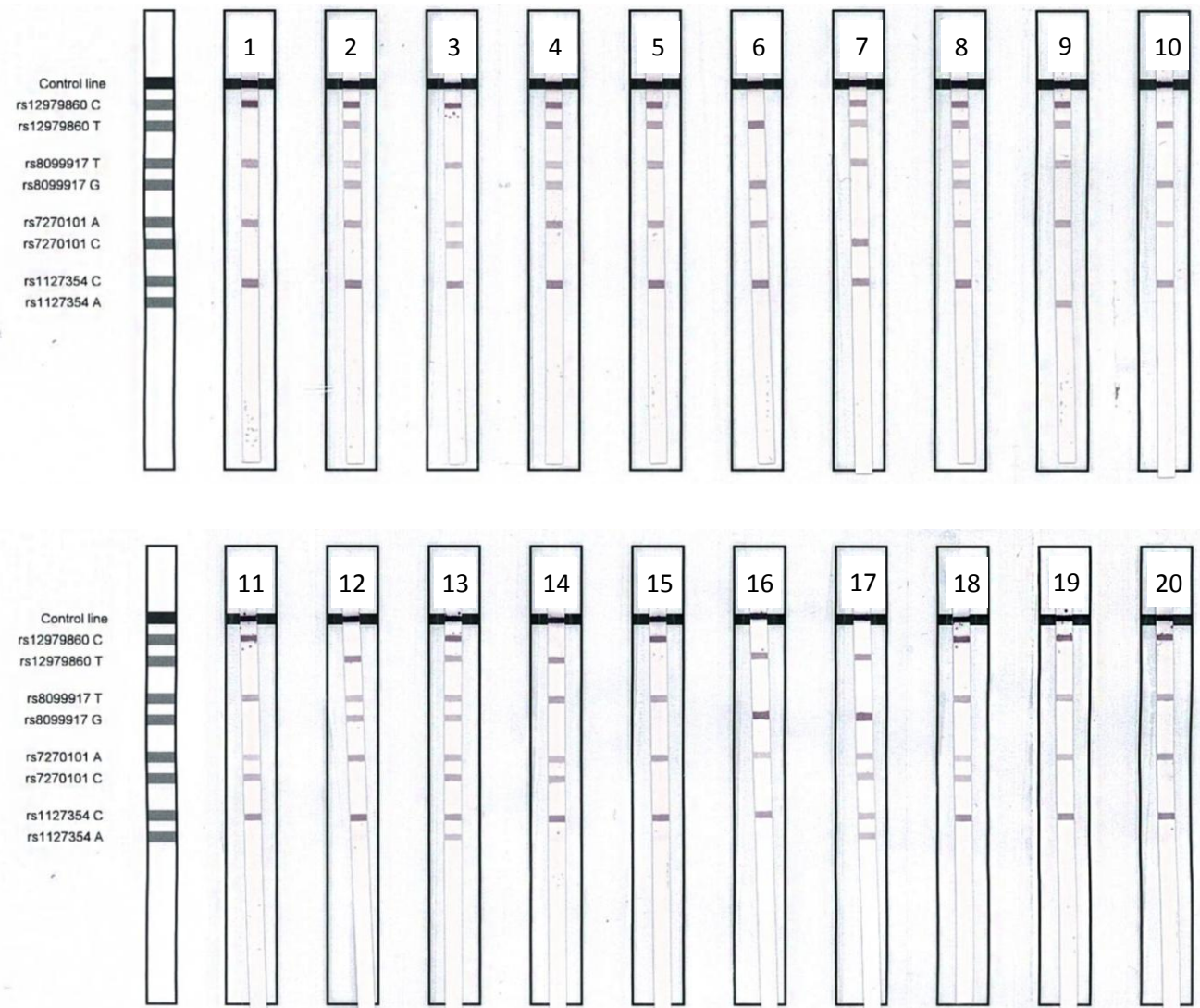


Fig. 4.29: risultati ottenuti dalle prove di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA cod. 04-47A-20 utilizzando la mix di amplificazione M3 e la membrana in nylon a carica positiva. Lane 1-10: campioni 1_DIMED, 2_DIMED, 3_DIMED, 4_DIMED, 5_DIMED, 6_DIMED, 7_DIMED, 8_DIMED, 14_DIMED, 15_DIMED. Lane 11-20: campioni 21_DIMED, 22_DIMED, 23_DIMED, 24_DIMED, 25_DIMED, 26_DIMED, 27_DIMED, 28_DIMED, 29_DIMED, 30_DIMED (Appendice B).

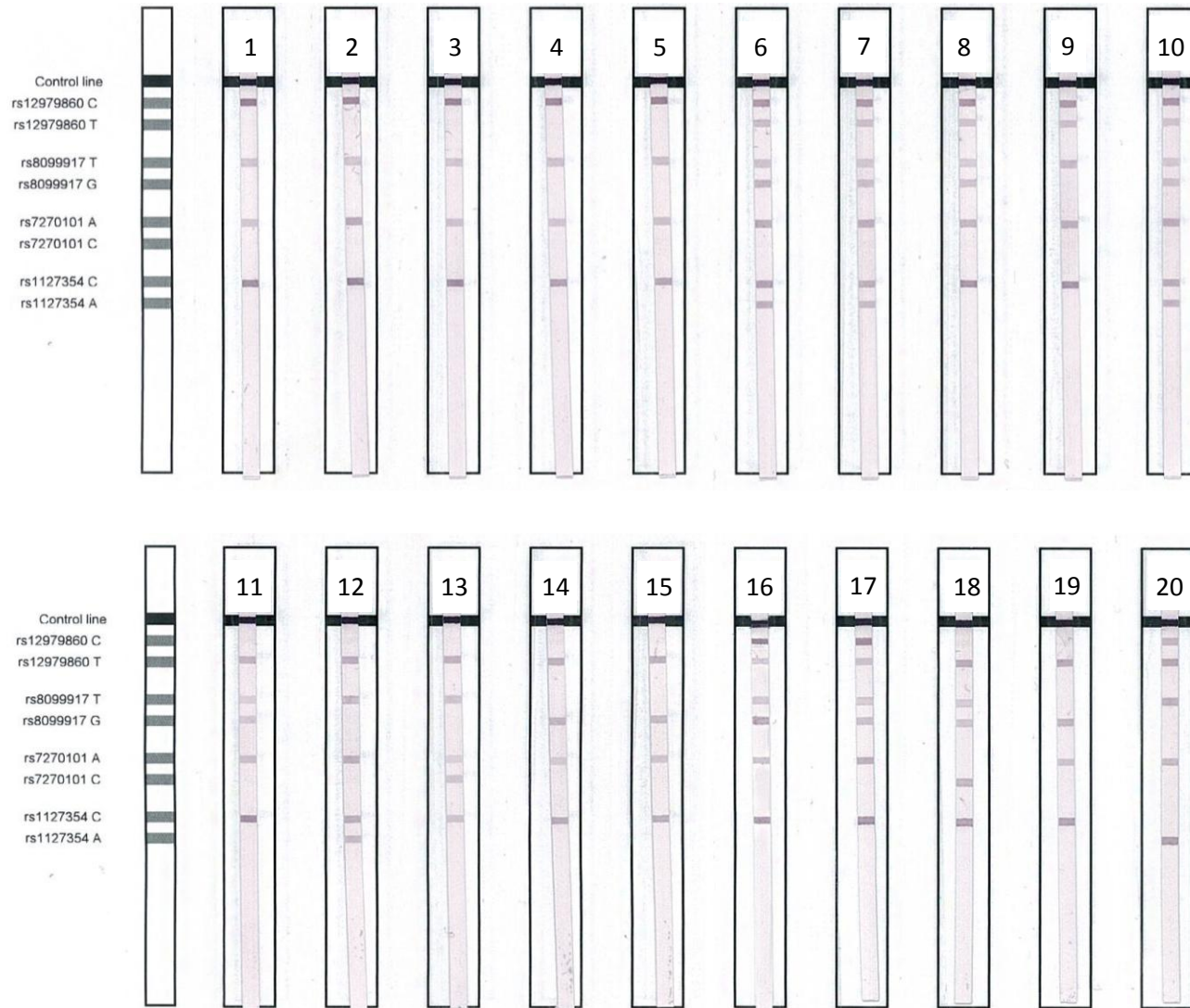


Fig. 4.30: risultati ottenuti dalle prove di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA cod. 04-47A-20 utilizzando la mix di amplificazione M2 e la membrana in nylon a carica positiva. Lane 1-10: campioni 80_LEM, 81_LEM, 82_LEM, 83_LEM, 84_LEM, 85_LEM, 86_LEM, 87_LEM, 88_LEM, 89_LEM. Lane 11-20: campioni 90_LEM, 91_LEM, 92_LEM, 93_LEM, 94_LEM, 53_LEM, 54_LEM, 55_LEM, 56_LEM, 14_DIMED (Appendice B).

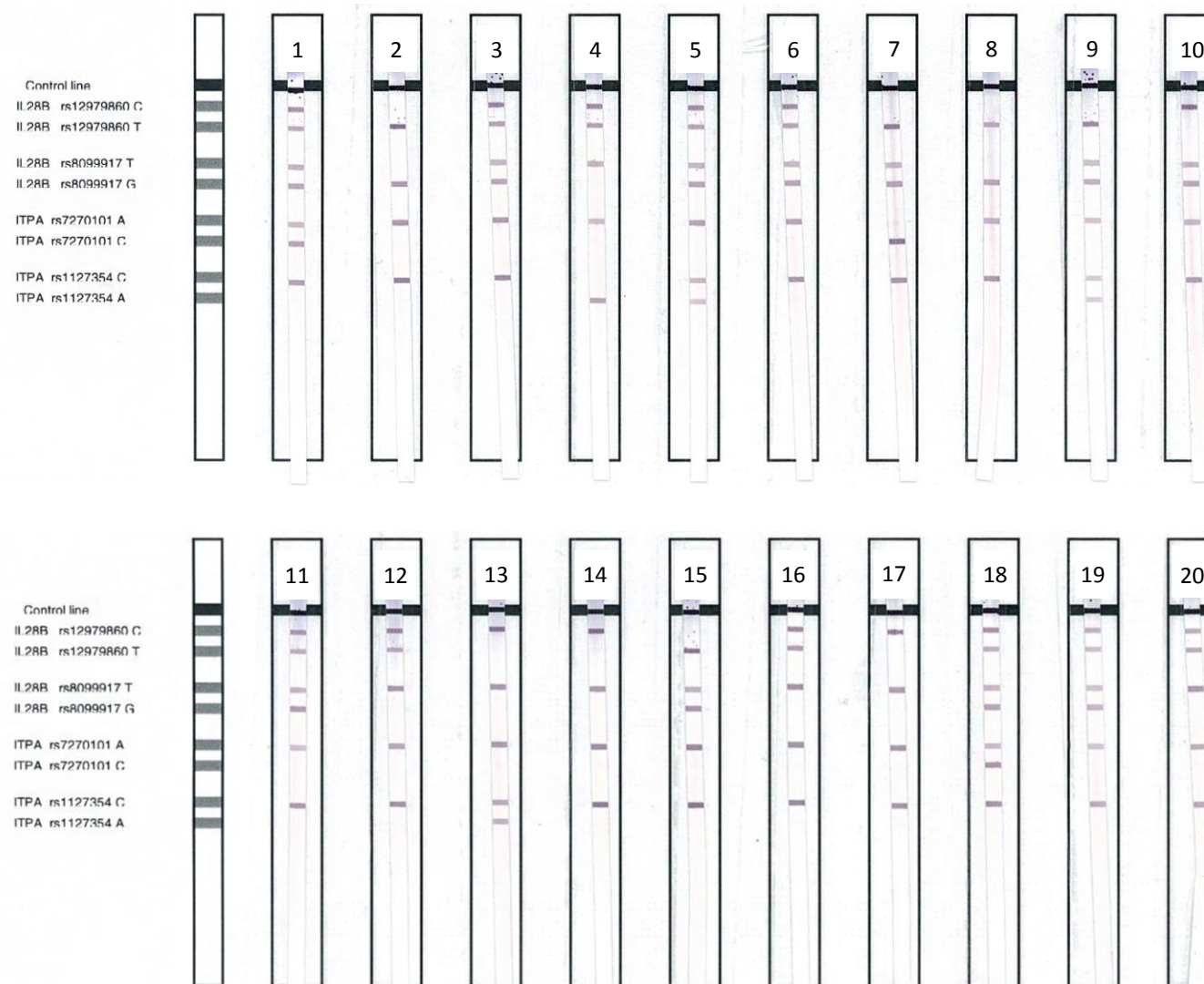


Fig. 4.31: risultati ottenuti dalle prove di compatibilità del dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA cod. 04-47A-20 utilizzando la mix di amplificazione M2 e la membrana per blotting idrofoba. Lane 1-10: campioni 140_LEM, 15_DIMED, 142_LEM, 14_DIMED, 144_LEM, 145_LEM, 146_LEM, 26_DIMED, 148_LEM, 149_LEM. Lane 11-20: campioni 150_LEM, 151_LEM, 152_LEM, 153_LEM, 154_LEM, 155_LEM, 156_LEM, 157_LEM; 158_LEM, 159_LEM (Appendice B).

4.9. STUDIO DI STABILITÀ

In riferimento alla norma europea EN 13640:2002 relativa alle prove di stabilità dei reagenti diagnostici *in vitro*, è stato redatto un piano di stabilità che prevede uno studio della durata complessiva di 14 mesi, allo scopo di poter definire la *shelf life* del prodotto GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20.

Le prove di stabilità sono state condotte a intervalli regolari di 1 mese per un periodo complessivo di 8 mesi e sono state effettuate in triplo allestendo tre kit di lotti diversi (A, B e C), ognuno costituito da reagenti della stessa tipologia, ma di lotti differenti.

Il saggio RLB è stato condotto seguendo il protocollo riportato al Paragrafo 3.5 (Tab.3.10), utilizzando la mix M3 come reagente di amplificazione e la membrana per blotting idrofoba in nitrocellulosa come supporto delle *probes*; come DNA di riferimento è stato utilizzato il campione 160_AB (controllo positivo del kit).

Come riportato in Fig. 4.32, a 8 mesi dall'inizio delle prove di stabilità, tutti e tre i kit sono risultati funzionanti e hanno permesso di ottenere dei risultati riproducibili ed equiparabili in termini di intensità del segnale. Sulla base dei risultati ottenuti fino ad ora è stato quindi possibile definire una *shelf life* del dispositivo di 8 mesi che dovrà essere implementata con i dati ottenuti dal completamento delle prove di stabilità a 14 mesi.

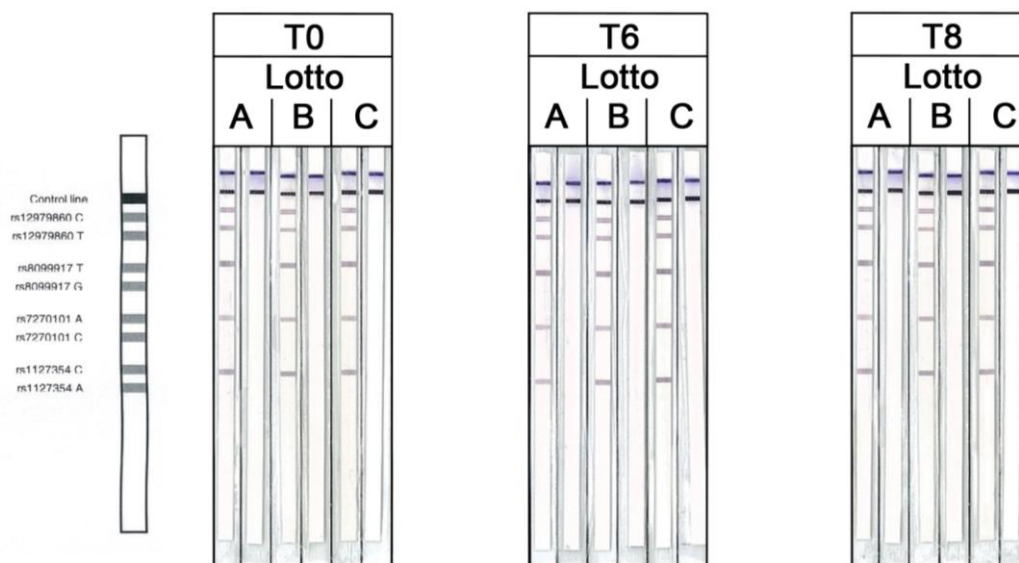


Fig. 4.32: risultati delle prove di stabilità del kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20. Sono riportati i dati relativi al controllo di qualità (T0) e delle prove di stabilità effettuate dopo 6 mesi e 8 mesi (T6, T8). Dopo 8 mesi, il kit mantiene inalterate le sue prestazioni per tutti e tre i lotti A, B e C sottoposti all'analisi. I risultati ottenuti sono conformi all'atteso. Per ciascun lotto, sono riportati il controllo positivo (campione 160_LBM) ed il controllo negativo.

4.10. MARCATURA CE IVD

Il kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE è stato marcato CE ai sensi della direttiva 98/79/CE, come dispositivo diagnostico *in vitro* per l'identificazione e la genotipizzazione simultanea di polimorfismi nei geni IL28B e ITPA mediante ibridazione inversa allele specifica, secondo le disposizioni riportate nell'allegato III.

La marcatura CE è garanzia della conformità del prodotto ai requisiti di efficacia e di sicurezza esposti nell'allegato I della normativa 98/79/CE, recepita dal D.Lgs.332/2000 e, in modo del tutto equivalente a quanto descritto per il kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE, la procedura di marcatura è conseguita all'autodichiarazione di conformità da parte del fabbricante.

DICHIARAZIONE DI CONFORMITA' DEL FABBRICANTE*
*Declaration of conformity of the manufacturer**

Noi
We

AB ANALITICA srl
via Svizzera, 16
35127 Padova Italy

dichiariamo sotto la nostra esclusiva responsabilità, che il prodotto
declare in our own responsibility, that the following products:

GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE

Cod. n° 04-47A

CE

ai quali questa dichiarazione si riferisce, è conforme alla direttiva
98/79/CE del 27 Ottobre 1998 relativa ai dispositivi medico-diagnostici
in vitro.

*to whom this certificate refers are manufactured according to the
regulations of the Directive 98/79/EC of 27 October 1998 on in vitro
diagnostic medical device.*

Data di notifica al Ministero della Salute: Padova 4 ottobre 2013



Dott. Vincenzo Putrone
Amministratore Unico

* In base all'allegato III
according to annex III

AB ANALITICA srl
via Svizzera, 16 - 35127 Padova
Tel ++39 049 761698 - Fax ++39 049 8709510 -
E-mail: info@abanalitica.it Sito: www.abanalitica.it

dichconform tipo rev290310

Fig. 4.33: dichiarazione di conformità del fabbricante per il dispositivo diagnostico *in vitro* GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20. La dichiarazione comprende i dati relativi al fabbricante, i dati utili a identificare/classificare il dispositivo (nome commerciale) e i dati relativi alla conformità CE (allegato III).



Fig. 4.34: presentazione del kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 nei suoi componenti costituenti: BOX P e BOX R.

Il BOX P include i reagenti necessari all'amplificazione del DNA in formato premix: 20 provette da 0,2 ml pre-aliquotate con la mix di amplificazione + 1 aliquota di oligomix sufficiente per 20 test + 1 DNA di controllo.

Il BOX R contiene i componenti che compongono il saggio RLB: soluzione di ibridazione HYB2, soluzione di lavaggio stringente COND2, soluzioni di lavaggio RIN e STOP, colorante NBT-BCIP sotto forma di tavolette da sciogliere in acqua, 20 strip saggio specifiche, 1 aliquota di soluzione denaturante DEN, 1 aliquota di streptavidina coniugata all'enzima fosfatasi alcalina CON, 3 vassoi, 1 manuale d'uso, 1 lucido interpretativo ed 1 foglio per l'archivio delle strip.

Ciascun BOX è contraddistinto da un'etichetta informativa che riporta: l'*Intended Use* del dispositivo, il lotto e la scadenza del kit, i reagenti inclusi nel box, i lotti, la scadenza e la quantità dei reagenti, la temperatura di conservazione dei reagenti, il numero di test che il kit permette di effettuare, eventuali frasi o simboli di rischio in base alla norma EN 980:2003, il simbolo CE, l'indicazione IVD ed i dati del fabbricante (ragione sociale).

5. CONCLUSIONI

L'attività Tecnico-Scientifica del dottorato di ricerca è stata svolta come parte integrante del progetto "BIO.ME.P" (*Biotecnologie per la Medicina Personalizzata*), finanziato dalla regione Veneto. L'attività di ricerca ha avuto come obiettivo quello di sviluppare due test diagnostici di interesse commerciale, utili a predire il dosaggio di farmaci utilizzati in ambito clinico, per i quali si rende necessaria la personalizzazione della terapia ed è raccomandato eseguire il test genetico. Nel corso dei tre anni di dottorato sono stati sviluppati due dispositivi diagnostici *in vitro*, il kit GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 (AB ANALITICA) e il kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 (AB ANALITICA), che sono stati notificati al ministero della Salute ricevendo la marcatura **CE IVD** che ne consente la commercializzazione nella Comunità Europea. Entrambi i sistemi sviluppati si basano sul saggio *Reverse Line Blot* (RLB) e presentano un protocollo automatizzabile e di semplice esecuzione che permette di ottenere un risultato in meno di 4 ore totali. L'*output* del test è inoltre immediatamente fruibile e facilmente interpretabile grazie alla creazione di maschere di interpretazione e di un software interpretativo nel caso del dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 (AB ANALITICA). Ciascun dispositivo permette l'esecuzione di 20 test (1 test = 1 paziente) e si presenta sotto forma di kit commerciale costituito da due box: il Box P ed il Box R. Il Box P contiene tutti i reagenti per l'amplificazione in multiplex: la Master Mix di amplificazione pre-aliquotata in provette monodose pronte all'uso, l'Oligomix e un DNA di riferimento che funge da controllo positivo del kit. Il Box R contiene, invece, le strip e tutti i reagenti per la visualizzazione su strip degli amplificati mediante metodica RLB.

5.1. GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20

Il Warfarin è uno degli anticoagulanti più largamente utilizzati in clinica per la prevenzione e il trattamento di eventi trombotici, il cui utilizzo si associa però a dei rischi molto gravi per la salute del paziente a causa sia dell'indice terapeutico molto ristretto, sia dell'ampia variabilità individuale nella risposta al farmaco.

Numerosi studi, volti a identificare i fattori predittivi di risposta alla terapia, hanno dimostrato che circa il 40% della variabilità inter-individuale, osservata nella dose terapeutica del farmaco, ha base genetica ed è imputabile a polimorfismi genici che influenzano l'efficacia anticoagulante del farmaco modificandone sia la farmacocinetica che la farmacodinamica; tali polimorfismi sono gli SNPs rs9923231 nel gene VKORC1, rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 e rs2108622 nel gene CYP4F2.

La conoscenza del profilo genetico del paziente permette di prevedere un rischio differenziale di manifestare reazioni avverse e quindi di personalizzare il dosaggio di farmaco, orientandosi verso dosaggi minori nel caso di individui che presentino le varianti alleliche *2 e *3 del gene CYP2C9 o siano omozigoti A/A per il polimorfismo rs9923231 nel gene VKORC1.

L'utilità di associare alla prescrizione del farmaco un test genetico è stata sottolineata anche dall'FDA che nel 2010 ha revisionato il foglietto illustrativo del farmaco introducendovi una tabella con i dosaggi (mg/die) raccomandati di farmaco per raggiungere un INR terapeutico sulla base del dato genetico.

Si è quindi deciso di sviluppare un test farmacogenetico, basato sulla metodica *Reverse Line Blot*, per la discriminazione delle varianti alleliche associate alla risposta al Warfarin. La prima fase del lavoro ha riguardato la definizione del prototipo (progettazione di sonde e *primers*) e si è conclusa con la messa a punto delle condizioni sperimentali del saggio relative ai protocolli di amplificazione in multiplex e di rivelazione su strip. Tale fase ha richiesto un notevole impegno tecnico per superare alcuni dei limiti progettuali sulla costruzione degli oligonucleotidi, imposti dalle sequenze altamente omologhe dei citocromi e per la difficoltà di riuscire ad individuare le giuste condizioni sperimentali che consentono di discriminare in modo univoco, specifico e sensibile, sequenze che tra loro differiscono di una singola base (sequenza *wild-type* Vs. sequenza polimorfica). Successivamente è stata settata la sensibilità analitica del test e si è validato il prototipo su 125 campioni precedentemente genotipizzati con un metodo di riferimento in Real-Time. Le prove effettuate hanno permesso di definire una sensibilità analitica di 0,5 ng di DNA/ μ l, e ottime performance si sono ottenute utilizzando una quantità iniziale di DNA da 10 a 100 ng/ μ l. Tutti i 125 campioni analizzati in fase di validazione sono stati correttamente genotipizzati; per ciascuno dei polimorfismi indagati: rs1799853 (c.430 C>T, Cys144Arg, CYP2C9*2), rs1057910 (c.1075 A>C, Ile359Leu, CYP2C9*3), rs2108622 (c.1297 C>T, Val433Met, CYP4F2*3) e rs9923231 (c.-1639 G>A, VKORC1) il dispositivo ha fornito un risultato concorde al 100% al dato ottenuto con il metodo di riferimento ed è stato possibile calcolare un valore di sensibilità e specificità diagnostica del 100%, esprimibile anche come accuratezza del 100%, ossia numero di genotipizzazioni corrette sul totale delle genotipizzazioni effettuate (osservato/atteso).

Il dispositivo è caratterizzato da una *shelf life* di 12 mesi e risulta, inoltre, compatibile con tre tipi di master mix di amplificazione disponibili in commercio e due tipologie di materiali usati per il blotting delle *probes* (una membrana in nylon e membrana in nitrocellulosa).

Il saggio sviluppato in questo lavoro si è quindi dimostrato affidabile e in grado di discriminare in molto altamente specifico e sensibile i polimorfismi indagati; questo risultato non è da sottovalutare considerando che geni che codificano per i citocromi presentano una sequenza altamente simile e che le regioni in cui mappano gli SNPs rs1799853 e rs1057910 nel gene CYP2C9 presentano un grado di identità con le corrispettive sequenze omologhe dei geni CYP2C19, CYP2C8 e CYP2C18 maggiore al 90%.

Per facilitare l'interpretazione dei risultati, il kit è stato implementato con un software interpretativo conforme ai requisiti della norma IEC 62304 – “Medical Device Software – Software Life Cycle Processes” e rispondente alle esigenze di rendere automatico e ripetibile il processo di lettura e interpretazione del risultato della strip e di archiviare i risultati in un format stampabile.

Il dispositivo GENEQUALITY AB WARFARIN TYPE cod. 04-74A-20 (AB ANALITICA) è stato notificato al Ministero della Salute e ha ricevuto la marcatura come dispositivo diagnostico in vitro **CE IVD**; può pertanto essere commercializzato nella Comunità Europea.

La metodica RLB è una tecnica che ben si adatta ad essere utilizzata in ambito diagnostico sia per la semplicità d'esecuzione sia per la possibilità di analizzare contemporaneamente più target molecolari garantendo un'elevata specificità e dei costi più contenuti rispetto ad altri sistemi di discriminazione allelica come microarrays o next-generation sequencing.

Il test sviluppato in questo lavoro di dottorato rappresenta uno dei sistemi più completi per la personalizzazione della terapia in pazienti con disturbi tromboembolici e in cura con Warfarin. Nessuno dei sistemi presenti nel mercato, infatti, analizza il polimorfismo rs2108622 C>T nel gene CYP4F2 che, però, soprattutto per la popolazione caucasica è associato in modo statisticamente significativo ad un incremento del dosaggio di anticoagulante, necessario per raggiungere un INR

terapeutico; lo SNP rs2108622 spiega in media circa il 10% delle differenze di dosaggio osservate tra i portatori della variante CYP4F2 c.1297 T e i soggetti CYP4F2 c.1297 C/C e si conferma il terzo locus genico in ordine di importanza come predittore di risposta terapeutica al Warfarin e ai suoi derivati [26].

5.2. GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20

L'infezione da virus dell'epatite C (HCV) ha un impatto globale significativo. In accordo alle stime del WHO (*World Health Organization*) sono 130-170 milioni i portatori del virus HCV nel mondo, pari a circa il 2-2,5% della popolazione mondiale totale, di cui 5 milioni in Europa. Le manifestazioni cliniche dell'infezione da HCV costituiscono un quadro eterogeneo che varia considerando le forme acute rispetto a quelle croniche.

L'epatite acuta è spesso asintomatica e nel 20% dei casi si risolve spontaneamente. Nell'80% dei pazienti, invece, l'infezione progredisce verso una forma cronica, le cui manifestazioni spaziano da condizioni asintomatiche, non progressive e pressochè stabili a forme progressive caratterizzate da fibrosi epatica che nel lungo periodo può evolvere in cirrosi ed epatocarcinoma. L'epatite C cronica, ancora oggi, rappresenta la prima causa di cirrosi e la quinta causa di morte tra le patologie croniche [67][68].

L'obiettivo della terapia è l'eradicazione dell'infezione con lo scopo di eliminare il virus, evitare la progressione dell'epatite cronica in cirrosi e migliorare la qualità della vita. Nel corso degli anni la terapia dell'epatite C cronica ha subito una notevole evoluzione: la prima molecola utilizzata è stata l'Interferone alfa in monoterapia, ben presto sostituito da combinazioni più efficaci di Interferone alfa e Ribavirina e più recentemente dai nuovi tipi di Interferone alfa pegilati in combinazione con Ribavirina. La combinazione PEG-IFN (PEG-alfa 2a o PEG-alfa 2b) e Ribavirina, indicata dalle linee guide come standard di terapia per l'epatite C cronica o SOC (*Standard Of Care*), è efficace, tuttavia, nell'80% dei casi di infezione da HCV di genotipo 2-3 e in meno del 50% dei casi di infezione da HCV di genotipo 1; per tale ragione negli ultimi decenni sono stati sviluppati agenti antivirali di nuova generazione da utilizzare in pazienti intolleranti alla terapia standard oppure da usarsi in combinazione con PEG-IFN e Ribavirina per aumentare l'efficacia della SOC, ridurre la durata e la tossicità e facilitare la compliance del paziente.

L'utilizzo dei nuovi farmaci è comunque limitato a determinate categorie di pazienti, come i casi di infezione da genotipo 1 e, sia in caso di terapia standard che di triplice terapia, la tossicità e i costi sono elevati e hanno determinato un notevole interesse nell'identificazione di fattori prognostici in grado di predire l'esito e la probabilità di successo della terapia stessa. I fattori predittivi finora individuati risultano collegati sia al virus (genotipo virale, cinetica di declino dell'RNA virale, carica virale) che all'ospite (età, sesso, background genetico); diversi studi multicentrici, in particolare, hanno dimostrato un'associazione significativa tra due polimorfismi a monte del gene IL28B (rs12979860 C>T e rs8099917 T>G) in *linkage disequilibrium* e la *clearance* spontanea del virus, la cinetica virale e il tasso di SVR. Studi condotti da Thomas e colleghi, inoltre, hanno permesso di individuare una correlazione significativa tra il rischio di sviluppare anemia emolitica indotta da Ribavirina e due polimorfismi nel gene ITPA che codifica per l'inosina trifosfatasi, un enzima coinvolto nell'idrolisi di nucleotidi tri- e difosfato. Gli SNPs rs1127354 e rs7270101 si trovano rispettivamente a livello esonico ed intronico del gene ITPA ed alterano lo splicing determinando

la produzione di proteine strutturalmente e funzionalmente alterate e quindi influenzando l'attività ITPasica della cellula.

Lo scopo di questo lavoro di dottorato è stato quindi quello di sviluppare un dispositivo medico diagnostico per genotipizzare i polimorfismi più significativi per predire la risposta al trattamento e il rischio di reazioni avverse in pazienti con epatite C cronica. Considerando, infatti, i costi di gestione clinica dei pazienti, che vanno dai 2.500 – 5.000 euro/anno in caso di terapia antivirale standard, fino a 100.000 euro/anno nei casi di trapianto di fegato, risulta di fondamentale importanza poter disporre di un test genetico il cui risultato possa: 1) indirizzare il clinico nella scelta del regime terapeutico più adatto; 2) permettere di valutare con più accuratezza il rapporto rischio/beneficio del trattamento rispetto al non trattamento; 3) aiutare ad individuare i pazienti per i quali è utile una terapia di supporto a base di acido folico e/o vit. B₁₂ e/o eritropoietina oppure che necessitano di un monitoraggio più frequente dei parametri biochimici ed ematologici, prima del manifestarsi di gravi eventi avversi che potrebbero anche determinare l'interruzione della terapia antivirale.

È stato messo a punto un saggio *Reverse Line Blot* che sfrutta l'ibridazione specifica tra oligonucleotidi sintetici o *probes* adesi ad un supporto di nylon o nitrocellulosa e una regione genomica precedentemente amplificata mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

Le prestazioni del metodo in termini di sensibilità analitica, specificità analitica, sensibilità e specificità diagnostica sono state valutate analizzando 160 campioni precedentemente genotipizzati con un metodo di riferimento CE IVD Real-Time a sonde Taqman.

Il test è stato in grado di fornire un risultato corretto usando quantità iniziali di DNA molto eterogenee (da 1 ng/reazione a 400 ng/reazioni), permettendo così di definire una sensibilità analitica di 0,5 ng DNA/μl. Inoltre, il test è risultato compatibile con diversi sistemi di estrazione manuali ed automatici [*home made*, DNA Blood Mini Kit (Qiagen) ed EZ1 (Qiagen)].

I dati raccolti in fase di validazione hanno permesso poi di definire una specificità-sensibilità diagnostica del 100%: per ciascuno dei campioni analizzati, infatti, i polimorfismi rs12979860 e rs8099917 nel gene IL28B e rs7270101 e rs1127354 nel gene ITPA sono stati correttamente identificati e genotipizzati dal dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE, in accordo al dato ottenuto con il metodo di riferimento.

In riferimento alla norma europea EN 13640:2002 è stata valutata la stabilità dei reagenti che compongono il kit e dalle prove effettuate finora è stato possibile definire una *shelf life* di 8 mesi, da implementare con i dati derivanti dal completamento delle prove di stabilità a 14 mesi, come indicato nel relativo piano di stabilità.

Le prestazioni del dispositivo sono state analizzate anche variando i reagenti di amplificazione oppure il supporto su cui sono adese le sonde sequenza-specifica, mantenendo inalterati tutti gli altri parametri sperimentali; in ogni condizione, i risultati ottenuti con il dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE sono stati del tutto equiparabili a quelli ottenuti con i reagenti usati in fase di validazione.

Viste e considerate le ottime performance dimostrate dal kit GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 (AB ANALITICA), il dispositivo è stato marcato CE IVD ai sensi della direttiva 98/79/CE come dispositivo diagnostico *in vitro* per l'identificazione e la genotipizzazione simultanea di polimorfismi nei geni IL28B e ITPA mediante ibridazione inversa allele specifica e può pertanto essere commercializzato.

In conclusione quindi è stato sviluppato un kit diagnostico per personalizzare il trattamento dei pazienti con epatite C cronica, basato sulla metodica RLB. Il protocollo è automatizzabile e

prevede quattro fasi: l'estrazione del DNA, l'amplificazione in multiplex, l'ibridazione su strip e l'interpretazione dei risultati. L'RLB si è dimostrata una tecnica di semplice esecuzione e versatile: permette, infatti, la caratterizzazione molecolare di più polimorfismi (fino ad un massimo di 30) e su più campioni contemporaneamente (massimo 20 con sistema automatico) risultando meno costosa di molti sistemi di genotipizzazione presenti in commercio, ma non meno sensibile o specifica. Attualmente il dispositivo GENEQUALITY IL28B-ITPA TYPE cod. 04-47A-20 è l'unico kit sul mercato ad analizzare insieme tutti i polimorfismi più significativi per predire la risposta alla terapia antivirale dell'epatite C e il rischio di reazioni avverse, pertanto rappresenta l'approccio più completo per la personalizzazione della terapia in pazienti con epatite C cronica.

Per 52 dei 160 campioni è stato possibile ottenere i dati clinici relativi ai parametri biochimici ed ematologici e all'*outcome* terapeutico. Il 63% dei soggetti presentava un'infezione a carico dei genotipi virali 1-4 più difficili da trattare (Vs. 37% con epatite da HCV GT 2 o 3). La terapia si è dimostrata efficace (raggiungimento della SVR corrispondente alla negativizzazione dell'RNA virale nel siero a 24 settimane dalla fine del trattamento) nel 27% dei pazienti con infezione da HCV GT 1-4 e nel 74% dei soggetti con infezione da HCV GT 2-3, confermando quanto riportato in letteratura in merito alla maggior efficacia della terapia standard verso le infezioni a carico dei genotipi virali 2 e 3 rispetto a 1 e 4.

Prendendo in considerazione lo SNP rs12979860 nel gene IL28B, il genotipo rs12979860-CC è stato riscontrato nel 27% dei soggetti, mentre il 56% e il 17% dei pazienti era rispettivamente C/T e T/T. Per quanto riguarda lo SNP rs8099917, il 40% dei pazienti presentava il genotipo T/T, il 48% era T/G e il 12% era G/G. Nel campione analizzato, quindi, la maggior parte dei pazienti, indipendentemente dal genotipo virale era portatore in eterozigosi di almeno uno dei due polimorfismi. La valutazione dei polimorfismi in relazione alla risposta alla terapia non ha mostrato alcuna correlazione significativa. Su 14 soggetti rs12979860-CC, il 57 % ha raggiunto l'SVR, mentre il 43% non è riuscito a eradicare il virus. Tale situazione di sostanziale equilibrio si è riscontrata anche nel gruppo di soggetti rs8099917-TT; nel 52% dei casi, infatti, la terapia ha determinato il raggiungimento della risposta virologica sostenuta, mentre nel 48% dei casi si è registrato un fallimento terapeutico. La numerosità della popolazione analizzata è quindi probabilmente troppo esigua per poter trarre delle conclusioni statisticamente significative in merito all'associazione tra i genotipi del gene IL28B e l'*outcome* terapeutico.

Successivamente è stata valutata l'entità della riduzione di emoglobina in relazione all'aplotipo ITPA. La maggior parte dei pazienti (70%) mostrava un aplotipo sfavorevole (rs7270101-AA, rs1127354-CC) associato al 100% di attività ITPasica e ad un rischio elevato di sviluppare un'anemia emolitica cronica indotta da Ribavirina, mentre un'uguale proporzione di soggetti era portatrice degli aplotipi associati ad un deficit, da severo a lieve, di attività enzimatica ITPasica, che si correla con la protezione dal manifestare un calo clinicamente significativo dei livelli di emoglobina in seguito a trattamento combinato Peg-IFN/RBV. Queste correlazioni, riportate in letteratura, in effetti sono state osservate anche nel campione analizzato; il calo maggiore nei livelli di Hb si è evidenziato nelle prime 4 settimane di trattamento ed è stato più accentuato nel gruppo di rischio 100% ITPA rispetto ai gruppi 60% ITPA e soprattutto $\leq 30\%$ ITPA. Nei pazienti con un'attività enzimatica inferiore al 30% rispetto al basale, la riduzione media di Hb è stata inferiore al 5% nelle prime 4 settimane di trattamento e non ha superato il 15% nell'arco delle 24 settimane, mentre nei soggetti con il 100% di attività enzimatica, il declino di Hb ha raggiunto quasi il 20% fin dal primo mese di trattamento.

L'analisi statistica, condotta effettuando un confronto multiplo a gruppi tra le tre classi di rischio (100% ITPA, 60% ITPA e $\leq 30\%$ ITPA), in relazione ai livelli di emoglobina dopo 4, 12 e 24 settimane di trattamento, ha confermato come significativa l'associazione osservata tra il deficit severo di attività ITPasica ($\leq 30\%$ ITPA), predetto su base genetica, e la protezione dalla riduzione di Hb indotta da Ribavirina, a 4 e 24 settimane dall'inizio della terapia (Dunnett's Multiple Comparison Test, 1 mese: $p < 0.001$ con $\alpha = 0.05$, 6 mesi: $p < 0.05$ con $\alpha = 0.05$); pertanto, si può concludere che in effetti l'attività enzimatica ITPasica può predire l'entità della riduzione di Hb in seguito a duplice terapia.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] **Recchia G., Pirazzoli A.**
La farmacogenetica può cambiare l'approccio alla terapia HAART?
Quaderni di Malattie Infettive e Tropical. 2008; 1,32-44.
- [2] **Lee KC, Ma JD, Kuo GM.**
Pharmacogenomics: bridging the gap between science and practice.
J Am Pharm Assoc. 2010;50(1):e1-14.
- [3] **Brookes AJ**
The essence of SNPs.
Gene. 1999; 234(2):177-186.
- [4] **Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD.**
Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics.
Clin Chem. 2009; 55(4):641-58.
- [5] **Gold B.**
Origin and utility of the reverse dot-blot.
Expert Rev Mol Diagn. 2003 Mar;3(2):143-52.
- [6] **Johnson JA, Gong L, Whirl-Carrillo M, Gage BF, Scott SA, Stein CM, Anderson JL, Kimmel SE, Lee MT, Pirmohamed M, Wadelius M, Klein TE, Altman RB; Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium.**
Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium Guidelines for CYP2C9 and VKORC1 genotypes and warfarin dosing.
Clin Pharmacol Ther. 2011 Oct;90(4):625-9.
- [7] **McClain MR, Palomaki GE, Piper M, Haddow JE.**
A rapid-ACCE review of CYP2C9 and VKORC1 alleles testing to inform warfarin dosing in adults at elevated risk for thrombotic events to avoid serious bleeding.
Genet Med. 2008 Feb;10(2):89-98.
- [8] **Wadelius M, Chen LY, Eriksson N, Bumpstead S, Ghorji J, Wadelius C, Bentley D, McGinnis R, Deloukas P.**
Association of warfarin dose with genes involved in its action and metabolism.
Hum Genet. 2007 Mar;121(1):23-34. Epub 2006 Oct 18.
- [9] **Gage BF, Eby C, Milligan PE, Banet GA, Duncan JR, McLeod HL.**
Use of pharmacogenetics and clinical factors to predict the maintenance dose of warfarin.
Thromb Haemost. 2004 Jan;91(1):87-94.
- [10] **Sconce EA, Khan TI, Wynne HA, Avery P, Monkhouse L, King BP, Wood P, Kesteven P, Daly AK, Kamali F.**
The impact of CYP2C9 and VKORC1 genetic polymorphism and patient characteristics upon warfarin dose requirements: proposal for a new dosing regimen.
Blood. 2005 Oct 1;106(7):2329-33.

- [11] **Ferder NS, Eby CS, Deych E, Harris JK, Ridker PM, Milligan PE, Goldhaber SZ, King CR, Giri T, McLeod HL, Glynn RJ, Gage BF.**
Ability of VKORC1 and CYP2C9 to predict therapeutic warfarin dose during the initial weeks of therapy.
J Thromb Haemost. 2010 Jan;8(1):95-100.
- [12] **Epstein RS, Moyer TP, Aubert RE, O Kane DJ, Xia F, Verbrugge RR, Gage BF, Teagarden JR.**
Warfarin genotyping reduces hospitalization rates results from the MM-WES (Medco-Mayo Warfarin Effectiveness study).
J Am Coll Cardiol. 2010 Jun 22;55(25):2804-12.
- [13] **Johnson SW, Henderson S.**
Genetics of warfarin sensitivity in an emergency department population with thromboembolic.
West J Emerg Med. 2011 Feb;12(1):11-6.
- [14] **Scott SA, Khasawneh R, Peter I, Kornreich R, Desnick RJ.**
Combined CYP2C9, VKORC1 and CYP4F2 frequencies among racial and ethnic groups.
Pharmacogenomics. 2010 Jun;11(6):781-91.
- [15] **Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, Conzelmann E, Hörtnagel K, Pelz HJ, Lappegard K, Seifried E, Scharrer I, Tuddenham EG, Müller CR, Strom TM, Oldenburg J.**
Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2.
Nature. 2004; 427, 537-541.
- [16] **Rieder MJ, Reiner AP, Gage BF, Nickerson DA, Eby CS, McLeod HL, Blough DK, Thummel KE, Veenstra DL, Rettie AE.**
Effect of VKORC1 haplotypes on transcriptional regulation and warfarin dose.
N Engl J Med. 2005 Jun 2;352(22):2285-93.
- [17] **D'Andrea G, D'Ambrosio RL, Di Perna P, Chetta M, Santacroce R, Brancaccio V, Grandone E, Margaglione M.**
A polymorphism in the VKORC1 gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin.
Blood. 2005 Jan 15;105(2):645-9.
- [18] **Limdi NA, Wadelius M, Cavallari L, Eriksson N, Crawford DC, Lee MT, Chen CH, Motsinger-Reif A, Sagreiya H, Liu N, Wu AH, Gage BF, Jorgensen A, Pirmohamed M, Shin JG, Suarez-Kurtz G, Kimmel SE, Johnson JA, Klein TE, Wagner MJ; International Warfarin Pharmacogenetics Consortium.**
Warfarin pharmacogenetics: a single VKORC1 polymorphism is predictive of dose across 3 racial groups.
Blood. 2010 May 6;115(18):3827-34.
- [19] **Miners J, Birkett DJ.**
Cytochrome P450-2C9: an enzyme of major importance in human drug metabolism.
Br J Clin Pharmacol. 1998;45:525-538.
- [20] **Sanderson S, Emery J, Higgins J.**
CYP2C9 gene variants, drug dose, and bleeding risk in warfarin-treated patients: a HuGENet systematic review and meta-analysis.
Genet Med. 2005 Feb;7(2):97-104.
-

- [21] **Gage BF, Eby C, Johnson JA, Deych E, Rieder MJ, Ridker PM, Milligan PE, Grice G, Lenzini P, Rettie AE, Aquilante CL, Grosso L, Marsh S, Langaee T, Farnett LE, Voora D, Veenstra DL, Glynn RJ, Barrett A, McLeod HL.**
Use of pharmacogenetic and clinical factors to predict the therapeutic dose of warfarin.
Clin Pharmacol Ther. 2008 Sep;84(3):326-31.
- [22] **Siddiqi A, Khan DA, Khan FA, Naveed AK.**
Impact of CYP2C9 genetic polymorphism on warfarin dose requirements in Pakistani population.
Pak J Pharm Sci. 2010 Oct;23(4):417-22.
- [23] **Wadelius M, Sörlin K, Wallerman O, Karlsson J, Yue QY, Magnusson PK, Wadelius C, Melhus H.**
Warfarin sensitivity related to CYP2C9, CYP3A5, ABCB1 (MDR1) and other factors.
Pharmacogenomics J. 2004;4(1):40-8.
- [24] **McDonald MG, Rieder MJ, Nakano M, Hsia CK, Rettie AE.**
CYP4F2 is a vitamin K1 oxidase: An explanation for altered warfarin dose in carriers of the V433M variant.
Mol Pharmacol. 2009 Jun;75(6):1337-46.
- [25] **Caldwell MD, Awad T, Johnson JA, Gage BF, Falkowski M, Gardina P, Hubbard J, Turpaz Y, Langaee TY, Eby C, King CR, Brower A, Schmelzer JR, Glurich I, Vidaillet HJ, Yale SH, Qi Zhang K, Berg RL, Burmester JK.**
CYP4F2 genetic variant alters required warfarin dose.
Blood. 2008 Apr 15;111(8):4106-12.
- [26] **Danese E, Montagnana M, Johnson JA, Rettie AE, Zambon CF, Lubitz SA, Suarez-Kurtz G, Cavallari LH, Zhao L, Huang M, Nakamura Y, Mushiroda T, Kringen MK, Borgiani P, Ciccacci C, Au NT, Langaee T, Siguret V, Lorient MA, Sagreiya H, Altman RB, Shahin MH, Scott SA, Khalifa SI, Chowbay B, Suriapranata IM, Teichert M, Stricker BH, Taljaard M, Botton MR, Zhang JE, Pirmohamed M, Zhang X, Carlquist JF, Horne BD, Lee MT, Pengo V, Guidi GC, Minuz P, Fava C.**
Impact of the CYP4F2 p.V433M polymorphism on coumarin dose requirement: systematic review and meta-analysis.
Clin Pharmacol Ther. 2012 Dec;92(6):746-56.
- [27] **Takeuchi F, McGinnis R, Bourgeois S, Barnes C, Eriksson N, Soranzo N, Whittaker P, Ranganath V, Kumanduri V, McLaren W, Holm L, Lindh J, Rane A, Wadelius M, Deloukas P.**
A genome-wide association study confirms VKORC1, CYP2C9, and CYP4F2 as principal genetic determinants of warfarin dose.
PLoS Genet. 2009 Mar;5(3):e1000433.
- [28] **International Warfarin Pharmacogenetics Consortium, Klein TE, Altman RB, Eriksson N, Gage BF, Kimmel SE, Lee MT, Limdi NA, Page D, Roden DM, Wagner MJ, Caldwell MD, Johnson JA.**
Estimation of the warfarin dose with clinical and pharmacogenetic data.
N Engl J Med. 2009 Feb 19;360(8):753-64.

- [29] **Wadelius M, Chen LY, Lindh JD, Eriksson N, Ghori MJ, Bumpstead S, Holm L, McGinnis R, Rane A, Deloukas P.**
The largest prospective warfarin-treated cohort supports genetic forecasting.
Blood. 2009 Jan 22;113(4):784-92.
- [30] **Anderson JL, Horne BD, Stevens SM, Grove AS, Barton S, Nicholas ZP, Kahn SF, May HT, Samuelson KM, Muhlestein JB, Carlquist JF; Couma-Gen Investigators.**
Randomized trial of genotype-guided versus standard warfarin dosing in patients initiating oral anticoagulation.
Circulation. 2007 Nov 27;116(22):2563-70.
- [31] **Roper N, Storer B, Bona R, Fang M.**
Validation and comparison of pharmacogenetics-based warfarin dosing algorithms for application of pharmacogenetic testing.
J Mol Diagn. 2010 May;12(3):283-91.
- [32] **Finkelman BS, Gage BF, Johnson JA, Brensinger CM, Kimmel SE.**
Genetic warfarin dosing: tables versus algorithms.
J Am Coll Cardiol. 2011 Feb 1;57(5):612-8.
- [33] **Zambon CF, Pengo V, Padrini R, Basso D, Schiavon S, Fogar P, Nisi A, Frigo AC, Moz S, Pelloso M, Plebani M.**
VKORC1, CYP2C9 and CYP4F2 genetic-based algorithm for warfarin dosing: an Italian retrospective study.
Pharmacogenomics. 2011 Jan;12(1):15-25.
- [34] **Patrick AR, Avorn J, Choudhry NK.**
Cost-effectiveness of genotype-guided warfarin dosing for patients with atrial fibrillation.
Circ Cardiovasc Qual Outcomes. 2009 Sep;2(5):429-36.
- [35] **Susan A. Fuchs.**
Will the FDA's 2010 Warfarin Label Changes Finally Provide the Legal Impetus for Warfarin Pharmacogenetic Testing?
N.C. J.L. & Tech. 99 (2010)
- [36] **Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH.**
Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness.
Science. 1973 Dec 7;182(4116):1026-8.
- [37] **Alter HJ, Purcell RH, Shih JW, Melpolder JC, Houghton M, Choo QL, Kuo G.**
Detection of antibody to hepatitis C virus in prospectively followed transfusion recipients with acute and chronic non-A, non-B hepatitis.
N Engl J Med. 1989 Nov 30;321(22):1494-500.
- [38] **Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M.**
Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome.
Science. 1989 Apr 21;244(4902):359-62.

- [39] **Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS.**
Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region.
J Gen Virol. 1993 Nov;74 (Pt 11):2391-9.
- [40] **Simmonds P.**
Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on.
J Gen Virol. 2004 Nov;85(Pt 11):3173-88.
- [41] **Simmonds P, Bukh J, Combet C, Deléage G, Enomoto N, Feinstone S, Halfon P, Inchauspé G, Kuiken C, Maertens G, Mizokami M, Murphy DG, Okamoto H, Pawlotsky JM, Penin F, Sablon E, Shin-I T, Stuyver LJ, Thiel HJ, Viazov S, Weiner AJ, Widell A.**
Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes.
Hepatology. 2005 Oct;42(4):962-73.
- [42] **Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ.**
Epidemiology and natural history of HCV infection.
Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Sep;10(9):553-62
- [43] **Hussain Z.**
Genomic Heterogeneity of Hepatitis Viruses (A-E): Role in Clinical Implications and Treatment.
"Practical Management of Chronic Viral Hepatitis", 2013.
- [44] **Feld JJ, Hoofnagle JH.**
Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C.
Nature. 2005 Aug 18;436(7053):967-72.
- [45] **Thomssen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Köchel HG, Uy A.**
Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein.
Med Microbiol Immunol. 1992;181(5):293-300.
- [46] **Heller T, Saito S, Auerbach J, Williams T, Moreen TR, Jazwinski A, Cruz B, Jeurkar N, Sapp R, Luo G, Liang TJ.**
An in vitro model of hepatitis C virion production.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 15;102(7):2579-83.
- [47] **Walewski JL, Keller TR, Stump DD, Branch AD.**
Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame.
RNA. 2001 May;7(5):710-21.
- [48] **Wang C, Sarnow P, Siddiqui A.**
Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism.
J Virol. 1993 Jun;67(6):3338-44.
- [49] **Song Y, Friebe P, Tzima E, Jünemann C, Bartenschlager R, Niepmann M.**
The hepatitis C virus RNA 3'-untranslated region strongly enhances translation directed by the internal ribosome entry site.
J Virol. 2006 Dec;80(23):11579-88. *Epub 2006 Sep 13.*

- [50] **McLauchlan J, Lemberg MK, Hope G, Martoglio B.**
Intramembrane proteolysis promotes trafficking of hepatitis C virus core protein to lipid droplets.
EMBO J. 2002 Aug 1;21(15):3980-8.
- [51] **Scheel TK, Rice CM.**
Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies.
Nat Med. 2013 Jul;19(7):837-49.
- [52] **Santolini E, Migliaccio G, La Monica N.**
Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein.
J Virol. 1994 Jun;68(6):3631-41.
- [53] **Tellinghuisen TL, Rice CM.**
Interaction between hepatitis C virus proteins and host cell factors.
Curr Opin Microbiol. 2002 Aug;5(4):419-27.
- [54] **Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX.**
Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Oct 26;96(22):12766-71.
- [55] **Lindenbach BD, Rice CM.**
Unravelling hepatitis C virus replication from genome to function.
Nature. 2005 Aug 18;436(7053):933-8.
- [56] **Liu S, Yang W, Shen L, Turner JR, Coyne CB, Wang T.**
Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection.
J Virol. 2009 Feb;83(4):2011-4.
- [57] **Moriishi K, Matsuura Y.**
Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection.
Front Microbiol. 2012 Feb 14;3:54
- [58] **Kato N.**
Molecular virology of hepatitis C virus.
Acta Med Okayama. 2001 Jun;55(3):133-59.
- [59] **Brass V, Moradpour D, Blum HE**
Molecular virology of hepatitis C virus (HCV): 2006 update.
Int J Med Sci. 2006;3(2):29-34.
- [60] **Shepard CW, Finelli L, Alter MJ.**
Global epidemiology of hepatitis C virus infection.
Lancet Infect Dis. 2005 Sep;5(9):558-67.
- [61] **Sutton AJ, Hope VD, Mathei C, Mravcik V, Sebakova H, Vallejo F, Suligoi B, Brugal MT, Ncube F, Wiessing L, Kretzschmar M.**
A comparison between the force of infection estimates for blood-borne viruses in injecting drug user populations across the European Union: a modelling study.
J Viral Hepat. 2008 Nov;15(11):809-16.

- [62] **Lo Re V 3rd, Kostman JR.**
Management of chronic hepatitis C.
Postgrad Med J. 2005 Jun;81(956):376-82.
- [63] **Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, Kako M, Ujiie N, Endo C, Matsui A, Okamoto H, Mishihiro S.**
Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. The Vertical Transmission of Hepatitis C Virus Collaborative Study Group.
N Engl J Med. 1994 Mar 17;330(11):744-50
- [64] **Alter MJ.**
Epidemiology of hepatitis C virus infection.
World J Gastroenterol. 2007 May 7;13(17):2436-41.
- [65] **Rapicetta M.**
Rapporti ISTISAN 03/29. Epatite da virus HCV e nuovi virus potenzialmente epatitici: diagnosi, epidemiologia, prevenzione e terapia.
Istituto Superiore di Sanità.
- [66] **Pomper GJ, Wu Y, Snyder EL.**
Risks of transfusion-transmitted infections: 2003.
Curr Opin Hematol. 2003 Nov;10(6):412-8.
- [67] **Poynard T., Yuen MF, Ratzin V, Lai CL.**
Viral hepatitis C.
Lancet 2003; 362(9401), 2095-2100.
- [68] **Lieber CS.**
Alcohol and Hepatitis C.
Alcohol Research and Health, 2001; 25(4), 245-254.
- [69] **Hoofnagle JH.**
Course and outcome of hepatitis C.
Hepatology. 2002 Nov;36(5 Suppl 1):S21-9.
- [70] **Alberti A, Chemello L, Benvegnù L.**
Natural history of hepatitis C.
J Hepatology 1999;31 suppl 1: 17-24
- [71] **Missiha SB, Ostrowski M, Heathcote EJ.**
Disease progression in chronic hepatitis C: modifiable and nonmodifiable factors.
Gastroenterology 2008 May;134(6):1699-714
- [72] **Hayashi N, Takehara T.**
Antiviral therapy for chronic hepatitis C: past, present, and future.
J Gastroenterol. 2006 Jan;41(1):17-27.
- [73] **Naggie S, Patel K, McHutchison J.**
Hepatitis C virus directly acting antivirals: current developments with NS3/4A HCV serine protease inhibitors.
J Antimicrob Chemother. 2010 Oct;65(10):2063-9.

- [74] **Pockros PJ.**
New direct-acting antivirals in the development for hepatitis C virus infection.
Therap Adv Gastroenterol. 2010 May;3(3):191-202
- [75] **Naggie S.**
Management of hepatitis C virus infection: the basics.
Top Antivir Med. 2012 Dec;20(5):154-61.
- [76] **Manns MP, Wedemeyer H, Cornberg M.**
Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications.
Gut. 2006 Sep;55(9):1350-9.
- [77] **Crotty S, Maag D, Arnold JJ, Zhong W, Lau JY, Hong Z, Andino R, Cameron CE.**
The broad-spectrum antiviral ribonucleoside ribavirin is an RNA virus mutagen.
Nat Med. 2000 Dec;6(12):1375-9.
- [78] **Lau JY, Tam RC, Liang TJ, Hong Z.**
Mechanism of action of ribavirin in the combination treatment of chronic HCV infection.
Hepatology. 2002 May;35(5):1002-9.
- [79] **Foy E, Li K, Wang C, Sumpter R Jr, Ikeda M, Lemon SM, Gale M Jr.**
Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease.
Science. 2003 May 16;300(5622):1145-8.
- [80] **Khabar KS, Al-Zoghaibi F, Al-Ahdal MN, Murayama T, Dhalla M, Mukaida N, Taha M, Al-Sedairy ST, Siddiqui Y, Kessie G, Matsushima K.**
The alpha chemokine, interleukin 8, inhibits the antiviral action of interferon alpha.
J Exp Med. 1997 Oct 6;186(7):1077-85.
- [81] **Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM, Tan SL, Hopkins DA, Dever TE, Polyak SJ, Gretch DR, Katze MG.**
Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein.
Virology. 1997 Apr 14;230(2):217-27.
- [82] **Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, Lai MM.**
Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein.
Science. 1999 Jul 2;285(5424):107-10.
- [83] **Duong FH, Filipowicz M, Tripodi M, La Monica N, Heim MH.**
Hepatitis C virus inhibits interferon signaling through up-regulation of protein phosphatase 2A.
Gastroenterology. 2004 Jan;126(1):263-77.
- [84] **Sarasin-Filipowicz M, Oakeley EJ, Duong FH, Christen V, Terracciano L, Filipowicz W, Heim MH.**
Interferon signaling and treatment outcome in chronic hepatitis C.
Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 May 13;105(19):7034-9.
- [85] **Quer J, Buti M, Cubero M, Guardia J, Esteban R, Esteban JI.**
New strategies for the treatment of hepatitis C virus infection and implications of resistance to new direct-acting antiviral agents.
Infect Drug Resist. 2010;3:133-45.
-

- [86] **Lange CM, Zeuzem S.**
Perspectives and challenges of interferon-free therapy for chronic hepatitis C.
J Hepatol. 2013 Mar;58(3):583-92.
- [87] **Venegas M, Brahm J, Villanueva RA.**
Genomic determinants of hepatitis C virus antiviral therapy outcomes: toward individualized treatment.
Ann Hepatol. 2012 Nov-Dec;11(6):827-37.
- [88] **Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG.**
Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus.
Gastroenterology. 2010 Jul;139(1):120-9.e18
- [89] **Chayama K, Hayes CN, Abe H, Miki D, Ochi H, Karino Y, Toyota J, Nakamura Y, Kamatani N, Sezaki H, Kobayashi M, Akuta N, Suzuki F, Kumada H.**
IL28B but not ITPA polymorphism is predictive of response to pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir triple therapy in patients with genotype 1 hepatitis C.
J Infect Dis. 2011 Jul 1;204(1):84-93.
- [90] **Manns MP, McHutchison JG, Gordon SC, Rustgi VK, Shiffman M, Reindollar R, Goodman ZD, Koury K, Ling M, Albrecht JK.**
Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial.
Lancet. 2001 Sep 22;358(9286):958-65.
- [91] **McCown MF, Rajyaguru S, Kular S, Cammack N, Nájera I.**
GT-1a or GT-1b subtype-specific resistance profiles for hepatitis C virus inhibitors telaprevir and HCV-796.
Antimicrob Agents Chemother. 2009 May;53(5):2129-32.
- [92] **Berg T, Weich V, Teuber G, Klinker H, Möller B, Rasenack J, Hinrichsen H, Gerlach T, Spengler U, Buggisch P, Balk H, Zankel M, Neumann K, Sarrazin C, Zeuzem S.**
Individualized treatment strategy according to early viral kinetics in hepatitis C virus type 1-infected patients.
Hepatology. 2009 Aug;50(2):369-77. doi: 10.1002/hep.22991.
- [93] **Davis GL, Wong JB, McHutchison JG, Manns MP, Harvey J, Albrecht J.**
Early virologic response to treatment with peginterferon alfa-2b plus ribavirin in patients with chronic hepatitis C.
Hepatology. 2003 Sep;38(3):645-52.
- [94] **Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Ogura Y, Izumi N, Marumo F, Sato C.**
Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection.
N Engl J Med. 1996 Jan 11;334(2):77-81.

- [95] Shimizu YK, Igarashi H, Kiyohara T, Cabezon T, Farci P, Purcell RH, Yoshikura H.
A hyperimmune serum against a synthetic peptide corresponding to the hypervariable region 1 of hepatitis C virus can prevent viral infection in cell cultures.
Virology. 1996 Sep 15;223(2):409-12.
- [96] Sarrazin C, Susser S, Doehring A, Lange CM, Müller T, Schlecker C, Herrmann E, Lötsch J, Berg T.
Importance of IL28B gene polymorphisms in hepatitis C virus genotype 2 and 3 infected patients.
J Hepatol. 2011 Mar;54(3):415-21.
- [97] Sheppard P, Kindsvogel W, Xu W, Henderson K, Schlutsmeyer S, Whitmore TE, Kuestner R, Garrigues U, Birks C, Roraback J, Ostrander C, Dong D, Shin J, Presnell S, Fox B, Haldeman B, Cooper E, Taft D, Gilbert T, Grant FJ, Tackett M, Krivan W, McKnight G, Clegg C, Foster D, Klucher KM.
IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R.
Nat Immunol. 2003 Jan;4(1):63-8.
- [98] Fujie H, Numasaki M.
Type III Interferons IL-28 and IL-29: Novel Interferon Family Members with Therapeutic Potential in Cancer Therapy.
InTech 2012, ISBN: 978-953-307-998-1
- [99] Prokunina-Olsson L, Muchmore B, Tang W, Pfeiffer RM, Park H, Dickensheets H, Hergott D, Porter-Gill P, Mumy A, Kohaar I, Chen S, Brand N, Tarway M, Liu L, Sheikh F, Astemborski J, Bonkovsky HL, Edlin BR, Howell CD, Morgan TR, Thomas DL, Rehermann B, Donnelly RP, O'Brien TR.
A variant upstream of IFNL3 (IL28B) creating a new interferon gene IFNL4 is associated with impaired clearance of hepatitis C virus.
Nat Genet. 2013 Feb;45(2):164-71.
- [100] Ray K.
Hepatitis: New gene IFNL4 is associated with impaired clearance of HCV.
Nat Rev Gastroenterol Hepatol. 2013 Feb;10(2):63.
- [101] Dianzani F.
Biological basis for the clinical use of interferon.
Gut. 1993;34(2 Suppl):S74-6.
- [102] Bonjardim CA, Ferreira PC, Kroon EG.
Interferons: signaling, antiviral and viral evasion.
Immunol Lett. 2009 Jan 29;122(1):1-11.
- [103] Marcello T, Grakoui A, Barba-Spaeth G, Machlin ES, Kotenko SV, MacDonald MR, Rice CM.
Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics.
Gastroenterology. 2006 Dec;131(6):1887-98. Epub 2006 Oct 1.
- [104] Sirén J, Pirhonen J, Julkunen I, Matikainen S.
IFN-alpha regulates TLR-dependent gene expression of IFN-alpha, IFN-beta, IL-28, and IL-29.
J Immunol. 2005 Feb 15;174(4):1932-7.

- [105] **Tissari J, Sirén J, Meri S, Julkunen I, Matikainen S.**
IFN-alpha enhances TLR3-mediated antiviral cytokine expression in human endothelial and epithelial cells by up-regulating TLR3 expression.
J Immunol. 2005 Apr 1;174(7):4289-94.
- [106] **Honda K, Takaoka A, Taniguchi T.**
Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors.
Immunity. 2006 Sep;25(3):349-60.
- [107] **Clark PJ, Thompson AJ, McHutchison JG.**
IL28B genomic-based treatment paradigms for patients with chronic hepatitis C infection: the future of personalized HCV therapies.
Am J Gastroenterol. 2011 Jan;106(1):38-45.
- [108] **Afdhal NH, McHutchison JG, Zeuzem S, Mangia A, Pawlotsky JM, Murray JS, Shianna KV, Tanaka Y, Thomas DL, Booth DR, Goldstein DB; Pharmacogenetics and Hepatitis C Meeting Participants.**
Hepatitis C pharmacogenetics: state of the art in 2010.
Hepatology. 2011 Jan;53(1):336-45.
- [109] **Ge D, Fellay J, Thompson AJ, Simon JS, Shianna KV, Urban TJ, Heinzen EL, Qiu P, Bertelsen AH, Muir AJ, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB.**
Genetic variation in IL28B predicts hepatitis C treatment-induced viral clearance.
Nature. 2009 Sep 17;461(7262):399-401.
- [110] **McCarthy JJ, Li JH, Thompson A, Suchindran S, Lao XQ, Patel K, Tillmann HL, Muir AJ, McHutchison JG.**
Replicated association between an IL28B gene variant and a sustained response to pegylated interferon and ribavirin.
Gastroenterology. 2010 Jun;138(7):2307-14.
- [111] **Bronowicki JP, Hezode C, Bengtsson L, Pol S, Bourliere M, Serfaty L, de Ledinghen V, Tran A, Benhamou Y, Grange JD, Mathurin P, Marcellin P, Trepo C, Zarski J-P, Seepersaud S, Kelliher K, Botfield M, Pawlotsky J.**
100% SVR in IL28B CC patients treated with 12 weeks of telaprevir, peginterferon and ribavirin in the prove2 trial.
J. Hepatol. 2012, 56, S430–S431.
- [112] **Balagopal A, Thomas DL, Thio CL.**
IL28B and the control of hepatitis C virus infection.
Gastroenterology. 2010 Dec;139(6):1865-76.
- [113] **Tanaka Y, Nishida N, Sugiyama M, Kurosaki M, Matsuura K, Sakamoto N, Nakagawa M, Korenaga M, Hino K, Hige S, Ito Y, Mita E, Tanaka E, Mochida S, Murawaki Y, Honda M, Sakai A, Hiasa Y, Nishiguchi S, Koike A, Sakaida I, Imamura M, Ito K, Yano K, Masaki N, Sugauchi F, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M.**
Genome-wide association of IL28B with response to pegylated interferon-alpha and ribavirin therapy for chronic hepatitis C.
Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1105-9.

- [114] **Suppiah V, Moldovan M, Ahlenstiel G, Berg T, Weltman M, Abate ML, Bassendine M, Spengler U, Dore GJ, Powell E, Riordan S, Sheridan D, Smedile A, Fragomeli V, Müller T, Bahlo M, Stewart GJ, Booth DR, George J.**
IL28B is associated with response to chronic hepatitis C interferon-alpha and ribavirin therapy.
Nat Genet. 2009 Oct;41(10):1100-4.
- [115] **Rauch A, Kutalik Z, Descombes P, Cai T, Di Iulio J, Mueller T, Bochud M, Battegay M, Bernasconi E, Borovicka J, Colombo S, Cerny A, Dufour JF, Furrer H, Günthard HF, Heim M, Hirschel B, Malinverni R, Moradpour D, Müllhaupt B, Witteck A, Beckmann JS, Berg T, Bergmann S, Negro F, Telenti A, Bochud PY; Swiss Hepatitis C Cohort Study; Swiss HIV Cohort Study.**
Genetic variation in IL28B is associated with chronic hepatitis C and treatment failure: a genome-wide association study.
Gastroenterology. 2010 Apr;138(4):1338-45, 1345.e1-7.
- [116] **Akuta N, Suzuki F, Hirakawa M, Kawamura Y, Yatsuji H, Sezaki H, Suzuki Y, Hosaka T, Kobayashi M, Kobayashi M, Saitoh S, Arase Y, Ikeda K, Chayama K, Nakamura Y, Kumada H.**
Amino acid substitution in hepatitis C virus core region and genetic variation near the interleukin 28B gene predict viral response to telaprevir with peginterferon and ribavirin.
Hepatology. 2010 Aug;52(2):421-9.
- [117] **Mangia A, Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Tillmann HL, Patel K, Shianna KV, Mottola L, Petruzzellis D, Bacca D, Carretta V, Minerva N, Goldstein DB, McHutchison JG.**
An IL28B polymorphism determines treatment response of hepatitis C virus genotype 2 or 3 patients who do not achieve a rapid virologic response.
Gastroenterology. 2010 Sep;139(3):821-7, 827.
- [118] **Thomas DL, Thio CL, Martin MP, Qi Y, Ge D, O'Huigin C, Kidd J, Kidd K, Khakoo SI, Alexander G, Goedert JJ, Kirk GD, Donfield SM, Rosen HR, Tobler LH, Busch MP, McHutchison JG, Goldstein DB, Carrington M.**
Genetic variation in IL28B and spontaneous clearance of hepatitis C virus.
Nature. 2009 Oct 8;461(7265):798-801
- [119] **Thompson AJ, Muir AJ, Sulkowski MS, Ge D, Fellay J, Shianna KV, Urban T, Afdhal NH, Jacobson IM, Esteban R, Poordad F, Lawitz EJ, McCone J, Shiffman ML, Galler GW, Lee WM, Reindollar R, King JW, Kwo PY, Ghalib RH, Freilich B, Nyberg LM, Zeuzem S, Poynard T, Vock DM, Pieper KS, Patel K, Tillmann HL, Noviello S, Koury K, Pedicone LD, Brass CA, Albrecht JK, Goldstein DB, McHutchison JG.**
Interleukin-28B polymorphism improves viral kinetics and is the strongest pretreatment predictor of sustained virologic response in genotype 1 hepatitis C virus.
Gastroenterology. 2010 Jul;139(1):120-9.e18.
- [120] **Fraser JH, Meyers H, Henderson JF, Brox LW, McCoy EE.**
Individual variation in inosine triphosphate accumulation in human erythrocytes.
Clin Biochem. 1975 Dec;8(6):353-64.
- [121] **Sumi S, Marinaki AM, Arenas M, Fairbanks L, Shobowale-Bakre M, Rees DC, Thein SL, Ansari A, Sanderson J, De Abreu RA, Simmonds HA, Duley JA.**
Genetic basis of inosine triphosphate pyrophosphohydrolase deficiency.
Hum Genet. 2002 Oct;111(4-5):360-7.
-

- [122] **Arenas M, Duley J, Sumi S, Sanderson J, Marinaki A.**
The ITPA c.94C>A and g.IVS2+21A>C sequence variants contribute to missplicing of the ITPA gene. Biochim Biophys Acta. 2007 Jan;1772(1):96-102
- [123] **Fellay J, Thompson AJ, Ge D, Gumbs CE, Urban TJ, Shianna KV, Little LD, Qiu P, Bertelsen AH, Watson M, Warner A, Muir AJ, Brass C, Albrecht J, Sulkowski M, McHutchison JG, Goldstein DB.**
ITPA gene variants protect against anaemia in patients treated for chronic hepatitis C. Nature. 2010 Mar 18;464(7287):405-8.
- [124] **Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsunami H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, Mizokami M.**
Genome-wide association study identified ITPA/DDR1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. Hum Mol Genet. 2011 Sep 1;20(17):3507-16.
- [125] **Hitomi Y, Cirulli ET, Fellay J, McHutchison JG, Thompson AJ, Gumbs CE, Shianna KV, Urban TJ, Goldstein DB.**
Inosine triphosphate protects against ribavirin-induced adenosine triphosphate loss by adenylosuccinate synthase function. Gastroenterology. 2011 Apr;140(4):1314-21.
- [126] **Thompson AJ, Santoro R, Piazzolla V, Clark PJ, Naggie S, Tillmann HL, Patel K, Muir AJ, Shianna KV, Mottola L, Petruzzellis D, Romano M, Sogari F, Facciorusso D, Goldstein DB, McHutchison JG, Mangia A.**
Inosine triphosphatase genetic variants are protective against anemia during antiviral therapy for HCV2/3 but do not decrease dose reductions of RBV or increase SVR. Hepatology. 2011 Feb;53(2):389-95.
- [127] **Thompson AJ, Fellay J, Patel K, Tillmann HL, Naggie S, Ge D, Urban TJ, Shianna KV, Muir AJ, Fried MW, Afdhal NH, Goldstein DB, McHutchison JG.**
Variants in the ITPA gene protect against ribavirin-induced hemolytic anemia and decrease the need for ribavirin dose reduction. Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1181-9.
- [128] **Suzuki F, Suzuki Y, Akuta N, Sezaki H, Hiraoka M, Kawamura Y, Hosaka T, Kobayashi M, Saito S, Arase Y, Ikeda K, Kobayashi M, Chayama K, Kamatani N, Nakamura Y, Miyakawa Y, Kumada H.**
Influence of ITPA polymorphisms on decreases of hemoglobin during treatment with pegylated interferon, ribavirin, and telaprevir. Hepatology. 2011 Feb;53(2):415-21.
- [129] **Wheeler DL, Barrett T, Benson DA, Bryant SH, Canese K, Chetvernin V, Church DM, DiCuccio M, Edgar R, Federhen S, Geer LY, Helmberg W, Kapustin Y, Kenton DL, Khovayko O, Lipman DJ, Madden TL, Maglott DR, Ostell J, Pruitt KD, Schuler GD, Schriml LM, Sequeira E, Sherry ST, Sirotkin K, Souvorov A, Starchenko G, Suzek TO, Tatusov R, Tatusova TA, Wagner L, Yaschenko E.**
Database resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res. 2006 Jan 1;34(Database issue):D173-80.

COMUNICAZIONI ORALI E POSTER

COMUNICAZIONE ORALE

Bugin E, Bortolozzo K, Ragazzi E.

Development and Validation of a Pharmacogenetic Test for Correct Management of HCV Patients Treated with Pegylated-Interferon (PegINF) plus Ribavirin (RBV)

36° Congresso Nazionale Della Società Italiana Di Farmacologia, 2013

POSTER

Bugin E, Bortolozzo K, Paladin D, Pelloso M, Moz S, Bozzato D, Fogar P, Basso D, Carlo-Federico Zambon CF, Plebani M.

AB WARFARIN TYPE: Sviluppo di un test farmacogenetico per il dosaggio individuale del Warfarin (Coumadin®)

Il Congresso Nazionale "Nuove Tecnologie Di Medicina Personalizzata Nell'era Post-Genomica", 2013

POSTER

Bugin E, Maran C, Cabrini G, Cantù C, Ragazzi E.

O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation Status: Qualitative and Quantitative Methods to predict Response to Temozolomide and Radiotherapy in the Neoplastic Neurological Disease

16° Seminario Nazionale Dottorandi ed Assegnisti, 2012

POSTER

Bugin E, Bortolozzo K, Ragazzi E.

Design and development of a pharmacogenetic molecular test for predicting personalized Warfarin dosages.

III Convegno Monotematico SIF "Farmacogenomica e cancro: dal laboratorio alla clinica", 2011

POSTER

Bugin E.

Design and development of pharmacogenetic molecular tests

35° Congresso Nazionale Della Società Italiana Di Farmacologia, 2011

RICONOSCIMENTI

Vincitrice del premio come miglior poster al 35° Congresso Nazionale Della Società Italiana Di Farmacologia (2011).

APPENDICE A

Tab. A: genotipo per ciascun polimorfismo indagato dei campioni analizzati in questo studio.

ID campione	[DNA] ng/ μ l	CYP2C9 (rs1799853 C>T)		CYP2C9 (rs1057910 A>C)		CYP4F2 (rs2108622 C>T)		VKORC1 (rs9923231 G>A)		Variante Allelica CYP2C9	Variante Allelica CYP4F2
		IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB		
1_LBM	68	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
2_LBM	85	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
3_LBM	74	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*3	*1*3
4_LBM	42	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
5_LBM	80	C/T	C/T	A/C	A/C	C/T	C/T	A/A	A/A	*2*3	*1*3
6_LBM	28	T/T	T/T	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*2*2	*3*3
7_LBM	120	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/T	A/A	A/A	*3*3	*1*3
8_LBM	35	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
9_LBM	61	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
10_LBM	177	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
11_LBM	178	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
12_LBM	52	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*1	*3*3
13_LBM	50	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
14_LBM	40	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*1	*1*3
15_LBM	40	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*1	*1*3
16_LBM	38	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1

17_LBM	32	C/T	C/T	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*2*	*3*3
18_LBM	25	C/T	C/T	A/C	A/C	C/C	C/C	G/G	G/G	*2*3	*1*1
19_LBM	35	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
20_LBM	37	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	G/G	G/G	*3*3	*3*3
21_LBM	35	C/C	C/C	A/C	A/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*3	*1*1
22_LBM	45	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
23_LBM	41	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
24_LBM	40	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*2	*1*3
25_LBM	43	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*2	*1*3
26_LBM	39	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
27_LBM	26	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	*3*3	*1*1
28_LBM	7,9	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*1	*1*3
29_LBM	48,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
30_LBM	13,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
31_LBM	14,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
32_LBM	75	T/T	T/T	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*2*2	*3*3
33_LBM	25	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*2	*1*3
34_LBM	33	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
35_LBM	17,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
36_LBM	35	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
37_LBM	30	C/T	C/T	A/C	A/C	C/C	C/C	G/G	G/G	*2*3	*1*1
38_LBM	20	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
39_LBM	9	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*1	*3*3
40_LBM	22,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*1	*1*3
41_LBM	7,5	C/C	C/C	A/C	A/C	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*3	*1*1

42_LBM	40,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
43_LBM	34,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
44_LBM	28	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*1	*1*3
45_LBM	18	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
46_LBM	27,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
47_LBM	12,1	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
48_LBM	21	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	A/A	A/A	*1*1	*3*3
49_LBM	22	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*2	*1*3
50_LBM	53	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
51_LBM	36,4	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
52_LBM	36,2	C/C	C/C	A/C	A/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*3	*1*1
53_LBM	24	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*2	*1*3
54_LBM	90	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	G/A	G/A	*3*3	*3*3
55_LBM	85	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*2	*1*3
56_LBM	70	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*3*3	*1*1
57_LBM	76,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*1	*1*3
58_LBM	66,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
59_LBM	56,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
60_LBM	67	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
61_LBM	31,2	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	G/A	G/A	*1*1	*3*3
62_LBM	52,5	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
63_LBM	25	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
64_LBM	24,3	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
65_LBM	43,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
66_LBM	22,5	C/C	C/C	C/C	C/C	C/T	C/T	G/G	G/G	*3*3	*1*3

67_LBM	27	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
68_LBM	23,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
69_LBM	29	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
70_LBM	28	C/T	C/T	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*2	*3*3
71_LBM	30	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
72_LBM	25,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
73_LBM	7,7	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*1	*1*3
74_LBM	21,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
75_LBM	27	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*1	*1*3
76_LBM	32	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*1	*1*3
77_LBM	20,5	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
78_LBM	28	C/C	C/C	A/C	A/C	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*3	*1*1
79_LBM	46	C/T	C/T	A/C	A/C	C/C	C/C	G/G	G/G	*2*3	*1*1
80_LBM	30	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*1	*1*1
81_LBM	25	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/G	G/G	*3*3	*1*1
82_LBM	20	T/T	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*2*2	*1*1
83_LBM	30	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	G/G	G/G	*3*3	*3*3
84_LBM	24,5	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*2	*1*1
85_LBM	26,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
86_LBM	12	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*2	*1*1
87_LBM	17	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*2	*1*1
88_LBM	30,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
89_LBM	24	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
90_LBM	7	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3
91_LBM	25	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*2	*1*3

92_LBM	15	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*2	*1*3
93_LBM	22	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*3	*1*3
94_LBM	24,5	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*1	*1*3
95_LBM	32	C/T	C/T	A/C	A/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*2*3	*1*1
96_LBM	25	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
97_LBM	20	T/T	T/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/A	G/A	*2*2	*1*3
98_LBM	19	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*2	*1*1
99_LBM	28	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*2	*1*3
100_LBM	24	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
101_LBM	25	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
102_LBM	20	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
103_LBM	32,5	C/C	C/C	C/C	C/C	T/T	T/T	G/A	G/A	*3*3	*3*3
104_LBM	37	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*3*3	*1*1
105_LBM	34	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
106_LBM	20,5	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*3	*1*3
107_LBM	23	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	G/A	G/A	*1*3	*1*3
108_LBM	10	C/C	C/C	A/C	A/C	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*3	*3*3
109_LBM	19	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/G	G/G	*1*2	*1*1
110_LBM	11	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
111_LBM	54,5	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*2	*1*1
112_LBM	25	C/C	C/C	A/C	A/C	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*3	*1*3
113_LBM	48	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*1	*1*1
114_LBM	45	C/T	C/T	A/A	A/A	C/T	C/T	G/G	G/G	*1*2	*1*3
115_LBM	22	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	G/G	G/G	*1*1	*3*3
116_LBM	14	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1

117_LBM	30,5	C/T	C/T	A/A	A/A	C/C	C/C	G/A	G/A	*1*2	*1*1
118_LBM	20	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	A/A	A/A	*1*1	*3*3
119_LBM	45	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1
120_LBM	34	C/C	C/C	A/A	A/A	C/T	C/T	A/A	A/A	*1*1	*1*3
121_LBM	42	C/C	C/C	A/A	A/A	T/T	T/T	A/A	A/A	*1*1	*3*3
122_LBM	30	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	*3*3	*1*1
123_LBM	60	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	A/A	A/A	*3*3	*1*1
124_LBM	55	C/T	C/T	A/C	A/C	C/C	C/C	G/A	G/A	*2*3	*1*1
125_AB	100	C/C	C/C	A/A	A/A	C/C	C/C	A/A	A/A	*1*1	*1*1

APPENDICE B

Tab. B: genotipo per ciascun polimorfismo indagato dei campioni analizzati in questo studio. *VR: *Virologic Response*, risposta virologica alla fine del trattamento; *SVR: *Sustained Virological Response*; *NR: *Non-Response*; *RR: *Relapse*; *nd: dato non disponibile.

ID campione	IL28B rs12979860 C>T		IL28B rs8099917 T>G		ITPA rs7270101 A>C		ITPA rs1127354 C>A		Eta'	Sesso	GT HCV	VR*	Hb basale g/dl	Hb T3 g/dl	Hb T6 g/dl
	IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB	IVD R.	IVD AB							
1_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	60	M	2	SVR*	14,2	10,1	98
2_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	65	M	1	NR*	16,0	12,9	//
3_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/C	nd	C/C	61	F	3	SVR	11,6	11,9	//
4_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	52	F	1	NR	15,3	10,7	108
5_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	58	M	1	NR	14,3	13,3	126
6_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/A	nd	C/C	56	F	1	NR	14,0	12,0	//
7_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	C/C	nd	C/C	65	F	1	NR	14,2	12,3	//
8_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	54	M	1	NR	17,3	14,4	//
9_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/A	nd	C/C	65	M	1	NR	15,6	12,2	//
10_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	62	F	2	SVR	13,7	12,1	//
11_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/A	52	M	1	RR*	15,2	11,5	124
12_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	55	M	4	SVR	14,1	11,9	116
13_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/A	58	M	3	SVR	16,1	14,5	137
14_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	A/A	nd	A/A	59	M	1	SVR	15,1	13,3	129
15_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/A	nd	C/C	52	M	2	RR	15,3	//	//

16_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	58	M	1	RR	16,6	14,5	145
17_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/C	nd	C/C	60	F	1	NR	13,9	10,9	//
18_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	55	M	1	NR	16,5	12,2	//
19_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	60	M	1	NR	15,7	12,3	//
20_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	53	M	2	RR	15,8	12,2	127
21_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/C	nd	C/C	64	M	1	RR	15,9	13,7	137
22_DIMED	T/T	T/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	60	F	1	NR	15,2	12,1	//
23_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/C	nd	C/A	65	M	1	SVR	15,9	14,0	145
24_DIMED	T/T	T/T	T/T	T/T	nd	A/C	nd	C/C	58	F	2	SVR	12,9	12,1	125
25_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	52	F	2	SVR	14,5	10,5	//
26_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/A	nd	C/C	37	M	2	SVR	16,1	13,6	128
27_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/C	nd	C/A	33	F	1	SVR	13,8	12,6	129
28_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/C	nd	C/C	48	F	1	RR	15,9	12,0	122
29_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	43	F	2	SVR	12,6	11,8	115
30_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	41	M	3	RR	16,4	12,0	121
31_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/C	nd	C/C	49	M	1	SVR	16,6	13,0	116
32_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	37	M	1	SVR	14,5	11,7	113
33_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	30	M	2	RR	15,7	12,6	//
34_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	49	M	4	SVR	15,2	11,9	122
35_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	46	M	1	RR	17,7	11,2	120
36_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	42	M	3	SVR	16,4	14,6	//
37_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/C	nd	C/C	55	F	1	RR	14,5	12,0	124
38_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	32	F	3	SVR	14,2	10,9	//
39_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/A	58	M	1	RR	14,6	14,3	144
40_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	59	F	2	SVR	13,2	11,6	110

41_DIMED	T/T	T/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	52	F	2	SVR	12,9	10,9	106
42_DIMED	C/T	C/T	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	58	F	1	RR	13,7	10,4	94
43_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	60	M	1	NR	13,8	10,8	//
44_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	47	F	2	SVR	12,6	10,5	98
45_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	55	F	1	NR	13,9	10,9	108
46_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	60	F	2	RR	14,0	10,9	116
47_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/C	53	F	1	SVR	13,6	10,2	109
48_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	45	F	2	SVR	13,6	10,3	108
49_DIMED	C/C	C/C	T/T	T/T	nd	A/A	nd	C/C	60	M	1	NR	14,6	10,8	136
50_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/C	nd	C/C	65	F	1	NR	14,2	10,8	//
51_DIMED	C/T	C/T	T/G	T/G	nd	A/A	nd	C/A	58	M	1	SVR	15,1	12,7	129
52_DIMED	T/T	T/T	G/G	G/G	nd	A/A	nd	C/C	42	M	1	NR	16,0	13,8	//
53_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	43	M	1b	nd*	nd	nd	nd
54_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	65	M	1b	nd	nd	nd	nd
55_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	C/C	C/C	C/C	C/C	58	M	1b	nd	nd	nd	nd
56_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	54	F	1b	nd	nd	nd	nd
57_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	58	F	1b	nd	nd	nd	nd
58_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	61	M	1b	nd	nd	nd	nd
59_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	62	F	1a	nd	nd	nd	nd
60_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	54	M	1b	nd	nd	nd	nd
61_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	62	F	1b	nd	nd	nd	nd
62_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	70	M	1b	nd	nd	nd	nd
63_LEM	T/T	T/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	72	M	1b	nd	nd	nd	nd
64_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	49	M	1b	nd	nd	nd	nd
65_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	64	F	1b	nd	nd	nd	nd

66_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	43	M	1b	nd	nd	nd	nd
67_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	50	M	1a	nd	nd	nd	nd
68_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	55	M	1b	nd	nd	nd	nd
69_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	70	M	1a	nd	nd	nd	nd
70_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	67	M	1b	nd	nd	nd	nd
71_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	51	M	1a	nd	nd	nd	nd
72_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	49	M	1b	nd	nd	nd	nd
73_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	56	F	1b	nd	nd	nd	nd
74_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	40	F	1b	nd	nd	nd	nd
75_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	40	F	1b	nd	nd	nd	nd
76_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	50	M	1b	nd	nd	nd	nd
77_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	49	F	1a	nd	nd	nd	nd
78_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	60	M	1b	nd	nd	nd	nd
79_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	71	M	1b	nd	nd	nd	nd
80_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
81_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
82_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
83_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
84_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
85_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
86_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
87_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
88_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
89_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
90_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

91_LEM	T/T	T/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
92_LEM	T/T	T/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
93_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
94_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
95_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
96_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
97_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
98_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
99_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
100_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
101_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
102_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
103_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
104_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
105_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
106_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
107_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
108_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
109_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
110_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
111_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
112_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
113_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
114_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
115_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

116_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
117_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
118_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
119_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
120_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
121_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
122_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
123_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
124_LEM	T/T	T/T	nd	G/G	A/A	A/A	C/C	C/C	68	F	1b	nd	nd	nd	nd
125_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	70	M	1b	nd	nd	nd	nd
126_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	51	M	1b	nd	nd	nd	nd
127_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	53	M	1a	nd	nd	nd	nd
128_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	51	F	1a	nd	nd	nd	nd
129_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	74	M	1b	nd	nd	nd	nd
130_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	46	M	1a	nd	nd	nd	nd
131_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	50	M	1b	nd	nd	nd	nd
132_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	64	M	1a	nd	nd	nd	nd
133_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/C	A/C	C/C	C/C	67	M	1b	nd	nd	nd	nd
134_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	68	F	1b	nd	nd	nd	nd
135_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	57	M	1b	nd	nd	nd	nd
136_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	43	M	1a	nd	nd	nd	nd
137_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	50	F	1b	nd	nd	nd	nd
138_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	49	M	4	nd	nd	nd	nd
139_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	50	M	1a	nd	nd	nd	nd
140_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	63	M	3a	nd	nd	nd	nd

141_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	48	M	1a	nd	nd	nd	nd
142_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	58	M	2	nd	nd	nd	nd
143_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	53	M	1a	nd	nd	nd	nd
144_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	60	M	1b	nd	nd	nd	nd
145_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	60	F	2	nd	nd	nd	nd
146_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	C/C	C/C	C/C	C/C	48	M	1a	nd	nd	nd	nd
147_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	45	M	1b	nd	nd	nd	nd
148_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/A	C/A	48	F	1b	nd	nd	nd	nd
149_LEM	C/C	C/C	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	51	M	1a	nd	nd	nd	nd
150_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	44	M	1b	nd	nd	nd	nd
151_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	64	F	1b	nd	nd	nd	nd
152_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/A	C/A	60	M	1b	nd	nd	nd	nd
153_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	54	M	1a	nd	nd	nd	nd
154_LEM	T/T	T/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	56	M	1b	nd	nd	nd	nd
155_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	52	F	3	nd	nd	nd	nd
156_LEM	C/C	C/C	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	57	F	1b	nd	nd	nd	nd
157_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/C	A/C	C/C	C/C	46	M	1b	nd	nd	nd	nd
158_LEM	C/T	C/T	nd	T/G	A/A	A/A	C/C	C/C	58	M	1b	nd	nd	nd	nd
159_LEM	C/T	C/T	nd	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	55	M	1a	nd	nd	nd	nd
160_AB	C/T	C/T	T/T	T/T	A/A	A/A	C/C	C/C	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd