

# **DOSSIER EPATITE B: DALLA SCOPERTA DEL VIRUS ALLA TERAPIA**

- 1) LA STORIA DELL'EPATITE B**
- 2) LE TAPPE DELLA PREVENZIONE FINO AL VACCINO**
- 3) LA SCOPERTA DI ENTECAVIR**
- 4) IL SIGNIFICATO DELLA MALATTIA ACUTA E DELLA SUA CRONICIZZAZIONE NEL MONDO**
- 5) DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA TERAPIA**
- 6) USO DI ENTECAVIR**
- 7) L'APPORTO ITALIANO ALLA RICERCA SU HBV DAGLI ANNI '70 A OGGI**

## 1) LA STORIA DELL'EPATITE B

Il virus dell'epatite B (HBV, Hepatitis B Virus) è il primo agente infettivo per il quale sia stata dimostrata una chiara correlazione con lo sviluppo di una forma tumorale: l'epatocarcinoma primitivo. L'epatocarcinoma da HBV è, di conseguenza, la prima forma tumorale per la quale esiste la prevenzione vaccinale. Queste due verità non sarebbero mai venute alla luce senza il lavoro inesausto di Baruch S. Blumberg (nato a Brooklyn-New York nel 1925), lo scienziato statunitense insignito del Premio Nobel 1976 per la Medicina e la Fisiologia proprio per l'identificazione e la caratterizzazione dell'HBV, in collaborazione con decine di ricercatori in tutto il mondo. Oggi sappiamo che l'epatite B è, nella maggioranza dei casi, un'infezione acuta e auto-limitante. Per una percentuale non piccola di malati, però, compresa tra il 10 e il 20 per cento, l'infezione cronicizza. Tra i malati cronici, il 20 per cento circa subisce una progressione del danno epatico fino alla cirrosi e al carcinoma primario del fegato. Purtroppo, l'HBV è uno dei virus più diffusi nel mondo, tanto da essere considerato tra i primi dieci agenti infettivi killer dell'umanità.

Fino a oltre la metà del secolo scorso, però, la storia naturale dell'infezione cronica da HBV è stata del tutto ignota e la sua stretta connessione con il cancro epatico impossibile da stabilire. L'epatite era infatti nota da sempre come "itterizia", dalla tipica colorazione giallo intenso assunta durante l'infezione acuta dalla sclera e, spesso, da tutta la pelle. Oggi, peraltro, si è visto che neppure l'ittero è un segno obbligatoriamente presente nei malati. Brevi cenni storici ci raccontano che già in Mesopotamia (codice di Hammurabi) l'ittero e i suoi sintomi erano ben riconosciuti. Lo ritroviamo anche nel Talmud, mentre Galeno fa dell'itterizia una descrizione dettagliata, cercando di identificarne le possibili cause. San Zaccaria, nell'ottavo secolo dopo Cristo, fu il primo a intuire la natura infettiva dell'itterizia, raccomandando l'isolamento dei malati durante tutto il periodo itterico. Ma ci vorrà ancora un millennio e più prima che l'itterizia, che rivaleggerà con colera e peste nel mietere vittime in ondate epidemiche subentranti, venga compresa e, almeno in parte, domata.

Le lunghe campagne militari segnano, com'è logico attendersi, i picchi epidemici. Prima i Greci, poi i Romani, e ancora le armate cristiane durante le Crociate vengono decimate anche dalle infezioni, tra cui primeggia l'itterizia. Ma non si riesce, ovviamente, ad andare oltre l'osservazione degli effetti della malattia e alla constatazione, peraltro non secondaria, che scarse condizioni igieniche, affollamento e spargimento di sangue sono strettamente correlati alle epidemie.

Nel XVIII secolo l'itterizia si manifesta anche tra i civili in aree lontane tra loro come Ginevra, Minorca, Mainz, tanto per citarne alcune. Ma l'itterizia decima anche la Grande Armée napoleonica, non solo nella campagna d'Egitto, ma anche in quella di Russia. Anzi, i soldati francesi la battezzano presto "Jaunesse des camps" o "Itterizia dei campi militari", temendola quanto i nemici. E dobbiamo a René Laennec, medico dell'esercito imperiale, la definizione di fegato cirrotico. Lo fa derivare dal greco "kirrhos", cioè color bronzo, rilevando alla autopsia la tipica colorazione assunta dal fegato colpito da itterizia. Ed è probabile che Napoleone stesso, a Sant'Elena, morisse proprio per le conseguenze di un'epatite, probabilmente un'epatite B cronica evoluta in cirrosi ed epatocarcinoma.

Inutile ripercorrere i drammi della Guerra di Secessione americana, del conflitto franco-prussiano, delle nostre campagne risorgimentali e di tutti i grandi conflitti del secolo scorso, per ribadire quanto l'HBV sia stato letale. Basti dire che anche l'esercito tedesco conosce e teme la "Jaunesse des camps" e la chiama "Soldatengelbschut". Ma non basta. Agli albori del XX secolo, nascono nuove terapie (artrite, diabete), spesso somministrabili solo per via iniettiva. Ed ecco che aghi e siringhe non ben sterilizzati diventano veicolo di migliaia di allarmanti contagi. Non solo. Nasce un apparente paradosso, visto alla

luce delle attuali conoscenze: i vaccini diventano, loro malgrado, veicolo d'infezione. La prova devastante si ha nel 1942, quando le truppe americane, impegnate in Estremo oriente, vengono vaccinate in fretta e furia contro la febbre gialla, per il timore di un'offensiva batteriologica dell'esercito giapponese. Quel vaccino, ricavato da siero umano e non ancora del tutto validato, scatenerà un'epidemia di epatite che colpirà almeno 300 mila soldati.

Sempre durante la Seconda Guerra mondiale e grazie agli studi condotti dai sanitari dell'esercito americano, si stabilisce il nesso tra trasfusioni e sviluppo di epatite. Nel 1947, infine, ecco una prima svolta: l'epatologo inglese McCallum capisce che la malattia ha forme diverse. Per primo, apre all'alfabeto delle epatiti, identificando l'epatite A, trasmessa da alimenti contaminati con materiale fecale, e l'epatite B, trasmessa da contatti con sangue e fluidi corporei infetti.

Ma bisogna aspettare gli anni Sessanta per giungere alla svolta epocale. Baruch Blumberg sta studiando la predisposizione ereditaria alle malattie. Lo fa cercando il nesso con il polimorfismo delle proteine del sangue, che ha già permesso di differenziare i gruppi sanguigni A, B e zero. Viaggiando in tutto il mondo raccoglie e porta agli NIH (National Institutes of Health) di Bethesda campioni di sangue da studiare. Nel 1963, per caso, scopre che il sangue di un emofilico di New York Mr Levine, reagisce con il siero di un aborigeno australiano. E' la data di nascita dell'antigene Australia (antigene Au). Dopo qualche ipotesi non confermata, come la convinzione che l'Au predisponga a emofilia e leucemia, nel 1966 Blumberg e i suoi colleghi (Tom London, Alton Sutnick, Irving Millman tra gli altri) vedono un caso emblematico: un bambino Down, originariamente negativo al test dell'epatite che diventa successivamente sieropositivo. Dopo alcune controprove, la spiegazione non può che essere una: l'antigene Au non è un tratto ereditario, ma è la traccia di un agente infettivo, tanto più che quel bambino soffre proprio di epatite.

Come racconta lo stesso Blumberg nell'autobiografico "The Hunt for a killer virus - Hepatitis B": «L'articolo principale che descriveva le nostre ricerche e postulava la scoperta dell'agente causale dell'epatite B non venne accettato per la pubblicazione... Ma la reazione dell'establishment era comprensibile: non eravamo parte del gruppo di scienziati tradizionalmente impegnati nella ricerca del virus dell'epatite. Nessuno di noi era un virologo... Eravamo a tutti gli effetti degli outsider». Sta di fatto che, dopo poco, il direttore e i revisori di *Annals of Internal Medicine* dovranno ammettere il loro colossale errore. Sorprendentemente, gli stessi *Annals* pubblicano invece un "early report" di Blumberg e dei suoi: un breve scritto, spedito in tempi precedenti, probabilmente accettato perché giudicato meno incisivo e visibile dal punto di vista editoriale.

Siamo al 1967. Il tempo di dimostrare che l'antigene Australia è il materiale virale tanto ricercato da tanti è giunto. Ci sono già alcuni punti fermi:

- L'antigene Australia è stato rilevato nel sangue e nel fegato di molti di pazienti con epatite.
- Il sangue trasfuso, contenente l'antigene Australia, è in grado di trasmettere la malattia.

Ma è necessaria la conferma con studi in modelli animali. Dopo alcuni esperimenti poco soddisfacenti, sono alcune scimmie appartenenti alla specie dei Cercopitechi a risultare contagiabili con il materiale virale. Da quel momento, il gruppo di Blumberg chiede l'aiuto di tutti i maggiori gruppi di ricerca impegnati nel mondo sulle stesse tracce. Distribuisce di naturale reazione contenente campioni di siero antigene Australia positivi e campioni sierici con anticorpo specifico (anti-HBs).

E' così che, dal 1968 in poi, si scopre che il responsabile dell'epatite B è un virus a DNA, di dimensioni minime, 42 nanometri (1 nanometro = 1 miliardesimo di metro). L'antigene Australia, identificato finalmente come la proteina che avvolge l'esterno del virus, viene ridefinito correttamente antigene di superficie dell'epatite B, o HBsAg. C'è anche un antigene "c", o HBcAg, identificato nella proteina che avvolge il DNA virale (core antigen), che può dare origine a un anticorpo specifico, anti-HBc. Infine, si rivelerà cruciale un altro antigene, correlato ad HBcAg: l'HBeAg, la sua presenza nel

sangue indica che il virus B è in fase di replicazione attiva; il suo anticorpo specifico, anti-HBe, segnala invece ridotta replicazione virale, o addirittura interrotta.

Anche il DNA del virus B è uno dei più piccoli mai riscontrati, composto di soli 4 geni. «Un genoma che può produrre solo poche proteine, e di dimensioni modeste» sottolinea Blumberg. «Ma, per quanto semplice dal punto di vista biochimico, il virus dell'epatite B mostra un comportamento ben lontano dalla semplicità».

## **2) LE TAPPE DELLA PREVENZIONE FINO AL VACCINO**

Ottobre 1970: diventa ufficiale negli USA la raccomandazione di applicare i test di screening per HBV in donatori di sangue. Nel 1972 la raccomandazione diventa legge. L'epatite B, infatti, colpiva la metà dei soggetti politrasfusi (emofilici, leucemici, pazienti chirurgici, vittime di incidenti). Identificare il sangue infetto era dunque cruciale, anche perché si sapeva già che una sola unità di sangue infetto era in grado di contagiare un intero pool. L'HBV, 100 volte più contagioso dell'HIV (virus dell'AIDS), mantiene infatti la sua infettività anche se diluito 10 milioni di volte. Grazie alla messa a punto della tecnica dell'immunofluorescenza, sviluppata in studi indipendenti da Rosalyn Yalow (Nobel 1977) e Samuel Berson al Bronx Veterans Administration medical center di New York, la possibilità di identificare presto e bene la presenza di HBsAg nei donatori diventa routine. Nei Paesi in cui viene adottato, lo screening azzerava ben presto il rischio di contagio post-trasfusione.

Ma era necessario fare molto di più per la prevenzione della malattia. Anche perché nel 1975, a Taiwan, Palmer Beasley aveva dimostrato un'ulteriore via di trasmissione del virus B, quella verticale, cioè da madre a figlio durante il parto, in due casi ogni tre. Inoltre, sebbene allora la correlazione non fosse nota, oggi sappiamo che fino all'85 per cento dei casi di tumore primitivo del fegato (carcinoma epatocellulare) deriva da un'infezione HBV. L'unica via per prevenire in modo definitivo la malattia era quindi lo sviluppo di un vaccino.

Baruch Blumberg, nell'autobiografia "The hunt for a killer virus – Hepatitis B" ammette che la ricaduta più significativa delle sue ricerche è senz'altro la messa a punto del vaccino, oggi largamente applicata nel mondo e non per caso: si tratta infatti del primo vaccino anticancro della storia della medicina. Gli studi prendono le mosse dalla necessità di trovare una via per stimolare la produzione dell'anticorpo anti-HBs, senza indurre malattia. Alla fine degli anni Sessanta Blumberg, insieme con Manfred Bayer, Barbara Werner e Lawrence Loeb scopre che l'HBsAg può essere separato dalla porzione infettante del virus B grazie alla centrifugazione del sangue di soggetti portatori. Queste particelle purificate, sottoposte a test sulle scimmie Cercopiteco, non inducono malattia, al contrario del materiale non purificato.

L'allestimento viene perfezionato con sostanze in grado di aumentare l'antigenicità del preparato (cioè la capacità di indurre la produzione di anticorpi anti-HBs) e con adeguati conservanti e la richiesta di brevetto, datata 1969, riceve una risposta positiva nel 1972. Ma la scoperta interessa ancora poco la comunità scientifica e le aziende farmaceutiche, soprattutto perché poco si sapeva della possibilità dell'epatite B di cronicizzazione e delle sue conseguenze letali a lungo termine. Nel 1975, infine, la Merck Corp. intravede non solo l'eticità, ma anche la potenzialità commerciale del vaccino e accetta di impegnarsi nella produzione e nella ricerca clinica. Nel 1980, gli studi di Wolf Szmunes al New York City Blood Center dimostrano la protezione conferita dal vaccino, che si estende anche ai bambini nati da madri infette, quindi a massimo rischio di contagio. Nei 2 anni successivi, il vaccino di derivazione plasmatica entra in commercio.

Nel 2000, si stimava già che fossero un miliardo le dosi di vaccino somministrate. Ma il preparato era nel frattempo cambiato. Non più prodotto per purificazione dal plasma, ma con la tecnologia del DNA-ricombinante, così da permetterne la produzione su vasta scala e da evitare ogni eventuale contaminazione. Una metodica che aveva visto la luce nel 1977 grazie agli studi di William Rutter all'Università di San Francisco. Decifrata e clonata la sequenza dell'HBV, questa viene fatta replicare in cellule di lievito. Il preparato definitivo viene introdotto nell'uso clinico nel 1986.

L'Italia, com'è noto, è stata tra le prime nazioni a introdurre nel 1991 la vaccinazione anti-HBV obbligatoria per tutti i nuovi nati e per tutti coloro che avessero compiuto il 12° anno di età. Sta di fatto che oggi tutta la popolazione italiana, dai 27 anni in giù, risulta protetta. Anche la Spagna ha adottato da subito un programma vaccinale simile, tanto che le due nazioni sono state subito segnalate dall'OMS come esempi virtuosi.

Per quanto riguarda la popolazione al di fuori di queste fasce d'età, la vaccinazione anti-HBV è disponibile (anche come bivalente, quindi protettiva anche per l'epatite A) per chiunque, ma è fortemente raccomandata per chi vive a stretto contatto con portatori del virus B (familiari, partner sessuali, personale sanitario), per tutti i viaggiatori per turismo o lavoro in aree a forte prevalenza della infezione, come Asia e Est europeo, Centro e Sud America ed Africa.

Chi sapesse di essere portatore di HBV, dovrebbe non solo sollecitare il partner e i familiari a farsi vaccinare (dopo aver controllato di non essere stati nel frattempo infettati), ma anche adottare misure precauzionali quali:

- Usare sempre il profilattico per ogni rapporto sessuale
- Medicare con cerotti o bende idrorepellenti ogni ferita, taglio, sbucciatura
- Pulire eventuali perdite di sangue con una soluzione di 1 parte di candeggina ogni 10 di acqua: l'HBV resiste all'aria, se non rimosso con cura, per almeno una settimana
- Gettare fazzoletti di carta o assorbenti usati in buste sigillabili
- Lavare sempre le mani con acqua e sapone dopo essere entrati in contatto con il proprio sangue o altri fluidi corporei
- Non prestare spazzolini, rasoi, orecchini, lime per le unghie
- Ricordare al proprio dentista che si è portatori di HBV

### **3) LA SCOPERTA DI ENTECAVIR**

Entecavir nasce e cresce nei laboratori Bristol Myers Squibb (BMS) negli anni Novanta, grazie al lavoro di Richard Colonna e della sua équipe. Si trattava di trovare una risposta valida alla crescente pressione dell'epatite B cronica: una minaccia poco nota alla popolazione generale, ma ben presente al mondo medico, che ne stava verificando la progressiva e inarrestabile diffusione dalle aree asiatiche, dove l'epatite B cronica era, e resta, endemica, al resto del mondo. Tra le cause certe, la crescita tumultuosa delle emigrazioni, con masse di popolazione in movimento da aree a scarso o nullo controllo sanitario verso paesi ad alta sorveglianza. Un passaggio epocale, che si stava affermando in modo parallelo al continuo movimento di cose e persone tra i continenti, per lavoro e/o turismo.

La pericolosità del virus B (HBV, Hepatitis B Virus) non era, e non è ancora, stata recepita con sufficiente chiarezza dalla popolazione generale, anche se l'Organizzazione mondiale della sanità (Oms) continua a definire l'epatite B un "grave problema sanitario globale". Nel mondo, sono oggi 350 milioni le persone con infezione cronica da HBV: cioè un numero 8-10 volte superiore a quello dei pazienti infetti da HIV. In Europa, ogni anno, viene contagiato dall'HBV un milione di persone. Il 5-10

per cento delle epatiti acute evolve in epatite cronica: oggi, in Europa, i malati cronici riconosciuti sono 14 milioni. Se non controllata, la forma cronica determina lo sviluppo di cirrosi nel 10-20 per cento dei casi e, di questi, il 20 per cento sviluppa carcinoma epatico: in Europa, oggi, sono tra 24 e 36 mila ogni anno i decessi attribuibili all'epatite B. Lo scenario italiano attuale è di almeno 500 mila portatori del virus B, con un buon contributo delle popolazioni immigrate. I malati cronici di epatite B sono il 10-15 per cento di tutti i casi, quindi 50-75 mila persone. Di queste, soltanto 25 mila sono in trattamento.

Le conseguenze dell'infezione cronica da HBV non sono soltanto personali, vale a dire l'evoluzione del danno epatico verso cirrosi e carcinoma del fegato. Deve preoccupare anche la contagiosità dell'HBV, 100 volte superiore a quella dell'HIV (Human Immunodeficiency Virus, cioè il virus che provoca l'AIDS). Il malato cronico resta tanto contagioso quanto chi ha l'epatite B in fase acuta. Tre le classiche vie di contagio: ematica (esempi: condivisione di siringhe infette, trasfusioni di sangue infetto, uso di strumenti odontoiatrici infetti, scambio di spazzolini da denti con persone infette), o sessuale o, durante il parto, dalla madre infetta al nascituro. La terapia dell'epatite B cronica non può eliminare la contagiosità del malato; il suo scopo è piuttosto quello di ridurre la carica virale, cioè la quantità di HBV circolante a livelli minimi, in questo mondo impedendo lo sviluppo di cirrosi o carcinoma.

La possibilità di controllare l'epatite cronica B esigeva perciò, già negli anni Ottanta, risposte soddisfacenti. L'approccio farmacologico, in quegli anni, aveva già avuto una svolta grazie all'interferone, utilizzato prima in forma semplice (IFN) e successivamente pegilata (peg-IFN). La sua efficacia nei confronti dell'HBV, però, anche se discreta, era ed è penalizzata dalla scarsa tollerabilità e limitata applicabilità. Il punto nodale della ricerca di Colonna nei laboratori BMS, perciò, era trovare una molecola in grado di bloccare specificamente l'HBV, cioè potente e specifica nei confronti degli enzimi del virus B, ma priva di interferenze con il metabolismo delle cellule umane, a garanzia di una soddisfacente tollerabilità anche sul lungo periodo.

Punto di partenza del gruppo di Colonna diventano così gli analoghi nucleosidici e nucleotidici già in studio nei laboratori BMS come antivirali. Colonna si affida a Robert Zahler, ricercatore chimico del gruppo. E' una scelta vincente. Entecavir, infatti, è già presente nella prima selezione di molecole operata da Zahler: è un analogo nucleosidico della guanosina di terza generazione, attivo contro l'HBV polimerasi: il risultato è il blocco della replicazione del DNA virale. Entecavir debutta ufficialmente il 13 gennaio 1995, quando il ricercatore Steven Innaimo ne mette alla prova l'efficacia su colture cellulari di virus B. Il test è più che soddisfacente: l'inibizione della replicazione di HBV è potente e specifica e la tossicità su cellule e mitocondri è minima. E' la dimostrazione che Colonna e i suoi hanno cercato tanto a lungo.

Su entecavir si concentrano gli sforzi del gruppo di ricerca, perché era necessario verificare che entecavir potesse essere utilizzato per lunghi periodi mantenendo le caratteristiche di efficacia e di tollerabilità. Una patologia cronica come l'epatite B, infatti, necessita di un controllo potente e a lungo termine della replicazione virale. La perdita di efficacia si era dimostrata, infatti, il punto debole di lamivudina e di adefovir, antivirali sintetici di prima generazione, efficaci sia contro l'HBV, sia contro l'HIV, introdotti nella terapia dell'epatite B cronica all'inizio degli anni Novanta. Dopo 4 anni, l'80 per cento dei pazienti non rispondeva più a lamivudina, a causa dello sviluppo di un HBV portatore di mutazioni del gene della polimerasi, che lo fanno diventare resistente. Lo sviluppo di HBV mutati e resistenti, del resto, è presente anche con adefovir: dopo 4 anni di trattamento, quasi un quarto dei pazienti non risponde più.

Torniamo alle ricerche BMS. Al gruppo, nel frattempo, si aggiunge Helena Brett-Smith, che raccoglierà l'eredità di Richard Colonna negli anni successivi. Gli studi su entecavir proseguono e dimostrano due concetti fondamentali:

- la potenza rapida e notevole nei confronti di HBV, che permette di tenere sotto controllo la carica virale fino al 91 per cento dei pazienti mai trattati prima con analoghi nucleosidici/nucleotidici; la potenza è strettamente legata all'alta affinità per il virus dell'epatite B; l'alta affinità, dal canto suo, è garanzia di tossicità minima.
- l'alta barriera genetica, vale a dire il basso sviluppo di resistenze sul lungo periodo, che non supera l'1,2 per cento dopo cinque anni di terapia. Si tratta di un dato fondamentale, in quanto gli antivirali sintetici non sono in grado di eradicare l'HBV, ma sono disegnati per mantenere a livelli minimi la quantità di virus circolante (carica virale): la terapia deve essere continuativa, così da impedire una ripresa della replicazione virale e, successivamente, una ricaduta clinica.

Entecavir ha quindi le carte in regola per rivoluzionare il paradigma terapeutico dell'epatite B cronica. La molecola viene approvata in Italia nel 2007, classificata in fascia H, quindi per uso ospedaliero. E' disponibile in compresse, in due formulazioni, da 0,5 e da 1,0 mg. Il prezzo, per confezioni da 30 compresse, è di 377,7 euro. L'uso di entecavir non è raccomandato al di sotto dei 18 anni di età perché mancano dati sulla sicurezza e l'efficacia. Non è richiesto alcun aggiustamento della dose in base all'età, né relativamente al sesso o alla razza. I successivi studi di valutazione, focalizzati sul rapporto costo/efficacia, dimostrano un rapporto incrementale (ICER) pari a 9.935 euro per anno di vita guadagnato e a 10.786 euro per anno di vita guadagnato, pesato per la qualità (QALY).

#### **4) IL SIGNIFICATO DELLA MALATTIA ACUTA E DELLA SUA CRONICIZZAZIONE NEL MONDO**

Il virus dell'epatite B (HBV) non è il solo in grado di causare epatite. Insieme agli altri tipi A, C, D ed E rappresenta però una delle più comuni infezioni del mondo. In particolare, proprio l'HBV è classificato come un "grave problema sanitario globale" da parte dell'Organizzazione Mondiale della Sanità. Si stima, infatti, che il 5 per cento della popolazione mondiale sia venuta a contatto con il virus della epatite B, vale a dire approssimativamente 2 miliardi di persone: di questi 350 milioni sono portatori cronici di infezione. Il 10-15 per cento dei nuovi casi di infezione evolve in portatore cronico e quasi un quarto di questi sviluppa patologie epatiche gravi, dalla fibrosi all'insufficienza epatica, cirrosi ed epatocarcinoma.

Come già accennato in un altro capitolo, in Europa si verifica 1 milione di nuove infezioni da HBV ogni anno, 14 milioni di individui sono infetti cronicamente e la mortalità annuale è compresa tra 24.000 e 36.000 decessi. In Italia sono denunciati circa mille nuovi casi ogni anno: un dato, quest'ultimo, verosimilmente sottostimato di 5/10 volte.

E' quindi ancora una stima quella di 70-80 mila portatori cronici, a fronte di sole 16-20.000 persone in terapia. Anche in Italia, però, come in gran parte del resto d'Europa, l'epidemiologia dell'epatite B è dinamica. Tra l'altro il nostro paese è al centro di flussi migratori sempre più consistenti da aree a forte endemia per epatite B, nelle quali il controllo sanitario è scarso o nullo. Per questo si può ipotizzare che la prevalenza di epatite B non potrà che aumentare e, con essa, la numerosità dei portatori cronici. Per avere un quadro più concreto, basti pensare che, già ora nel mondo, i soggetti che vivono con la sua forma cronicizzata sono 8-10 volte più numerosi di quelli con HIV/AIDS. Trattare e seguire nel tempo i malati cronici comporta costi personali ed economici molto elevati, soprattutto perché protratti.

L'epatite B, infatti, esordisce come una malattia acuta (spesso non riconosciuta) che, nella maggior parte dei casi, si risolve spontaneamente. Nel 10 per cento di soggetti in cui cronicizza evolve in condizioni progressivamente più gravi. La progressione si sviluppa in 4 differenti stadi che vanno dalla progressione minima, a quella moderata fino alla cirrosi compensata e alla cirrosi scompensata. Se non trattato in modo efficace, ciascuno di questi stadi è associato a un aumento del rischio di comorbidità cliniche e complicanze. Basti citare, nel paziente con cirrosi scompensata, l'ascite, l'ipertensione portale, il sanguinamento delle varici esofagee e l'encefalopatia epatica: tutte condizioni che impongono un'elevata richiesta e l'utilizzo di ingenti risorse sanitarie, alle quali non è estraneo il trapianto di fegato.

## 5) DIAGNOSI E MONITORAGGIO DELLA TERAPIA

L'infezione da HBV è un processo dinamico. Significa che non ci si può accontentare di formulare una diagnosi e impostare una terapia, contando sul fatto che questa resti valida e invariata nel tempo. Occorre seguire il paziente nel tempo, adattando la cadenza del monitoraggio alla situazione del singolo, pronti a modificare il percorso secondo i dati che emergono man mano.

Le indicazioni più recenti e chiare in merito vengono dalle Linee guida europee 2008 per la gestione dell'epatite B cronica (o CHB), i cui principi generali, stilati dalla European Association for the Study of the liver (EASL), sono stati confermati anche nelle Linee guida italiane (agosto 2008) Vediamo i punti essenziali:

- L'andamento dell'infezione da HBV, sia acuta, che soprattutto cronica, è fortemente influenzato dalle condizioni generali del paziente (per esempio dalla presenza di obesità, o alcoldipendenza) e dalla eventuale presenza di co-infezioni con altri virus, come quello dell'epatite C (HCV), Delta e dell'AIDS (HIV). Questi stessi fattori, com'è ovvio, condizionano anche la risposta alla terapia antivirale.
- Com'è già stato detto, tra l'8 e il 20 per cento dei soggetti con epatite B cronica sviluppa cirrosi in alcuni decenni, con una sopravvivenza a 5 anni, se la cirrosi si mantiene compensata, compresa tra l'80 e l'86 per cento (14-35 per cento se la cirrosi si scompensa).
- Quanto al carcinoma epatocellulare, la sua incidenza annuale (cioè il numero di nuovi casi) è compreso tra il 2 e il 5 per cento in presenza di cirrosi: ma si tratta di una percentuale che varia notevolmente secondo le aree geografiche ed è fortemente influenzata da alcuni cofattori.

**Attenzione** - Le Linee guida sottolineano con forza un concetto di base:

i flussi migratori massicci e irregolari da aree a scarso o assente controllo sanitario stanno velocemente cambiando l'andamento delle infezioni da HBV (e non soltanto) in molti paesi finora a bassa endemia, come sono tipicamente quelli dell'Europa occidentale e la stessa America del Nord (USA e Canada). È una realtà che non può essere ignorata dalle autorità sanitarie e dai singoli individui, ai quali sono fortemente raccomandati la profilassi vaccinale, ma anche comportamenti personali di autotutela (uso del profilattico, evitare lo scambio di spazzolini, rasoi, lime per le unghie, siringhe se tossicodipendenti e così via).

### **DIAGNOSI**

Ciò premesso, alcuni punti essenziali vanno ricordati, a iniziare dalla capacità di formulare una diagnosi corretta. Infatti, la certezza che un soggetto sia affetto da epatite B cronica dipende dalla valutazione di più parametri. Le sole aminotransferasi (ALT) non bastano, perché non tutti gli stadi di epatite cronica B sono associati ad ALT elevate in modo persistente. Le Linee guida europee 2008,

perciò, affermano che è cruciale il monitoraggio a lungo termine. Una valutazione iniziale deve comunque basarsi su:

- Dosaggio dei marker biochimici, AST (aspartato aminotransferasi) e ALT, GGT (gamma-glutamil trans peptidasi), fosfatasi alcalina, albuminemia, tempo di protrombina (che valuta la velocità di coagulazione del sangue); ematocrito; ecografia epatica.
- Misurazione dei livelli di DNA virale circolante con raccomandazione di applicare la tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction).
- Valutazione di eventuali cause diverse di epatopatia, incluse le coinfezioni con virus D, virus C o HIV, e le co-morbilità, come quella alcolica, autoimmune, metabolica.
- Una biopsia epatica è raccomandata per determinare il grado di necroinfiammazione e fibrosi, in tutti i soggetti con ALT elevate e/o livelli di DNA virale circolante superiori a 2000 UI/ml. La biopsia permette di confermare la presenza di statosi o steato-epatite. Da segnalare, in proposito, è la recente messa a punto di metodiche alternative non invasive, come l'elastografia o la valutazione di marker sierici di fibrosi, che però non possono per ora sostituire del tutto la biopsia.

### **SCOPI DELLA TERAPIA**

Nell'adulto immunocompetente l'infezione acuta B guarisce spontaneamente in oltre il 95% dei soggetti. Nei neonati e nei bambini, l'infezione acuta cronicizza nel 50% dei casi. Il portatore cronico di epatite B resta contagioso, anche in quel 70 per cento dei casi in cui è portatore inattivo, cioè con transaminasi normali ed assenza di livelli significativi di DNA virale. I pazienti con infezione attiva (30 per cento) ha progressione del danno epatico, vale a dire incontrollata infiammazione delle cellule del fegato e conseguente trasformazione del tessuto epatico sano in tessuto fibrotico, quindi non più funzionante. Come già detto, il 20 per cento dei soggetti con epatite B cronica attiva sviluppa cirrosi con un tangibile rischio di evolvere in carcinoma epatocellulare.

Nell'epatite B cronica attiva, perciò, la terapia ha lo scopo non solo di migliorare la qualità della vita dei pazienti, ma soprattutto di prevenire l'evoluitività del danno epatico, quindi la progressione verso la cirrosi e/o il carcinoma epatocellulare. Il mezzo è uno solo: sopprimere la replicazione dell'HBV in modo massiccio e indurre la sieroconversione degli antigeni "e" (HBeAg) in anticorpi anti-HBe. Questo perché l'HBV non può essere eradicato (come accade invece per l'epatite C), perché le cellule epatiche infettate mantengono nel loro nucleo un frammento di DNA virale (DNA circolare covalente chiuso, o cccDNA), irraggiungibile da qualunque farmaco.

Qual è il livello di DNA virale circolante considerato "sicuro" dagli esperti? Si tratta di un valore inferiore a quello rilevabile con la PCR, pari a 10-15 UI/ml: in questo modo, affermano le Linee guida, la soppressione virale è tale da portare a una remissione biochimica, a un miglioramento istologico e alla prevenzione delle complicazioni. Associata alla bassa replicazione virale, la terapia mira alla sieroconversione degli antigeni "e" (HBeAg), che segnalano alta viremia e alta contagiosità, ad anticorpi anti-HBe, che segnalano la reazione dell'organismo.

### **INFEZIONE CRONICA, ANTIGENI E ANTICORPI**

Per impostare e proseguire correttamente la terapia adeguata contro l'epatite B cronica, vale a la pena di dare un'occhiata alla dinamicità della malattia, che dipende dall'intelligenza del virus B. Un virus, come è stato detto, piccolo e con un DNA di limitate dimensioni, ma estremamente duttile e pericoloso: prima di tutto perché è in grado di inserirsi nel genoma delle cellule epatiche del malato (questo spiega le difficoltà ad eradicarlo, colpa anche dei frammenti di cccDNA), poi perché si trasforma e si adatta nel tempo alle condizioni dell'ospite, in modo da mantenere il più possibile la propria vitalità e capacità di replicazione. Per questo, la terapia dell'epatite cronica B deve essere seguita per lunghi periodi.

Segno chiaro della versatilità di HBV è la variazione del quadro di antigeni e anticorpi. Vediamo:

- I pazienti ai massimi livelli di viremia sono i più contagiosi e sono quelli in cui è presente l'antigene "e" (HBeAg positivi). Questi soggetti hanno elevati i livelli di replicazione del virus, ma con ALT normali o poco alterate. E' una condizione più frequente e più prolungata nei bambini infettati al parto o nei primi anni di vita. Questa fase della malattia è definita "immuno tollerante".
- I soggetti infettati in età adulta, oppure dopo molti anni di malattia immuno tollerante, sono anch'essi HBeAg positivi, ma con bassa replicazione del virus, ALT aumentate, o fluttuanti, e presenza sia di necroinfiammazione, sia di progressione verso la fibrosi. La fase è definita "immuno reattiva".
- Una fase tardiva dell'infezione, che spesso segue la precedente, è definita "HBeAg negativa" attiva. E' successiva alla sierconversione degli antigeni HBe in anticorpi anti-HBe. Il paziente, pur essendo HBeAg negativo e presentando anticorpi anti-HBe, soffre di periodiche riattivazioni della malattia, con ALT fluttuanti e DNA virale altrettanto fluttuante. La malattia quindi, nonostante la presenza di anti-HBe, si ripresenta ed è ad alto rischio di progressione. Non sono perciò portatori cronici inattivi.
- **ATTENZIONE:** I pazienti nella fase appena descritta, HBeAg negativa attiva, vanno differenziati dai veri portatori cronici inattivi del virus B. In questi pazienti, infatti, la sierconversione da antigeni ad anticorpi anti-HBe è accompagnata da livelli praticamente non rilevabili di DNA virale e da ALT normali. Questo gruppo ha invece una prospettiva di vita davvero buona, con scarse probabilità di evoluzione della malattia. Addirittura, una percentuale pari all'1-3 per cento all'anno riesce a guarire spontaneamente, grazie alla formazione di anticorpi anti-HBs.

Per distinguere i due gruppi appena descritti, occorre un follow-up di almeno un anno, con valutazioni trimestrali delle ALT e dei livelli di DNA virale.

- Un'ultima fase, "HBsAg negativa", è l'infezione occulta, in cui la replicazione virale permane, seppure a bassi livelli. Nel sangue il DNA virale non si rileva, ma ci sono invece anticorpi anti-HBc, con o senza presenza di anticorpi anti-HBs. E' uno stato abbastanza favorevole per il paziente, con scarsa possibilità di evoluzione. Va detto però che, in caso di immunosoppressione, l'infezione si riattiva.

### **LE TERAPIE ATTUALI**

Attualmente l'epatite B cronica può essere trattata con interferon-alfa, oppure con interferon alfa peghilato (Peg-interferon), oppure con analoghi nucleosidici, distinti in tre classi: L-nucleosidi (lamivudina, telbivudina..), fosfonati aciclici nucleosidici (adefovir, tenofovir), oppure analoghi deossiguanosinici (unico farmaco di questa classe, entecavir).

Il trattamento viene avviato nei pazienti con DNA virale superiore a 2000 UI/ml (10mila copie/ml), e/o i livelli di ALT sopra la normapresenza di necroinfiammazione e/o fibrosi. La terapia è ovviamente urgente nei soggetti con cirrosi scompensata, perché un buon controllo della replicazione virale è associato a un significativo miglioramento clinico, a meno che la malattia non risulti a uno stadio troppo avanzato, tanto da richiedere il trapianto.

Oggi sono tra l'altro disponibili alcuni parametri che permettono di predire se la risposta alle terapie sarà soddisfacente. Per esempio, nel caso degli analoghi nucleosidici/nucleotidici (NUC) predicono una buona risposta alle terapie, quindi una rapida e sostenuta sierconversione di HBeAg in anti-HBe, la presenza di una bassa carica virale, ALT elevate oltre 3 volte i limiti di laboratorio e alti punteggi di attività alla biopsia. Fortunatamente, il genotipo del virus al momento dell'inizio della terapia non pregiudica la risposta a questi farmaci.

Come è stato accennato altrove, l'interferon alfa e il Peg-interferon sono molto attivi sul virus B e possono indurre guarigione, ma il loro uso è accompagnato da effetti collaterali scarsamente tollerati; inoltre queste molecole non possono essere usate nei casi di cirrosi scompensata, di malattia autoimmune in atto, di depressione grave o di psicosi.

Diverso il discorso per gli analoghi nucleosidici/nucleotidici (NUC). Le Linee guida europee 2008 indicano espressamente in entecavir e in tenofovir le molecole di prima scelta, in quanto sono inibitori potenti dell'HBV e oppongono un'alta barriera alla comparsa di resistenze. Infatti, uno dei maggiori problemi con altri analoghi, quali lamivudina e adefovir, è la capacità del virus di mutare rapidamente, dando vita a ceppi che presto non rispondono più alla terapia: l'80 per cento dei pazienti trattati con lamivudina e il 25 per cento di quelli trattati con adefovir non risponde più dopo quattro anni. Nel caso di entecavir, invece, dopo 5 anni di trattamento si è vista una comparsa di resistenze soltanto nell'1,2 per cento dei casi, in quanto occorrono ben tre mutazioni genetiche del virus prima che si manifesti un virus resistente. Anche tenofovir sembra mostrare un'alta barriera allo sviluppo di resistenze.

A questo proposito, infatti, le Linee guida europee sottolineano che la durata di una terapia con NUC dipende dal momento in cui si ottiene la sieroconversione da HBeAg ad anti-HBe e dalla certezza della soppressione della carica virale. Ovviamente, più potente e con maggiore barriera genetica è la molecola usata, più rapida e sostenuta sono la sieroconversione e la soppressione della replicazione virale. Entecavir o tenofovir, cioè le due molecole attualmente più potenti e con la più alta barriera genetica, sono perciò indicate dagli esperti europei come la prima scelta (in monoterapia) nell'epatite B cronica mai trattata.

Una volta ottenute la soppressione della carica virale e la sieroconversione ad anticorpi anti-HBe, il trattamento dovrebbe durare altri 6 o 12 mesi, per garantire il risultato, continuando a controllare la presenza di anticorpi anti-HBe. Successivamente, il paziente deve comunque restare sotto controllo periodico, ogni 6 mesi, per controllare lo stato degli antigeni "s" (HBsAg) e degli anticorpi anti-HBs.

La terapia va invece prolungata rispetto a quanto appena indicato se:

- non si riesce a ottenere una risposta soddisfacente, in termini di sieroconversione da HBeAg ad anti-HBe
- nei pazienti HBeAg-negativi
- in tutti i pazienti cirrotici.

Entecavir e tenofovir sono inoltre indicati dagli esperti europei come terapia di salvataggio nei casi di resistenza ad adefovir da sottodosaggio e possono essere associati ad altri NUC in caso di risposta virologica non completa dopo 24 settimane.

## **6) USO DI ENTECAVIR**

Entecavir, analogo nucleosidico di terza generazione, è disponibile anche in Italia dal gennaio 2007. Scoperto e sviluppato dall'équipe guidata da Richard Colonna, ricercatore del Pharmaceutical Research Institute della Bristol-Myers Squibb, la molecola rappresenta una vera svolta terapeutica e culturale nei confronti dell'approccio all'epatite B cronica. Entecavir, infatti, è un farmaco estremamente potente e ad alta barriera genetica. Significa che la sua azione nei confronti del virus B è rapida e che la terapia mantiene l'efficacia nel tempo, perché sono necessarie tre mutazioni prima che il virus diventi resistente: dopo 5 anni di trattamento si è vista una comparsa di resistenze soltanto nell'1,2 per cento dei casi.

Questo significa poter abbattere prima ed efficacemente la replicazione di HBV, quindi la carica virale, e indurre velocemente e in modo sostenuto la sieroconversione da HBeAg (alta carica virale e alta

contagiosità) ad anticorpi anti-HBe. Sono queste le due condizioni fondamentali che possono preludere a un controllo dell'evoluzione della malattia nel tempo, rallentando la comparsa di cirrosi ed eventualmente di carcinoma epatocellulare. Entecavir è classificato in fascia H, quindi per uso ospedaliero. E' disponibile in compresse, in due formulazioni, da 0,5 e da 1,0 mg. Il prezzo, per confezioni da 30 compresse, è di 377, 7 euro. L'uso di entecavir non è raccomandato al di sotto dei 18 anni di età perché mancano dati sulla sicurezza e l'efficacia. Non è richiesto alcun aggiustamento della dose in base all'età, né relativamente al sesso o alla razza. Si raccomanda però l'aggiustamento del dosaggio nei pazienti con clearance della creatinina < 50 ml/min.

Le Linee guida europee per la gestione dell'epatite B cronica, stilate nel 2008 dalla European Association for the Study of the Liver (EASL), indicano entecavir come molecola di prima scelta (insieme a tenofovir), in monoterapia, nei pazienti con epatite B cronica mai trattati. Una volta ottenute la soppressione della carica virale e la sierconversione ad anticorpi anti-HBe (dopo 24 o 48 settimane), il trattamento dovrebbe durare altri 6 o 12 mesi, per garantire il risultato, controllando la presenza di anticorpi anti-HBe.

La terapia va ulteriormente prolungata:

- se non si riesce a ottenere una risposta soddisfacente, in termini di sierconversione da HBeAg ad anti-HBe
- nei pazienti HBeAg-negativi
- in tutti i pazienti cirrotici.

Entecavir è inoltre indicato come terapia di salvataggio nei casi di resistenza ad adefovir da sottodosaggio e può essere associato ad altri NUC, in caso di risposta virologica non completa dopo 24 settimane. Successivi studi di valutazione, focalizzati sul rapporto costo/efficacia, dimostrano un rapporto incrementale (ICER) pari a 9.935 euro per anno di vita guadagnato e a 10.786 euro per anno di vita guadagnato, pesato per la qualità (QALY).

## **7) L'APPORTO ITALIANO ALLA RICERCA SU HBV DAGLI ANNI '70 A OGGI**

I ricercatori italiani entrano più di una volta nella ricerca sulle epatiti in generale e sull'HBV in particolare. Da citare è senz'altro Alberto Vierucci che, a Siena, studia le epatiti post-trasfusionali su pazienti italiani, confermando il rischio di contagio per uso di sangue contaminato da HBV, negli stessi anni in cui l'evidenza emerge dalle ricerche di Baruch Blumberg e Alfred Prince negli Stati Uniti e di Kazuo Okochi a Tokio. Vierucci sarà anche il primo a utilizzare il vaccino anti-epatite B nei bambini. Nel 1977, Mario Rizzetto, gastroenterologo dell'Università di Torino, e il virologo molecolare John Gerin scoprono il virus delta, agente eziologico dell'epatite D. Questo agente è presente nel 5% di tutti i pazienti con infezione HBV. L'epatite che ne deriva è spesso severa. Un motivo in più per caldeggiare la diffusione della vaccinazione anti-epatite B.

Veniamo all'oggi e a entecavir. Dopo gli studi di registrazione, ai quali hanno partecipato diversi gruppi italiani, attualmente la ricerca di punta su questa molecola è coordinata da Massimo Colombo, gastroenterologo dell'Università degli Studi di Milano.

A San Francisco, in occasione del congresso dell'American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD) tenuto nel novembre 2008, sono stati presentati i dati di uno studio che ha coinvolto nove

unità di epatologia, studiando soltanto pazienti ambulatoriali, così da verificare l'efficacia e la potenza di entecavir nella pratica clinica quotidiana. Sono stati inclusi 182 pazienti, trattati con entecavir alla dose di 0,5 mg al giorno per 12 mesi (5-24). L'età media era 54 anni; il 74 per cento di essi era maschio, il 47 per cento presentava segni di cirrosi, l'83 per cento era HBeAg-negativo. Durante la terapia, sono stati monitorizzati la funzionalità epatica e la carica virale (con PCR) ogni tre mesi, mentre l'insorgenza di eventuale resistenza è stata valutata ogni sei mesi.

Nell'85 per cento dei soggetti la carica virale è diventata non rilevabile alla 48<sup>a</sup> settimana di terapia (nel 64 per cento già alla 24<sup>a</sup>). La risposta più rapida e sostenuta si è avuta in entrambi i casi nei pazienti HBeAg negativi e in coloro che avevano una minor carica virale al basale. Non si è avuta alcuna ripresa imprevista della carica virale durante il trattamento.

Intanto, proseguono gli studi su due gruppi di pazienti: il primo arruolato al Policlinico di Milano, il secondo in collaborazione con altri centri di epatologia lombardi, che arruolano i pazienti facendo però capo al Policlinico di Milano e al Centro di epatologia di Brescia per il monitoraggio della terapia. "Nell'arco di due-tre anni dovremmo riuscire a raccogliere dati su 350 pazienti, vale a dire una delle casistiche più consistenti in Occidente sull'epatite cronica B" sottolinea Colombo. "Vorremmo non soltanto validare la terapia con entecavir 0,5 mg/die, in termini di soppressione virale rapida e sostenuta (90 per cento a un anno), ma anche inquadrare in modo definitivo la capacità della terapia di prevenire l'ipertensione portale e lo sviluppo di cirrosi e verificare l'ipotesi di prevenzione dell'epatocarcinoma". Non solo. Sul tappeto ci sono altri quesiti a cui la ricerca vuole rispondere: "Poiché il 10-20 per cento dei pazienti ha una risposta sub-ottimale, vale a dire una caduta lenta (oltre i 3-6 mesi) della carica virale, stiamo cercando di individuare i parametri che potrebbero inquadrare questo tipo di paziente. Per ora si sa che la presenza di insulino-resistenza (condizione di pre-diabete), un sfavorevole rapporto tra peso corporeo e dose di farmaco (sovrappeso/obesità), alta carica virale basale sono tutte condizioni che non favoriscono una risposta rapida e sostenuta alla terapia. Bisogna capire se e come utilizzare questi dati per la personalizzazione del trattamento migliore per ciascun soggetto".

Hong Kong, febbraio 2009