

□



SOLICITUD DE PROYECTO DE INVESTIGACION

Título del proyecto: Variabilidad del Virus de la hepatitis C y su impacto sobre el tratamiento con antivirales de acción directa. Caracterización molecular de los fracasos terapéuticos.

Investigador coordinador: Federico García (HUSC, Granada)

Investigadores principales: Eva Poveda (Virología Clínica, Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña-INIBIC), Xavier López-Labrador (FISABIO-Salud Pública/UEG), Antonio Aguilera (CHUS Santiago Compostela), Luis Miguel real (Hospital de Valme)

Personal participante en el proyecto: Natalia Chueca (HUSC), Marta Álvarez (HUSC), Fernando González (FISABIO-Salud Pública/UEG)

Objetivos

- 1.-General: Consolidar un proyecto “faro” asociado al proyecto GEHEP-001, que sirva como plataforma para los estudios virológicos y de epidemiología molecular en GEHEP.
- 2.- Específicos:
 - a. Describir la presencia de polimorfismos asociados a resistencia a los antivirales de acción directa y determinar las tasas de prevalencia en los diferentes aislados de VHC que circulan en nuestro medio.
 - b. Caracterizar las mutaciones que aparecen en los fracasos a antivirales de acción directa, y su cinética de reversión
 - c. Estimar la introducción de cepas con polimorfismos que se puedan asociar a resistencia a los nuevos DAAS en los últimos años.
 - d. Determinar el valor y el papel de la secuenciación masiva de genomas únicos (UDS) en la detección de polimorfismos frente a los antivirales de acción directa.

Metodología

Para la inclusión y seguimiento de pacientes se seguirán los criterios especificados en el proyecto GEHEP-001. Las muestras se procesarán en los centros participantes en el estudio en base a criterios de proximidad geográfica, siguiendo protocolos aportados y consensuados por todos los centros participantes. Las determinaciones relativas a secuenciación masiva se realizarán en el laboratorio de virología del Área de Genómica y Salud de FISABIO-Salud Pública/UEG, cuyo responsable es Xavier López-Labrador.

Metodología de laboratorio:

Secuenciación de poblaciones NS3/4a, NS5a y NS5b: Se realizará una extracción de ARN a partir de 1 ml de plasma en sistemas automatizados, para posteriormente realizar RT-PCRs específicas de cada una de las regiones. Los productos de RT-PCR se someterán a Nested PCR específicas, que posteriormente serán secuenciados. Las

secuencias fastas obtenidas se exportarán y se tratarán con programas de alineamiento y filogenia para determinar todos los cambios presentes en cada región frente a su cepa de referencia.

Secuenciación masiva de NS3/4a, NS5a y NS5b: Se realizará la extracción de ARN a partir de 1 ml de plasma con en sistemas automatizados o con kits comerciales. Posteriormente se realizará una RT-PCR específica para la región de interés, por triplicado para evitar el “founding effect”. Tras la preparación de las librerías, las muestras se amplificarán mediante emPCR y se secuenciarán mediante pirosecuenciación con la tecnología 454 de Roche. Las secuencias obtenidas se analizarán con el software AVA (Roche) y también mediante algoritmos alternativos, basados en filtrados de calidad de los archivos de imagen de la pirosecuenciación y posterior filtrado genético de los archivos de salida fastq. Se establecerá el 1% como límite de sensibilidad para variantes minoritarias de la secuenciación masiva, por lo que todas las secuencias que representen menos del 1% no se considerarán en primera instancia para los análisis. La reproducibilidad de la secuenciación masiva se realizará utilizando controles de clones moleculares para cada una de las regiones del VHC a estudiar. Durante el desarrollo del estudio se contempla la valoración de otras plataformas de secuenciación masiva si fuese necesario (p.ej. Illumina, Ion Torrent).

Recogida de datos:

Se diseñará una Base de Datos (BdD) protegida con clave y dotada de diferentes mecanismos lógicos que impidan la introducción de datos erróneos a la cual solo podrán acceder los investigadores implicados en este proyecto, cabe aclarar que se separan en una segunda BdD y con diferente clave de acceso los datos identificativos de los pacientes, en esta ultima BdD el acceso estará permitido solo al Investigador principal, todos los investigadores se comprometen a respetar la confidencialidad de los datos de acuerdo a la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, sobre la Protección de datos de Carácter Personal y la ley 41/2002 de 14 de noviembre, ley básica reguladora de la autonomía del paciente y derechos y obligaciones en materia de información y documentación clínica.

Variables:

Edad, sexo, raza, vía de transmisión, país de origen, fecha de infección, carga viral VHC, serología hepatitis B, enzimas hepáticas, grado de fibrosis (si disponible), genotipo IL28 (si disponible), genotipo y subtipo de VHC mediante método comercial; genotipo, subtipo, aislado, polimorfismos en NS3/4a, NS5a y NS5b mediante secuenciación poblacional y masiva de genomas únicos.

Análisis de datos:

Se aplicará el test de Shapiro-Wilk o bien el test omnibus de D'Agostino-Pearson para comprobar si las variables cuantitativas analizadas siguen una distribución normal y se efectuará transformación logarítmica en aquellas que no la sigan.

Estadística descriptiva

La estadística descriptiva será utilizada para todas las variables del estudio. Las variables categóricas se resumirán mediante distribución de frecuencias absolutas y relativas. Cuando sea apropiado se resumirán las medidas de asociación mediante riesgos relativos, odds ratios y sus intervalos de confianza. Para las variables continuas se presentara el número de observaciones válidas así como estadísticos

que describan el promedio y la distribución de la distribución (media $\pm$ desviación estándar).

Métodos estadísticos analíticos:

Para el análisis estadístico que compare y relacione las variables principales y secundarias hará falta una amplia variedad de técnicas estadísticas. Así se elegirán las técnicas estadísticas en función del número y naturaleza de las variables a relacionar. Un resumen de las técnicas a utilizar se relaciona a continuación:

Las comparaciones intersujetos de variables categóricas se analizarán mediante las pruebas chi-cuadrado de Pearson (o estadístico exacto de Fisher para tablas 2x2). Las comparaciones intra-sujetos de variables categóricas se analizarán mediante las pruebas Q de Cochran (más de dos mediciones relacionadas), o prueba de McNemar (dos mediciones relacionadas), el tamaño del efecto se evaluará mediante la razón de las ventajas (odds ratio y su IC al 95%).

Para analizar las diferencias entre los valores medios de las variables cuantitativas entre 2 grupos (Grupo A sujetos con mutaciones de resistencia; Grupo B sujetos sin mutaciones de resistencia) se realizará Análisis de la Varianza (ANOVA), seguido de test de Student para 2 muestras independientes. En el caso de que no se cumplan las suposiciones del análisis de la varianza, se aplicará prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon.

Análisis multivariante:

El análisis multivariable se realizará mediante un modelo de regresión lineal múltiple y regresión logística ordinal introduciendo en el mismo las variables independientes con un grado de significación menor de 0,20. Se comprobarán las condiciones mediante análisis de residuales, de la heterocedasticidad y linealidad e identificación de la multicolinealidad mediante VIF. La fuerza de la asociación se describirá mediante la OR. Cabe dejar constancia que la construcción de un modelo final se realizará en base a los principios que deben verificarse para eliminar una variable (1: que no aporten nada significativo al modelo $p > 0,25$; 2: que al eliminar la variable no se produzca un cambio importante (mayor del 10% en su valor) en los coeficientes del modelo). El nivel de significación estadística para este estudio es $p < 0,05$.

Para el análisis de los datos se utilizará el programa R, R-Commander "Paquete R-UCA 2.14.2 para Windows (26 -Mar.12)" (software libre) con rutinas creadas para este estudio.

Limitaciones:

El control de calidad juega un papel esencial. Hay que garantizar que todas las mediciones se realicen por personal especializado y con técnicas normalizadas, intra e inter laboratorios. La duración del estudio permitirá obviar los problemas derivados de prestar una atención especial al cambio de personal, al deterioro de los equipos, al cambio de tecnologías y a las inconsistencias de las respuestas de los participantes a lo largo del tiempo (Whitney CW, Lind BK, Wahl PW. Quality assurance and quality control in longitudinal studies. Epidemiol Rev 1998; 20: 71-80.) En el supuesto de encontrarnos con datos perdidos se utilizarán técnicas de imputación de valores missing. Por lo que respecta al estudio estadístico, la inclusión de gran número de variables independientes podía favorecer la existencia de factores de confusión que tratamos de evitar con el análisis multivariante.

Justificación:

El VHC es un virus ARN con una elevada variabilidad genética, lo que hace que según su organización genómica se definan, en función al grado de homología distintos genotipos y subgenotipos (García F, 2002), siendo los más prevalentes en nuestra área los genotipos 1a, 1b y 3a. Sin embargo, la homología de secuencia a nivel de subtipo no va más allá del 77-80%, lo que establece importantes diferencias a nivel genómico incluso dentro de un mismo subtipo. Este aspecto es fundamental para el abordaje del tratamiento de la hepatitis crónica por VHC utilizando antivirales de acción directa. En los últimos años, aprovechando el conocimiento del ciclo de replicación del VHC y el desarrollo de dianas terapéuticas en la infección por VIH, se han desarrollado los agentes antivirales de acción directa (DAAs-Direct Antiviral Agents) frente al VHC (Patlowitsky JM, 2007 y 2011; Keefe, 2007). En la actualidad ya se han comercializado dos inhibidores de la proteasa viral (NS3/4A), Boceprevir y Telaprevir, y en breve se incorporarán otros nuevos agentes, como Simeprevir y Sofosbuvir, que se aprobarán durante este año 2014. Desde el punto de vista virológico, los Inhibidores de la proteasa se caracterizan por una baja barrera genética (si hay replicación activa se seleccionan muy rápidamente mutaciones de resistencia que inactivan el fármaco) y las resistencias cruzadas (cuando aparece una mutación con uno de los dos fármacos, esa mutación también inactiva al otro fármaco). En este grupo se encuentran en diversas fases de desarrollo nuevas moléculas, con las que se consiguen minimizar los efectos adversos (Simeprevir, Danoprevir, Asunaprevir, ABT-450, BI-201355; GS-9451.), y modificar la barrera genética para que no se seleccionen las mutaciones de resistencia con tanta facilidad (MK-5172; ACH-2664).

Como en el caso del Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el ciclo de replicación del VHC ofrece numerosas dianas terapéuticas, y por lo tanto numerosas oportunidades para el diseño de moléculas con actividad antiviral directa (Chueca et al, *Enf Infecc y Microbiol Clin* 2013). Además de inhibidores de la proteasa viral, se han desarrollado un elevado número de inhibidores de la polimerasa viral NS5b (Sofosbuvir; Tegobuvir; Setrobuvir; ABT 333/ABT 072; BI207177), del complejo de replicación NS5a (Daclastavir (BMS-790052); GS-58885), e incluso inhibidores de la ciclofilina (Alisporivir), que también han alcanzado ya diferentes fases de desarrollo clínico, tanto en pautas combinadas con interferón (Zeuzem S, 2012; Kowdley KV, 2012; Lawitz E, 2012; Pawlotsky JM, 2012), como en terapias libres de interferón (Zeuzem S, 2012; Gane EJ, 2012; Poordad F, 2012; Lawitz E, 2012; Sulkowski M, 2012; Karino Y, 2012; Pawlotsky JM, 2012; Patlowitsky JM 2011).

En presencia de Interferón y Ribavirina, dos agentes con actividad antiviral, pero sin efecto directo frente al VHC, el estudio de las mutaciones de resistencia frente a los IPs Boceprevir y Telaprevir, ya sea en el momento basal (antes de iniciar tratamiento, para predecir falta de respuesta) o en el fracaso al tratamiento (para conocer que mutaciones de resistencia se han seleccionado), tiene un carácter exclusivamente académico y de investigación, y no tiene sentido su aplicación a la rutina asistencial, a diferencia de lo que ocurre, por ejemplo, en el virus de la inmunodeficiencia humana. Sin embargo, en terapias libres de interferón, en las que se combinen sólo agentes de acción antiviral directa frente al virus de la hepatitis C, la caracterización genómica del VHC antes de iniciar tratamiento, y con mucha probabilidad la detección de mutaciones de resistencia en los pacientes en los que no se alcance RVS pueden ser muy importantes para la toma de decisiones clínicas. Ya existen estudios que muestran como moléculas como Simeprevir (IP, 2ª generación) carecen de actividad si basalmente el VHC tiene el cambio Q80K en la proteasa viral; este cambio se presenta en el 20-40% de los subtipos 1a (Poveda E, 2012), lo que ha condicionado

que exista un “warning” por la FDA desaconsejando el uso de este fármaco en los pacientes infectados por genotipo 1a si no se dispone de un test previo para excluir la presencia del polimorfismo en cuestión. En este mismo sentido, se pueden aportar evidencias para el resto de las dianas terapéuticas en desarrollo: a) en la polimerasa viral (NS5b), los dos no nucleósidos de Abbott (ABT-333 y ABT-072) no tienen actividad si el VHC presenta la mutación C316Y/N; de nuevo esta mutación está presente en el 36% de los subtipos 1b, por lo que en consecuencia, sería deseable que antes de iniciar alguno de estos fármacos pudiéramos conocer si esta mutación está presente. b) en el complejo de replicación NS5a, Daclastavir no tiene actividad si el VHC presenta la mutación Q30R; al igual que en los ejemplos anteriores, esta mutación está presente en el 51% de los genotipos 4, por lo que en consecuencia, sería deseable que antes de iniciar tratamiento con este fármaco pudiéramos conocer si la mutación está presente.

Los datos que hasta el momento se han obtenido sobre la prevalencia de polimorfismos en diferentes subtipos del VHC, se han derivado sobre secuencias obtenidas a través de bancos de genes (<http://hcv.lanl.gov/content/index>, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_004102.1). No existen datos acerca de los aislados de los diferentes genotipos, especialmente los genotipos 1 y 4 (estos por ser malos respondedores a PegInterferon y Ribavirina), que circulan en nuestro medio, y muy escasos datos en Europa (Plaza Z, 2012; Di Maio V, 2012; Vicenti I, 2012) por lo que confirmar la presencia de estos polimorfismos en estos aislados, realizar su caracterización epidemiológica molecular, y describir tasas de prevalencia e incidencia, serán fundamentales para el tratamiento personalizado de la hepatitis crónica C, y dotan a este proyecto de un alto carácter innovador.

Por último, destacar que todos los datos disponibles sobre las resistencias en la proteasa viral (NS3/4a) y también frente a los análogos inhibidores de la polimerasa viral (NS5b) y del complejo de replicación NS5a, se han obtenido utilizando técnicas de secuenciación poblacional. Estas técnicas sólo son capaces de detectar aquellas mutaciones que están presentes por encima del 20% con respecto a la población viral global que infecta al paciente. Ya disponemos de tecnología de secuenciación masiva de nueva generación capaz de investigar las mutaciones con mayor profundidad, llegando a detectarlas en proporciones de incluso hasta el 0.1%.

Bacon BR. N Engl J Med 2011; 364:1207-1217 [March 31, 2011](#)

Carrat, F; JAMA 2004. **292** (23): 2839 -48

Chueca, N, Enferm Infecc Microbiol Clin. 2013;**31**(Supl 1):40-47

Chung, RT; *The New England Journal of Medicine*. 2004. **351** (5): 451 -9.

Chevaliez S. PLoS One. 2009, 4(12):e8209.

Di Maio V, 10th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance 28-30 March 2012, Barcelona, Spain. Abstract O_11.

Dieterich D, 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Opening Session. Abstract 46

Dieterich D, 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, March 3-6, 2013; abstract 40LB

Dieterich D, 20th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections, March 3-6, 2013; abstract 154LB

Fried M, Hadziyannis S. Semin Liver Dis 2004;24 (suppl 2):47-54.

Gane EJ, 47th Annual Meeting of the EASL, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; abstract 1113

Garcia F, et al. Control de Calidad SEIMC, <http://www.seimc.org/control/index.asp>. 2002.

Hezode C, N Engl J Med 2009; 360: 1839-50.

Karino Y, 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL 2012), Taipei International Convention Center, February 16-19, 2012

Keeffe E. Antivir Ther 2007; 12: 1015-25.

Kowdley KV, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; abstract 1

Koziel M, N Engl J Med 2007; 356: 1445-54.

Kwo P. *The Lancet* - 28 August 2010 (Vol. 376, Issue 9742, Pages 705-716)

Lawitz E, EASL 47th Annual Meeting April 18th - 22nd 2012, Barcelona, Spain.

McHutchison J, N Engl J Med 2009; 360: 1827-38.

Mederacke I, Curr Opin Investig Drugs 2009;10:181-9.

Neukam K, 18th Conference on Retroviruses and Opportunistic infections. Abstract #945.

Pawlotsky JM, Gastroenterology 2007; 132:1979-98.

Pawlotsky JM, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; LB abstract LB 11

Plaza Z, 10th European Meeting on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance 28-30 March 2012, Barcelona, Spain. Abstract O_12.

Poordad F. N Engl J Med 2011; 364:1195-1206 [March 31, 2011](#).

Poordad F, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver · Barcelona, Spain · April 18-22, 2012.

Poveda E, Soriano V. Future Virology 2012;7(3); 309-21.

Rivero-Juárez A, J Antimicrob Chemother. 2012; 67(1):202-5.

Sharma P, Lok A. Viral hepatitis and liver transplantation. Semin Liver Dis 2006; 26:285-97.

Sulkowski M, 47th Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; LB abstract 1422

Sulkowski M, Pol S, Cooper C, et al. 19th Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Opening Session. Abstract 47.

Torriani, FJ; *The New England Journal of Medicine*, 2004. **351** (5): 438 -50.

Vicenti I, J Antimicrob Chemother. 2012, 67(4):984-7.

Zeuzem S, 47th EASL, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; abstract 2

Zeuzem S, 47th EASL, April 18-22, 2012, Barcelona, Spain; abstract 101

Hipótesis del estudio:

La variabilidad genética intrasubtipo en los aislados del virus de la hepatitis C es muy elevada. Los ensayos actuales de determinación del subtipo no proporcionan información acerca del aislado del virus, ni de los polimorfismos presentes en regiones como la proteasa (NS3/4a), polimerasa (NS5b) y complejo de replicación (NS5a). Existen evidencias de que algunos antivirales de acción directa no poseen actividad en presencia de ciertos polimorfismos en estas regiones. No existen datos acerca de los aislados de los diferentes genotipos, especialmente los genotipos 1 y 4, que circulan en España, y muy escasos datos en Europa. Basados en todo lo anterior emitimos las siguientes hipótesis: Confirmar la presencia de estos polimorfismos en estos aislados, realizar su caracterización epidemiológica molecular, y describir tasas de prevalencia serán fundamentales para el tratamiento personalizado de la hepatitis crónica C. La caracterización molecular del aislado, y la determinación de los polimorfismos en su

genoma, permitirán la individualización de la terapia con combinaciones de antivirales de acción directa que aseguren las mayores tasas de Respuesta Viroológica Sostenida, y por tanto de erradicación viral y curación de los pacientes. De igual manera, la determinación del perfil de mutaciones en el genoma del virus en pacientes con fracaso terapéutico podría ayudar a escoger el tratamiento de segunda línea más adecuado.

Objetivos principales del estudio:

1.-General: Consolidar un proyecto “faro” asociado al proyecto GEHEP-001, que sirva como plataforma para los estudios virológicos y de epidemiología molecular en GEHEP.

2.- Específicos:

a. Describir la presencia de polimorfismos asociados a resistencia a los antivirales de acción directa y determinar las tasas de prevalencia en los diferentes aislados de VHC que circulan en nuestro medio.

b. Caracterizar las mutaciones que aparecen en los fracasos a antivirales de acción directa, y su cinética de reversión

c. Estimar la introducción de cepas con polimorfismos que se puedan asociar a resistencia a los nuevos DAAS en los últimos años.

Determinar el valor y el papel de la secuenciación masiva (UDS) en la detección de polimorfismos frente a los antivirales de acción directa.

Se prevé solicitar financiación a GEHEP para las determinaciones de resistencias y concurrir a las próximas convocatorias de financiación competitiva

¿El proyecto ha pasado el Comité de Ética de la Investigación Clínica?

Si

No

Comunicación a Congreso

Artículo científico

Tesis Doctoral

Otros (especificar)

--

Coordinador

Nombre y apellidos:
Federico García García

Centro de trabajo
HU San Cecilio, Granada

Firma:

**Investigador responsable de otros
centros***

Nombre y apellidos
Eva Poveda

Centro de trabajo
INIBIC, A Coruña

Firma

.....

Nombre y apellidos Xavier López-Labrador	FISABIO-Salud Pública, Generalitat Valenciana	Firma
Nombre y apellidos Antonio Aguilera	Centro de trabajo CHUS, Santiago	Firma
Nombre y apellidos Luis Miguel Real	Centro de trabajo Hospital de Valme	Firma
Nombre y apellidos	Centro de trabajo	Firma

* Un investigador responsable por centro