

## ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ REVIEW

# Το πρόβλημα της ιικής αντίστασης στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β

Τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται στη θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης από τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) είναι η ιντερφερόνη-α, τα νουκλεοσιδικά ανάλογα λαμβουδίνη, τελμπουδίνη, εντεκαβίρη και τα νουκλεοτιδικά ανάλογα αδεφοβίρη και τενοφοβίρη. Όταν επιλέγεται η χρήση νουκλεοσιδικού-νουκλεοτιδικού αναλόγου, η θεραπεία χορηγείται για μεγάλο χρονικό διάστημα, ιδιαίτερα σε ασθενείς χωρίς ΗΒεΑg, με τον κίνδυνο να αναδυθούν ανθεκτικά ιικά στελέχη που περιορίζουν την αποτελεσματικότητα της θεραπείας. Η ιντερφερόνη-α δεν προκαλεί ιική αντίσταση. Η συχνότητα εκδήλωσης της αντίστασης ποικίλλει ανάλογα με το αντι-ικό φάρμακο. Η θεραπεία με λαμβουδίνη συσχετίζεται με εκδήλωση ιικής αντίστασης στο 70% των ασθενών στα 5 χρόνια, η αδεφοβίρη σε ποσοστό 29% στα 5 χρόνια, η εντεκαβίρη σπάνια (όμως 39% στα 4 χρόνια σε ασθενείς με αντίσταση στη λαμβουδίνη) και η τελμπουδίνη σε ποσοστό 22% στα 2 χρόνια. Οι επιπτώσεις της ανάδυσης των ανθεκτικών στελεχών περιλαμβάνουν την αύξηση της ιαιμίας (επίπεδα HBV DNA στον ορό), των τρανσαμινασών και των εκδηλώσεων ηπατικής ανεπάρκειας σε ασθενείς με προχωρημένη ηπατική νόσο. Η επιλογή του αντι-ικού φαρμάκου θα πρέπει να βασίζεται στη δραστηριότητά του στη μείωση της ιαιμίας και στην πιθανότητα ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών. Σε ασθενείς όπου η θεραπεία δεν προκαλεί σημαντική μείωση του ιικού πολλαπλασιασμού, ο κίνδυνος ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών είναι μεγαλύτερος. Σε ασθενείς που λαμβάνουν αγωγή με νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα θα πρέπει να παρακολουθούνται τα επίπεδα της ιαιμίας τακτικά για να εντοπίζεται έγκαιρα η ιολογική διαφυγή. Σε ασθενείς με εκδήλωση αντίστασης στη λαμβουδίνη προστίθεται αδεφοβίρη ή τενοφοβίρη, ενώ σε αντίσταση στην αδεφοβίρη προστίθεται λαμβουδίνη. Συμπερασματικά, η παρακολούθηση της ιικής αντίστασης και η έγκαιρη αντιμετώπιση είναι πολύ σημαντική κατά τη διάρκεια της θεραπείας με αντι-ικά φάρμακα.

### 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια για την αντιμετώπιση ιογενών λοιμώξεων (ιός ανοσιακής ανεπάρκειας των ενηλίκων, human immunodeficiency virus [HIV], μεγαλοκυτταροϊός, ιός έρπητα απλού και ζωστήρα κ.λπ.). Τα νουκλεοσιδικά ανάλογα, ως διδεοξυνουκλεοτιδία, ενσωματώνονται στο ιικό γονιδίωμα κατά τον πολλαπλασιασμό και διακόπτουν την επιμήκυνση της αλυσίδας των νουκλεοτιδίων.

Η θεραπεία της χρόνιας λοίμωξης με τον ιό της ηπατίτιδας Β (HBV) με νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα και χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο. Τα ανάλογα αυτά χορηγούνται από το στόμα, δεν παρουσιάζουν σοβαρές ανεπιθύμητες ενέργειες (π.χ. μυελοτοξικότητα) και μπορεί να χρησιμοποιηθούν σε

ΑΡΧΕΙΑ ΕΛΛΗΝΙΚΗΣ ΙΑΤΡΙΚΗΣ 2009, 26(3):295-306  
ARCHIVES OF HELLENIC MEDICINE 2009, 26(3):295-306

Σ.Π. Ντουράκης

Β΄ Πανεπιστημιακή Παθολογική Κλινική,  
«Ιπποκράτειο» ΠΓΝΑ, Αθήνα

The problem of viral resistance  
in chronic hepatitis B therapy

Abstract at the end of the article

### Λέξεις ευρετηρίου

Αδεφοβίρη  
Εντεκαβίρη  
Ηπατίτιδα Β  
Ιικές μεταλλαγές  
Ιική αντίσταση  
Ιός ηπατίτιδας Β  
Λαμβουδίνη  
Νουκλεοσιδικά ανάλογα  
Νουκλεοτιδικά ανάλογα  
Στελέχη διαφυγής  
Τελμπουδίνη

Υποβλήθηκε 20.1.2008

Εγκρίθηκε 5.2.2008

τελικού σταδίου ηπατική νόσο (μη αντιρροπούμενη κίρρωση), αφού δεν εκδηλώνεται «θεραπευτική ηπατίτιδα». Επίσης, μπορεί να χορηγηθούν και σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς κάθε κατηγορίας (μεταμόσχευση ήπατος ή άλλου οργάνου, HIV-λοίμωξη, υπό χημειοθεραπεία ή ανοσοκατασταλτική αγωγή κ.λπ.). Μετά από τη μεταμόσχευση ήπατος, χορηγούνται ως προφυλακτική αγωγή για την αποφυγή της επαναμόλυνσης του μοσχεύματος, αφού δεν δρουν στο ανοσιακό σύστημα και κατά συνέπεια δεν ενοχοποιούνται για απόρριψη του μοσχεύματος.<sup>1,2</sup> Όμως, τα νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα είναι ακριβά, ενώ χορηγούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα (σε ΗΒεΑg θετικούς ασθενείς για 6-12 μήνες μετά από την οροαναστροφή σε αντι-ΗΒε και σε ΗΒεΑg αρνητικούς επ' αόριστο) και έτσι συχνά οδηγούν στην ανάδυση ανθεκτικών στελεχών.<sup>3</sup>

## 2. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ HBV – ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΝΤΙ-ΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

Στα μολυσμένα ηπατοκύτταρα, το HBV DNA απελευθερώνεται από το ιικό πυρηνοκαψίδιο και μεταφέρεται στον πυρήνα όπου μετατρέπεται σε υπερελικωμένο DNA (covalently closed circular, ccc HBV DNA), το οποίο θα αποτελέσει τη μήτρα για τη μεταγραφή του αγγελιοφόρου RNA που θα μεταφράσει την ιική πρωτεΐνη και για τη μεταγραφή του προγονιδιακού RNA που θα μετατραπεί με ανάστροφη μεταγραφή σε ιικό DNA. Τα νουκλεοσιδικά-νουκλεοτιδικά ανάλογα αναστέλλουν τον ιικό πολλαπλασιασμό, αλλά δεν εξαφανίζουν το ενδοκυττάριο ccc HBV DNA. Μερικά αντίγραφα του cccDNA μπορεί να παραμένουν ακόμη και μετά από την απώλεια του HBsAg με ή χωρίς οροαναστροφή σε αντι-HBs.<sup>4</sup> Έτσι, παρά τη δραστική αντι-ϊική θεραπεία και την εξαφάνιση της ιαιμίας σε έλεγχο με ευαίσθητη τεχνική μοριακής βιολογίας, στον πυρήνα του ηπατοκυττάρου παραμένουν 30–40 αντίγραφα ccc HBV DNA που παρουσιάζουν μακρά ημιπερίοδο ζωής και προκαλούν την υποτροπή της λοίμωξης μετά από τη διακοπή του φαρμάκου.<sup>5</sup> Η δημιουργία νέου ccc HBV DNA μπορεί να περιοριστεί με την αναστολή της ανάστροφης μεταγραφής, ενώ η παρατεταμένη θεραπεία ίσως μπορεί να προκαλέσει την εκρίζωσή του, εφόσον αφενός τα μολυσμένα ηπατοκύτταρα εκκαθαριστούν από την ανοσιακή απάντηση του οργανισμού και αφετέρου δεν αναδυθούν μεταλλαγμένα στελέχη. Έτσι, εκρίζωση της HBV-λοίμωξης μπορεί θεωρητικά να επιτευχθεί μόνο με μακροχρόνια (για 1–10 χρόνια) χορήγηση αντι-ϊκών νουκλεοσιδικών αναλόγων, αφού, μετά από ένα έτος, μόνο το 10% των μολυσμένων ηπατοκυττάρων (χρόνος ζωής 10–100 ημέρες με ημερήσια ανανέωση 1–7%) θα έχει εξαφανιστεί. Η μακροχρόνια όμως χορήγηση αντι-ϊκών ουσιών δημιουργεί το κατάλληλο πλαίσιο για την ανάδειξη μεταλλαγμένων στελεχών που δεν είναι πλέον ευαίσθητα στη θεραπεία.<sup>6,7</sup> Η ανάδυση ανθεκτικών στελεχών συνοδεύεται από απώλεια του κλινικού οφέλους και έχει διαπιστωθεί σε άλλοτε άλλο ποσοστό με όλα τα αντι-ϊκά φάρμακα, αφού είναι νόμος της φύσης και έχει ως σκοπό τη διαιώνιση του ιού.

## 3. ΙΙΚΕΣ ΜΕΤΑΛΛΑΓΕΣ

Οι ιοί τροποποιούν το γονιδίωμά τους με την πάροδο του χρόνου και οι μεταλλαγές που παρουσιάζουν αποτελούν μέρος της φυσικής ιστορίας της λοίμωξης που προκαλούν. Με τον τρόπο αυτόν επιβίωσαν κατά την πάροδο του χρόνου. Ο ιός της γρίπης αποτελεί χαρακτηριστικό παράδειγμα.<sup>8</sup> Η εφαρμογή της μοριακής βιολογίας στη μελέτη του HBV έχει οδηγήσει σε ανακάλυψη μεταλλαγών του ιού σε διάφορα σημεία του γονιδιώματος, με πολύ σημαντική κλινική σημασία (υπότυποι και γονότυποι του ιού, προπυρηνικές και πυρηνικές μεταλλαγές, μεταλλαγές στο φάκελο,

μεταλλαγές που προσδίδουν αντίσταση σε φάρμακα).<sup>2</sup> Ο HBV είναι κυρίως (αλλά όχι αποκλειστικά) ηπατοτρόπος DNA ιός, κυκλικός, μερικώς διπλής και μερικώς μονής αλυσίδας 3.200 βάσεων, με περίβλημα και με μοναδικό τρόπο πολλαπλασιασμού (μέσω RNA προγονιδιώματος) που μοιάζει με εκείνον των ρετροϊών.<sup>9,10</sup> Ο HBV πολλαπλασιασμός είναι ταχύς, με χρόνο ημίσειας ζωής στο πλάσμα 24 ώρες, ιικό φορτίο  $2 \times 10^{11}$ , ημερήσια παραγωγή  $10^{12,13}$  γονιδιωμάτων και αλλαγή ιικού φορτίου κάθε 7–21 ημέρες. Οι μεταλλαγές του HBV ευνοούνται από τη δομή της πολυμεράσης του. Κατά τον πολλαπλασιασμό του HBV, η DNA/RNA πολυμεράση, λόγω έλλειψης μηχανισμού διόρθωσης<sup>11</sup> (όπως συμβαίνει με τον HIV),<sup>12</sup> κάνει λάθη στο στάδιο της ανάστροφης μεταγραφής δημιουργώντας διαρκώς μεταλλαγές.<sup>13</sup> Έχει υπολογιστεί ότι σε κάθε ιικό νουκλεοτίδιο, σε κάθε άτομο με χρόνια HBV-λοίμωξη, συμβαίνουν  $1-3 \times 10^5$  ή σύμφωνα με άλλους  $2 \times 10^4$  μεταλλαγές/βάση/κύκλο,<sup>14</sup> δηλαδή  $10 \times 10^6$  μεταλλαγές/βάση/ημέρα<sup>15</sup> και συνολικά  $10^{10,11}$  σημειακές μεταλλαγές κάθε ημέρα. Αν και όλες οι δυνατές μεταλλαγές κάθε βάσης του HBV γονιδιώματος συμβαίνουν κάθε ημέρα, τα περισσότερα στελέχη είναι θνησιγενή, γιατί οι μεταλλαγές αυτές τροποποιούν περιοχές απαραίτητες για τον ιικό πολλαπλασιασμό. Όμως, κάποια από τα μεταλλαγμένα στελέχη θα επιζήσουν, εάν προσφέρουν κάποιο σημαντικό πλεονέκτημα στον ιό. Ο σκοπός είναι πάντοτε η επιβίωση του ιού υπό συνθήκες πίεσης (ανοσιακής ή φαρμακευτικής), έστω και μειωμένο, με πολλαπλασιασμό. Σε κάθε ξενιστή, οι ιοί υπάρχουν ως ετερογενείς πληθυσμοί (σχεδόν είδη, quasi species) με κάποιο στέλεχος να επικρατεί (αρχικά το φυσικό και υπό συνθήκες πίεσης το μεταλλαγμένο). Έτσι, σε ασθενείς με χρόνια HBV-λοίμωξη έχει διαπιστωθεί ιαιμία από στελέχη με διαφορετικές αλληλουχίες βάσεων, που σε δεδομένες συνθήκες πίεσης (ανοσιακής, φαρμακευτικής) τροποποιείται (στελέχη διαφυγής) προς όφελος πάντοτε του ιού, με στόχο τη διαιώνιση της επιβίωσής του.<sup>16–20</sup>

## 4. ΙΙΚΗ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ

Λόγω των χαρακτηριστικών της HBV πολυμεράσης/ ανάστροφης μεταγραφής (επιρρεπής λόγω μη διόρθωσης των λαθών της), του ταχέως ιικού πολλαπλασιασμού και της μακροχρόνιας χορήγησης ατελώς δρώντων αντι-ϊκών φαρμάκων που δεν εκρίζουν τον ιό, δημιουργούνται και επιλέγονται σημειακές μεταλλαγές αντίστασης στις τέσσερις περιοχές του πλαισίου της πολυμεράσης/ανάστροφης μεταγραφής.

Η ιική αντίσταση ορίζεται ως η παρουσία ή η ανάδυση αλλαγής στην αλληλουχία των αμινοξέων (μεταλλαγές) του φυσικού ιού που τροποποιούν την ιική πρωτεΐνη-

στόχο και μειώνουν την ευαισθησία του φυσικού ιού στα αντι-ικικά φάρμακα. Οι μεταλλαγές αυτές μπορεί να προϋπάρχουν της θεραπείας (πρωτοπαθής αντίσταση), με συνέπεια τη μη ανταπόκριση στη θεραπεία, ή μπορεί να επιλεγούν αργότερα (δευτεροπαθής αντίσταση) έχοντας ως επακόλουθο την απώλεια αρχικά της διαπιστωθείσας ανταπόκρισης στη θεραπεία (εικ. 1). Στις περιπτώσεις αυτές χρειάζεται διαφορική διάγνωση από τη μη συμμόρφωση στη θεραπεία ή τη χορήγηση ανεπαρκούς δόσης του αντι-ικικού φαρμάκου.<sup>27</sup> Οι πρωτεύουσες μεταλλαγές μπορεί να συνοδεύονται από δευτερεύουσες που βελτιώνουν (συχνά αποκαθιστούν) την ικανότητα πολλαπλασιασμού, η οποία συνήθως μειονεκτεί στα στελέχη διαφυγής.<sup>22</sup> Η απόσυρση του φαρμάκου έχει ως αποτέλεσμα την εκ νέου ανάδυση του φυσικού ευαίσθητου γονοτυπικά και φαινοτυπικά στελέχους (wild type). Η επανέκθεση στο φάρμακο οδηγεί σε ταχύτατη επάνοδο του ανθεκτικού στελέχους.

Παράγοντες που συσχετίζονται με την ανάδυση μεταλλαγμένου στελέχους που προσδίδει ικκή αντίσταση σε φάρμακα είναι ο αριθμός των μεταλλαγών που απαιτούνται για τη διαφυγή (όσο λιγότερες, τόσο μεγαλύτερος ο κίνδυνος), η σημασία της μεταλλαγής στην ικανότητα πολλαπλασιασμού, το μέγεθος του ιικού φορτίου και ο βαθμός ικκής καταστολής.

Απλές ή διπλές μεταλλαγές αντίστασης προϋπάρχουν της θεραπείας στους περισσότερους ασθενείς και αποτελούν συχνή αιτία αποτυχίας των μονοθεραπειών, αφού επιλέγονται με την πάροδο του χρόνου και την καταστολή του φυσικού ιού. Τριπλές ή τετραπλές μεταλλαγές αντίστασης σπάνια προϋπάρχουν, γεγονός που καθιστά χρήσιμη τη συνδυασμένη αγωγή (εφαρμόζεται ευρέως και με επιτυχία στην αντιρετροϊκή αγωγή).

Για την ανάδυση και την επικράτηση μεταλλαγμένου στελέχους απαιτείται κάποιος βαθμός ιικού πολλαπλασιασμού.<sup>23</sup> Έτσι, εάν ο πολλαπλασιασμός του ιού μειωθεί πάρα πολύ, η πιθανότητα ανάδυσης μεταλλαγμένου στελέχους μειώνεται μέχρι εξαφάνισης. Η μεγάλη μείωση της ιαιμίας αποτελεί τον πρωταρχικό στόχο της θεραπείας,<sup>24</sup> αλλά και καλό προγνωστικό δείκτη της μη ανάδυσης μεταλλαγμένου στελέχους. Η ανάδυση ανθεκτικών στελεχών αφορά συχνότερα σε ανοσοκατασταλμένους ασθενείς (π.χ. μεταμοσχευμένους), οπότε ο ιός πολλαπλασιάζεται έντονα και η διαφυγή του είναι πιθανότερη.

Παρακάτω αναφέρονται ορισμοί χρήσιμοι στην κατανόηση της ικκής αντίστασης.<sup>25</sup>

#### 4.1. Κλινικοί ορισμοί

*Γονοτυπική αντίσταση:* Καθορισμός των μεταλλαγών στο ιικό γονιδίωμα που προσφέρουν αντίσταση στο φάρμακο και αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της θεραπείας

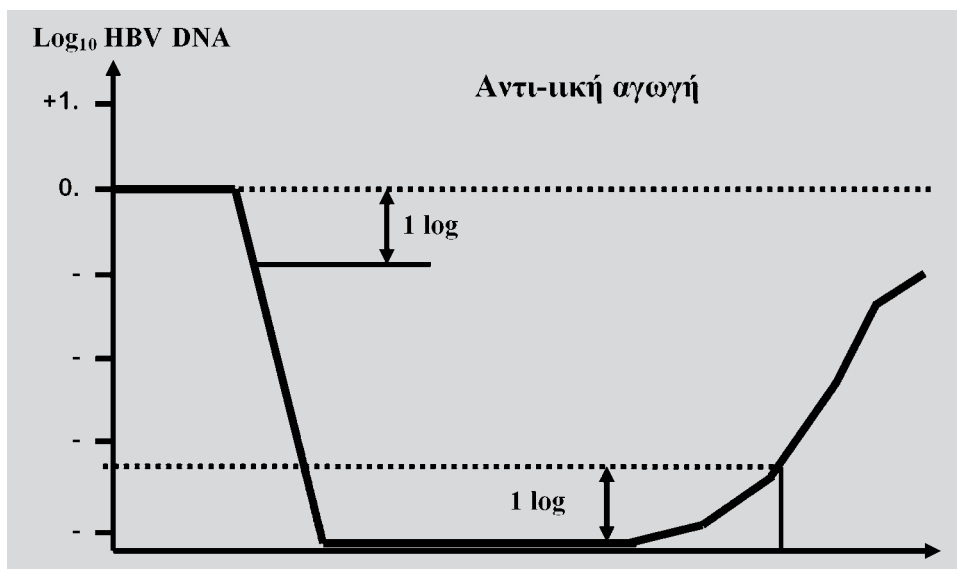
*Ιολογική διαφυγή:* Αύξηση των επιπέδων της ιαιμίας μετά από την ανάπτυξη της γονοτυπικής αντίστασης

*Κλινική διαφυγή:* Ιολογική διαφυγή με συνοδό αύξηση των τρανσαμινασών με ή χωρίς ίκτερο ή και ιστολογική επιδείνωση.

#### 4.2. Εργαστηριακοί ορισμοί (*in vitro*)

*Φαινοτυπική αντίσταση:* Μειωμένη δραστικότητα κάποιου φαρμάκου στην αναστολή του ιικού πολλαπλασιασμού μετά από την ανάπτυξη γονοτυπικής αντίστασης

*Διασταυρούμενη αντίσταση:* Ανθεκτικά στελέχη σε



**Εικόνα 1.** Πρωτοπαθής και δευτεροπαθής ικκή αντίσταση (πηγή: Lau et al,<sup>41</sup> τροποποιημένο).

κάποιο φάρμακο, που παρουσιάζουν αντίσταση και σε άλλο αντι-ϊικό φάρμακο.

## 5. ΚΛΙΝΙΚΕΣ ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΤΗΣ ΙΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Τα ανθεκτικά στελέχη αναδύονται ως ελάσσωσ υποπληθυσμός ιικών γονιδιωμάτων στα ηπατοκύτταρα πολύ πριν από την εμφάνιση κλινικής ή ιολογικής διαφυγής.<sup>26,27</sup> Οι επιπτώσεις της ανάπτυξης ιικής αντίστασης είναι η απώλεια του επιτευχθέντος κλινικού οφέλους με ιολογική διαφυγή (αύξηση της ιαίμιας), η μείωση του ποσοστού οροαναστροφής ΗΒεΑg σε αντι-ΗΒε, η αύξηση των τρανσαμινασών, με ή χωρίς την εκδήλωση ικτέρου, η ιστολογική επιδείνωση και, σε κίρρωτικούς ασθενείς, η εκδήλωση ρήξης της ηπατικής αντιρρόπησης ή η απώλεια του μοσχεύματος σε μεταμοσχευμένους ασθενείς<sup>28-32</sup> (εικ. 2). Θεωρητικά, υπάρχει και το γενικότερο πρόβλημα (κίνδυνος) της μετάδοσης των αναδυθέντων ανθεκτικών στελεχών.<sup>33</sup>

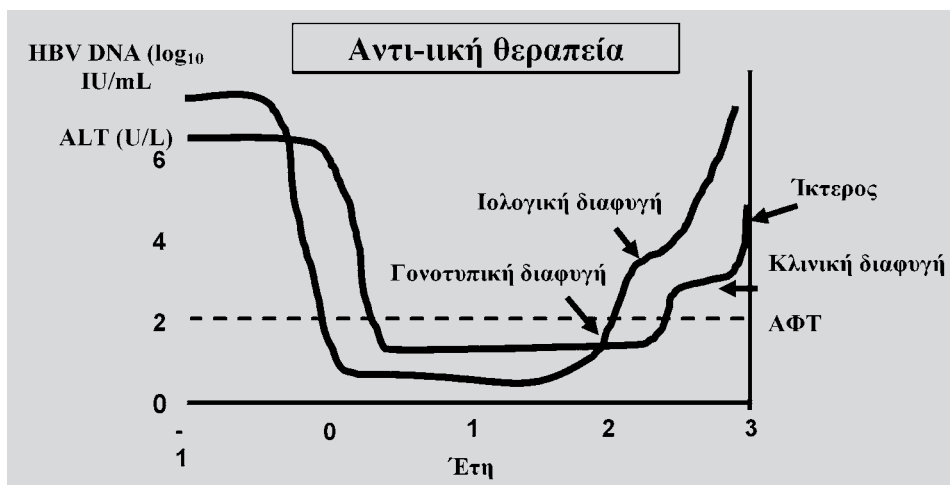
Τα κλινικά ερωτήματα σχετικά με την ιική αντίσταση είναι η παρακολούθηση για πρώιμη διάγνωσή της (αναζήτηση της διαφυγής), η ορθή αντιμετώπισή της και η πρόληψή της.

## 6. ΑΝΑΖΗΤΗΣΗ ΤΗΣ ΙΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Η αναζήτηση της ιικής αντίστασης εργαστηριακά γίνεται με τον έλεγχο της γονοτυπικής αντίστασης, που διενεργείται με εμπορικά διαθέσιμες μεθόδους μοριακής βιολογίας με τον άμεσο καθορισμό της αλληλουχίας των αμινοξέων (direct sequencing) μετά από πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος με αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (polymerase chain reaction, PCR),<sup>34,35</sup> με

αναζήτηση της μεταλλαγής με ανιχνευτή (line probe assay, LiPA)<sup>36</sup> και με καθορισμό της αλληλουχίας των ιικών κλώνων των «σχεδόν ειδών» (sequencing molecular clones-quasi species). Οι μέθοδοι αναζήτησης πολυμορφισμού είναι ευαίσθητοι αλλά δεν είναι ακόμη εμπορικά διαθέσιμοι.<sup>37,38</sup> Ο άμεσος καθορισμός της αλληλουχίας των αμινοξέων μετά από πολλαπλασιασμό του ιικού γονιδιώματος επιτελείται κυρίως σε ιολογικά εργαστήρια αναφοράς και παρουσιάζει το μειονέκτημα της μειωμένης ευαισθησίας σε ιικούς πληθυσμούς, σε ποσοστό <20% των «σχεδόν ειδών».<sup>39</sup> Η αναζήτηση της μεταλλαγής με ανιχνευτή είναι εμπορικά διαθέσιμη, ευαίσθητη (5% των «σχεδόν ειδών»), αλλά απαιτεί τη χρησιμοποίηση ειδικών ανιχνευτών για την κάθε μεταλλαγή.<sup>40</sup>

Η αναζήτηση της φαινοτυπικής αντίστασης γίνεται με τον πολλαπλασιασμό του ιού σε καλλιέργεια κυττάρων σε περιβάλλον άλλοτε άλλης συγκέντρωσης του αντι-ϊικού φαρμάκου.<sup>41,42</sup> Έτσι, διενεργείται προσδιορισμός της συγκέντρωσης του φαρμάκου που απαιτείται για *in vitro* καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού κατά 50% (inhibition concentration, IC50) σε σχέση με στέλεχος αναφοράς. Ανάλογα με το αποτέλεσμα, γίνεται εκτίμηση της κλινικής ανταπόκρισης στην αντι-ϊική θεραπεία. Ο φαινοτυπικός έλεγχος για γνωστές ή άγνωστες μεταλλαγές συστήνεται σε ασθενείς με πολλές μεταλλαγές αντίστασης όπου δεν μπορεί να εκτιμηθεί εύκολα και για την αναζήτηση της διασταυρούμενης αντίστασης σε άλλα αντι-ϊικά φάρμακα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι η απευθείας εκτίμηση της αντίστασης στο φάρμακο και της διασταυρούμενης αντίστασης, ενώ τα μειονεκτήματά της είναι το υψηλό κόστος, ο απαιτούμενος κατάλληλος πολύπλοκος εργαστηριακός εξοπλισμός, ο απαιτούμενος χρόνος για την εξέταση και το γεγονός ότι η εκτίμηση αφορά μόνο στον κυρίαρχο ιικό πληθυσμό (παρουσιάζει χαμηλή ευαισθησία για τους υποπληθυσμούς) και προϋποθέτει καλή γνώση των κλινικών ορίων της αντίστασης.



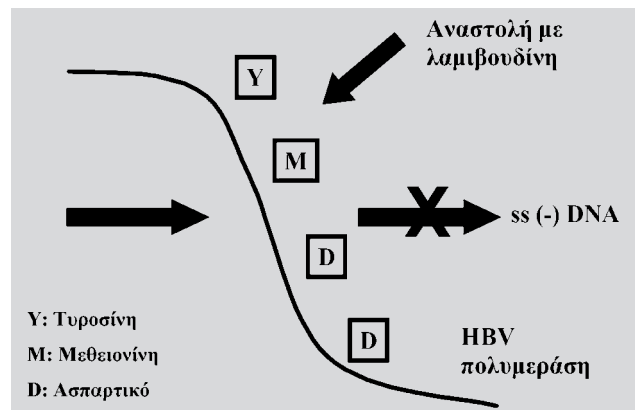
**Εικόνα 2.** Ανάπτυξη ιικής αντίστασης κατά τη θεραπεία με νουκλεοσιδικό-νουκλεοτιδικό ανάλογο (πηγή: Lau et al,<sup>41</sup> τροποποιημένο).

Η κλινική διάγνωση της πρωτοπαθούς ιικής αντίστασης γίνεται με τη διαπίστωση μη μείωσης των επιπέδων του HBV DNA στον ορό  $\geq 1-2 \log_{10}$  IU/mL στους πρώτους 6 μήνες της θεραπείας<sup>25,29,39</sup> (εικ. 1). Το χρονικό αυτό διάστημα μπορεί να είναι και μικρότερο, γεγονός που υποβοηθά την έγκαιρη διάγνωση. Η κλινική διάγνωση της δευτεροπαθούς ιικής αντίστασης, σε ασθενή που επιβεβαιωμένα λαμβάνει το φάρμακό του, γίνεται με την ποσοτική παρακολούθηση της ιαιμίας (HBV DNA στον ορό) με ευαίσθητη τεχνική PCR και τη διαπίστωση αύξησης του τίτλου της ( $\geq 1 \log_{10}$  IU/mL), η οποία ακολούθησε χρονικά προηγούμενη σημαντική μείωσή της. Συνιστάται η επιβεβαίωση της αύξησης να γίνεται και με δεύτερη εξέταση, ένα μήνα μετά την πρώτη,<sup>25,29,39</sup> πρακτική όμως που δεν εφαρμόζεται στην καθημερινή κλινική πράξη, λόγω του κόστους και της έλλειψης πολλών αξιόπιστων εργαστηρίων. Την αύξηση της ιαιμίας (ιολογική διαφυγή) ακολουθεί η αύξηση των τρανσαμινασών (αμινοτρανσφερασών, βιοχημική διαφυγή) και ίσως της χολερυθρίνης (κλινική διαφυγή) (εικ. 2). Το γεγονός αυτό συνηγορεί υπέρ της στενής ιολογικής, βιοχημικής και κλινικής παρακολούθησης των ασθενών που λαμβάνουν αντι-ιικά φάρμακα. Ασφαλώς, πάντοτε απαιτείται αποκλεισμός της έλλειψης συμμόρφωσης του ασθενούς στην τακτική λήψη του αντι-ιικού φαρμάκου. Εφόσον υπάρχει η δυνατότητα, εργαστηριακά μπορεί να γίνει και αναζήτηση με το γονοτυπικό έλεγχο κάποιας γνωστής HBV μεταλλαγής. Η συχνότητα της παρακολούθησης του ασθενούς καθορίζεται σε συνάρτηση με την ιστολογική εικόνα του ήπατος (σε χρόνια ηπατίτιδα κάθε 6 μήνες, σε κίρρωση κάθε 3 μήνες) και με το χορηγούμενο φάρμακο (σε θεραπεία με αδεφοβίρη ή εντεκαβίρη, κατά τον πρώτο και δεύτερο χρόνο θεραπείας, αραιότερα σε σχέση με τη λαμβουδίνη ή την τελμπιβουδίνη).

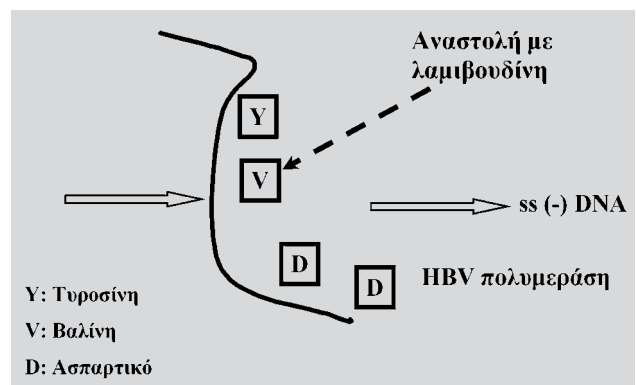
**7. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗ ΛΑΜΙΒΟΥΔΙΝΗ**

Η λαμβουδίνη (3TC) είναι νουκλεοσιδικό ανάλογο της κυτοσίνης, χορηγούμενη σε ημερήσια δόση 100 mg (δισκία Zeffix) σε ασθενείς με χρόνια HBV ηπατίτιδα. Η 3TC, λόγω της ασφάλειας που παρουσιάζει, χρησιμοποιήθηκε ευρύτατα στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β τα τελευταία 10 χρόνια. Όμως, κατά τη διάρκεια της θεραπείας με 3TC ασθενών με HBeAg θετική ή αρνητική χρόνια HBV ηπατίτιδα παρουσιάζεται ανάπτυξη αντίστασης στο φάρμακο (φαινόμενο διαφυγής) ανάλογη με την παρατηρούμενη σε ασθενείς με HIV-λοίμωξη. Το φαινόμενο διαφυγής έχει αποδοθεί στην ανάπτυξη δύο τύπων μεταλλαγών (M204I και M204V) στην περιοχή C της πολυμεράσης του ιού, στο μοτίβο YMDD (τυροσίνη-μεθειονίνη-ασπαρτικό-ασπαρτικό).<sup>43,44</sup> Πιο συγκεκριμένα, η μεθειονίνη (M) αντι-

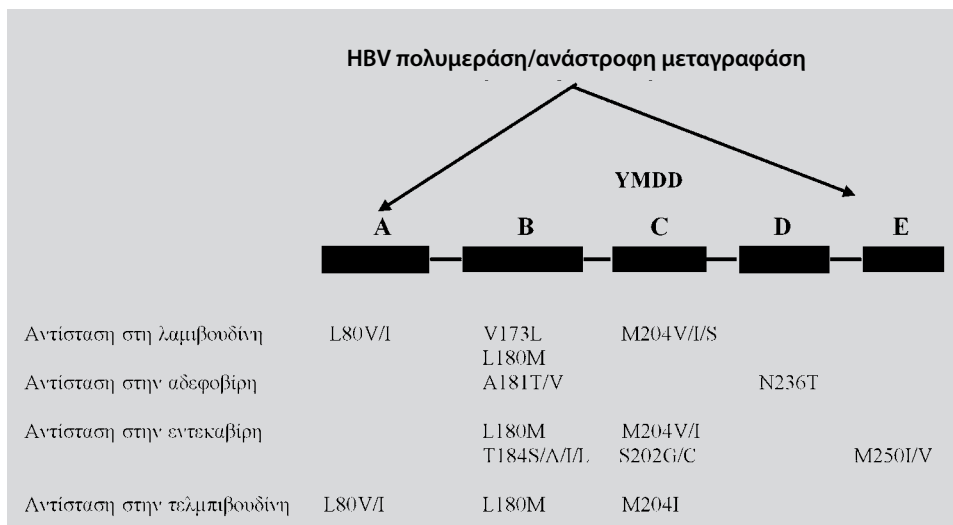
καθίσταται από βαλίνη (V) ή ισολευκίνη (I) στην πολύ καλά διατηρημένη περιοχή YMDD της περιοχής C της πολυμεράσης/ανάστροφης μεταγραφάσης<sup>45</sup> (εικόνες 3, 4). Η M204V συνοδεύεται από την L180M ή την A181T ή την V173L (στην περιοχή B της πολυμεράσης), ενώ η M204I εμφανίζεται μόνη ή σε συνδυασμό με την L80I/V στην περιοχή A της πολυμεράσης<sup>46-48</sup> (εικ. 5). Η ανάδυση των μεταλλαγμένων στελεχών συνοδεύεται από μείωση της δράσης της 3TC κατά 20-100 φορές<sup>49</sup> λόγω στερεοτακτικών μεταβολών της θέσης δράσης του φαρμάκου και γίνεται 2-4 εβδομάδες πριν από τη διαπίστωση της ιολογικής διαφυγής στο αίμα. Τα στελέχη διαφυγής είναι 330, λιγότερο ευαίσθητα από το φυσικό ιό στην 3TC *in vitro* και παρουσιάζουν επτά φορές λιγότερο αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό.<sup>50</sup> Σε ανάδυση μεταλλαγμένων στελεχών, το κλινικό όφελος της θεραπείας χάνεται.<sup>51</sup> Η ανάδυση μεταλλαγμένων στελεχών διαφυγής αυξάνει με την πάροδο του χρόνου (1ος χρόνος: 14%, 2ος: 42%, 3ος: 53%, 4ος:



**Εικόνα 3.** Αναστολή του πολλαπλασιασμού του φυσικού στελέχους του HBV με τη λαμβουδίνη (πηγή: Ντουράκης<sup>2</sup>).



**Εικόνα 4.** Αδυναμία δράσης της λαμβουδίνης μετά από τη μεταλλαγή μεθειονίνης (M) σε βαλίνη (V) στην περιοχή C της πολυμεράσης/ανάστροφης μεταγραφάσης (μοτίβο YMDD) (πηγή: Ντουράκης<sup>2</sup>).



**Εικόνα 5.** Σημειακές μεταλλαγές στις περιοχές του πλαισίου της πολυμεράσης/ανάστροφης μεταγραφάσης του HBV που προσφέρουν αντίσταση στη δράση των νουκλεοσιδικών-νουκλεοτιδικών αναλόγων (πηγή: Liaw et al,<sup>23</sup> τροποποιημένο).

67%, 5ος: 69%)<sup>52-55</sup> (πίν. 1). Οι μεταλλαγές αναπτύσσονται αργότερα (συνήθως >6 μήνες),<sup>56</sup> σε σχέση με εκείνες που παρατηρούνται στη θεραπεία της HIV-λοίμωξης, οι οποίες εμφανίζονται σε λίγες εβδομάδες. Αυτό ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι η περιοχή YMDD επικαλύπτεται από το πλαίσιο ανάγνωσης της πρωτεΐνης επιφανείας του ιού και πολλά από τα μεταλλαγμένα στελέχη δεν επιζούν. Η ανάδυση των στελεχών διαφυγής είναι συχνότερη σε ασθενείς με υψηλά επίπεδα ιαμίας πριν από τη θεραπεία και σε όσους παρουσιάζουν ιαμία >10<sup>3</sup> στους 6 μήνες θεραπείας, ενώ μετά από την οροαναστροφή (απώλεια του HBeAg με ή

χωρίς παραγωγή αντι-HBe) είναι σπάνια. Όσο μεγαλύτερη είναι η καταστολή του ιικού μεταβολισμού τόσο μικρότερη η πιθανότητα ανάδυσης ανθεκτικού στελέχους, αφού το 8% των ασθενών με HBV DNA <10<sup>3</sup> IU/mL στους 6 μήνες της θεραπείας εκδήλωσαν αντίσταση στην 3TC, σε σχέση με το 64% των ασθενών με HBV DNA >10<sup>3</sup> IU/mL την ίδια χρονική στιγμή.<sup>57</sup> Γενικά, σε θεραπεία με 3TC, η μείωση του HBV DNA <10<sup>4</sup> γονιδιώματα/mL στους 6 μήνες υποδηλώνει μειωμένη πιθανότητα ανάδυσης μεταλλαγμένου στελέχους.<sup>58,59</sup> Τα μεταλλαγμένα στελέχη περιορίζονται από το φυσικό ιό, μετά από τη διακοπή της θεραπείας με 3TC. Επαναχορήγηση της 3TC μετά από υποχώρηση της μεταλλαγής είναι επιτυχής μόνο για βραχύ χρονικό διάστημα.<sup>60</sup> Στην περίπτωση αντίστασης στην 3TC, συνιστάται η προσθήκη αδεφοβίρης και όχι η αντικατάστασή της από αυτή.<sup>61</sup> Λόγω της μεγάλης πιθανότητας ανάδυσης μεταλλαγμένου στελέχους με την 3TC, δεν αποτελεί πλέον θεραπεία πρώτης εκλογής της χρόνιας HBV-λοίμωξης.<sup>62</sup>

**Πίνακας 1.** Συχνότητα ανάδυσης μεταλλαγμένων στελεχών με τη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β με αντι-ϊικά φάρμακα.

Πρωτοθεραπευόμενοι ασθενείς	
Λαμβουδίνη	15–30% στον 1ο χρόνο 75% στα 5 χρόνια
Αδεφοβίρη	0% στον 1ο χρόνο 29% στα 4 χρόνια
Εντεκαβίρη	0% στον 1ο χρόνο <1% στα 5 χρόνια
Τελμπιβουδίνη	6–12% μετά από τον 1ο χρόνο 22% σε HBeAg (+) και 9% σε HBeAg (-) στα 2 χρόνια
Ανθεκτικοί στη λαμβουδίνη ασθενείς	
Αδεφοβίρη	20% σε 2 χρόνια με μονοθεραπεία 0% στα 5 χρόνια σε συνδυασμό με λαμβουδίνη
Εντεκαβίρη	1% στον 1ο χρόνο 39% στα 4 χρόνια

## 8. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΑΔΕΦΟΒΙΡΗ

Η αδεφοβίρη (adefovir dipivoxil, Hepsera<sup>®</sup>) είναι νουκλεοτιδικό παράγωγο αδενίνης.<sup>63,64</sup> Είναι δραστική έναντι του φυσικού HBV και των μεταλλαγμένων στελεχών (YMDD) που αναδύονται κατά τη θεραπεία με 3TC.<sup>65,66</sup> Η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών στην περιοχή D της πολυμεράσης (L229W/V, I233V, N236T) ή A181V/T στην περιοχή B και L80I/V στην περιοχή A,<sup>67,68</sup> είναι 0% τον 1ο χρόνο, 2% στα 2 χρόνια και 11% στα 3 χρόνια, 18% στα 4 και 29% στα 5 χρόνια της θεραπείας<sup>69,70</sup> (εικ. 5). Η ανάδυση ανθεκτικών στελεχών έχει κλινική σημασία, παρότι είναι περιορισμένης ικανότητας πολλαπλασιασμού σε σχέση με το φυσικό ιό.<sup>71</sup> Τα στελέχη

αυτά είναι ευαίσθητα στην 3TC.<sup>72,73</sup> Η ανάδυση ανθεκτικών στην αδεφοβίρη είναι συχνότερη (18% στον 1ο χρόνο) σε ασθενείς με προϋπάρχουσα αντίσταση στην 3TC.<sup>74,75</sup> Η πρωτοπαθής αντίσταση στην αδεφοβίρη πιθανόν να έχει κλινική σημασία και απαιτείται ο αποκλεισμός της, με την επιβεβαίωση της μείωσης του ιικού φορτίου (ιαμίας) στους 6 μήνες θεραπείας.<sup>76</sup> Επίπεδα HBV DNA  $\geq 10^3$  IU/mL στους 12 μήνες της θεραπείας αποτελούν προγνωστικό παράγοντα εκδήλωσης αντίστασης στο φάρμακο μετά από τον 3ο χρόνο.<sup>69,70</sup>

## 9. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΕΝΤΕΚΑΒΙΡΗ

Η εντεκαβίρη (entecavir, Baraclude®) είναι ισχυρό αντι-ϊικό νουκλεοσιδικό ανάλογο της γουανοσίνης.<sup>77</sup> Είναι δραστική στο φυσικό και τον ανθεκτικό στην 3TC HBV.<sup>78,79</sup> Χορηγείται σε δόση 0,5 mg και σε ανθεκτικά στην 3TC στελέχη σε δόση 1 mg ημερησίως. Δεν προκαλεί ανάδυση ανθεκτικών στελεχών τα πρώτα 3 χρόνια της χορήγησης, ενώ στα 4 χρόνια το ποσοστό ανάπτυξης αντίστασης σε πρωτοθεραπευόμενους ασθενείς είναι 0,8%<sup>80-83</sup> (πίν. 1). Όμως, όταν η εντεκαβίρη χορηγείται σε ασθενείς με ανθεκτικό στην 3TC στέλεχος, το ποσοστό ανάπτυξης αντοχής στον πρώτο χρόνο είναι 1%, στο δεύτερο 11%, στον τρίτο 27% και στον τέταρτο χρόνο 39%<sup>80-83</sup> (πίν. 1). Εάν οι μεταλλαγές M204V/I L180M που προσφέρουν αντίσταση στην 3TC είναι ήδη παρούσες (προσδίδουν αντίσταση στην 3TC), η χρήση εντεκαβίρης μπορεί να οδηγήσει σε νέες μεταλλαγές (T184S/A/I/L/F/G στην περιοχή B, S202G/I στην περιοχή C ή M250V στην περιοχή D) και ανάδυση ανθεκτικού στελέχους, με αποτέλεσμα την ιολογική υποτροπή (εικ. 5).

## 10. ΑΝΤΙΣΤΑΣΗ ΣΤΗΝ ΤΕΛΜΠΙΒΟΥΔΙΝΗ

Η τελμπιβουδίνη (telbivudine, Sebivo®) είναι ισχυρό αντι-ϊικό νουκλεοσιδικό ανάλογο της θυμιδίνης, που χορηγείται σε δόση των 600 mg ημερησίως.<sup>84</sup> Η μεταλλαγή M204I προσδίδει αντίσταση στην τελμπιβουδίνη, ενώ η M204I ή η M204V στην 3TC. Τα στελέχη του HBV με μία από αυτές τις μεταλλαγές είναι λιγότερο ευαίσθητα στα νουκλεοσιδικά ανάλογα, παραμένοντας όμως ευαίσθητα στα νουκλεοτιδικά ανάλογα (αδεφοβίρη και τενοφοβίρη). Στην αντίσταση στην τελμπιβουδίνη, οι μεταλλαγές L80I/V και L80I/V+L180M συνοδεύουν την M204I σε ποσοστό 2,2% και 0,3%, αντίστοιχα<sup>85</sup> (εικ. 5). Η τελμπιβουδίνη παρουσιάζει αντι-ϊική αντίσταση 6-12% στον πρώτο χρόνο της χορήγησής της και 9% (HBeAg αρνητικοί) έως 22% (HBeAg θετικοί ασθενείς) στο δεύτερο χρόνο (πίν. 1). Η ανάπτυξη ιικής αντίστασης αναμένεται να αυξηθεί περισσότερο στα επόμενα χρόνια. Το χαμηλότερο αυτό ποσοστό πρόκλησης αντίστασης σε σχέση με την 3TC αποδίδεται

στη μεγαλύτερη αντι-ϊική δράση που παρουσιάζει.<sup>86</sup> Η ανάδυση μεταλλαγμένων στελεχών εξαρτάται και στο φάρμακο αυτό από το βαθμό καταστολής της ιαμίας. Έτσι, η μεταλλαγή M204I διαπιστώθηκε στο 6,8% των ασθενών στις 52 εβδομάδες της θεραπείας που έλαβαν τελμπιβουδίνη και παρουσίαζαν επίπεδα HBV DNA >1000 ιικά γονιδιώματα/mL.<sup>86</sup> Σε ασθενείς με HBV DNA <1000 ιικά γονιδιώματα/mL, η πιθανότητα ανάδυσης στελέχους διαφυγής είναι 2% στα δύο χρόνια, ενώ με HBV DNA >1000 ιικά γονιδιώματα/mL ανέρχεται σε 30-60%.

## 11. ΑΛΛΑ ΑΝΑΛΟΓΑ

Η τενοφοβίρη (Viread®), που κυκλοφόρησε το 2008 παρουσιάζει δραστηριότητα στο φυσικό ιό και σε πολλά μεταλλαγμένα στελέχη των άλλων νουκλεοσιδικών-νουκλεοτιδικών αντι-ϊικών φαρμάκων, χωρίς να οδηγεί σε αντίσταση, τουλάχιστον βραχυπρόθεσμα.<sup>87-90</sup>

Η εμπρισιταμπίνη, νουκλεοσιδικό ανάλογο της κυτοσίνης, παρουσιάζει πιθανότητα ανάδυσης ανθεκτικών στελεχών παρόμοια με την 3TC. Ωστόσο, συνιστάται σε ασθενείς με συλλοίμωξη HBV-HIV, αφού σε συνδυασμό με την τενοφοβίρη (δισκία Truvada®) παρουσιάζει ικανοποιητική αντι-ϊική δράση έναντι και των δύο ιών, χωρίς την ανάδυση ανθεκτικών στελεχών.<sup>91</sup>

## 12. ΑΝΤΙΜΕΤΩΠΙΣΗ ΤΗΣ ΙΙΚΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Οι χρησιμοποιούμενες στρατηγικές αντιμετώπισης της ιικής αντίστασης είναι η διακοπή του αντι-ϊικού φαρμάκου και η παρακολούθηση του ασθενούς (ασυνήθης και μόνο σε περιπτώσεις χρόνιας ηπατίτιδας και ποτέ σε κίρρωτικό ασθενή), η αλλαγή ή η προσθήκη άλλου αντι-ϊικού φαρμάκου (συνήθης, ιδίως σε κίρρωτικό ασθενή) με αποφυγή της διασταυρούμενης αντίστασης μεταξύ των φαρμάκων. Γενικά, αποφεύγεται η εναλλαγή των αντι-ϊικών φαρμάκων, αφού η αντικατάσταση ενός αντι-ϊικού φαρμάκου από άλλο προοδευτικά οδηγεί σε ανάδυση πολυανθεκτικών στελεχών.<sup>92-94</sup> Γενικά, ο συνδυασμός νουκλεοσιδικού και νουκλεοτιδικού αναλόγου προλαμβάνει την ανάδυση ανθεκτικών στελεχών.

Οι οδηγίες που συνιστώνται για την αντιμετώπιση της αντίστασης στην 3TC περιλαμβάνουν την αντικατάσταση με εντεκαβίρη (σε δόση του 1 mg ημερησίως) ή την προσθήκη αδεφοβίρης ή τενοφοβίρης.<sup>25,29,39,41,95,96</sup> Ο συνδυασμός 3TC με αδεφοβίρη δεν προκαλεί ανάδυση ανθεκτικών στελεχών, τουλάχιστον στα 5 πρώτα χρόνια της θεραπείας. Η αντικατάσταση της 3TC με εντεκαβίρη συχνά οδηγεί σε ανάδυση ανθεκτικών στελεχών, όπως αναφέρθηκε παραπάνω.<sup>26,29,39,41</sup>

Σε ασθενείς με αντίσταση στην αδεφοβίρη συνιστάται η προσθήκη 3TC με εναλλακτικές επιλογές την προσθήκη τελμπιβουδίνης ή εντεκαβίρης.<sup>25,29,39</sup>

Σε περιπτώσεις αντίστασης στην εντεκαβίρη συνιστάται η προσθήκη αδεφοβίρης ή τενοφοβίρης.<sup>25,29,39</sup>

### 13. ΠΡΟΛΗΨΗ ΤΗΣ ΑΝΤΙΣΤΑΣΗΣ

Η πρόληψη της ανάπτυξης των ανθεκτικών στελεχών γίνεται με το φαρμακευτικό και το γονιδιακό φραγμό. Ο φαρμακευτικός φραγμός αναφέρεται στην επίτευξη της μέγιστης καταστολής του ιικού πολλαπλασιασμού, τη σωστή δοσολογία, τη συμμόρφωση του ασθενούς χωρίς διακοπές της λήψης των φαρμάκων ή άσκοπες αντικαταστάσεις των αντι-ιικών φαρμάκων. Ο γονιδιακός φραγμός αναφέρεται στις απαιτούμενες μεταλλαγές που είναι απαραίτητες για την εκδήλωση της αντίστασης. Οι απλές μεταλλαγές είναι συχνότερες από τις διπλές ή τις τριπλές. Η συνδυασμένη θεραπεία θα πρέπει να γίνεται με φάρμακα που δεν παρουσιάζουν διασταυρούμενη αντίσταση. Δεν έχει γίνει αξιολόγηση των στρατηγικών θεραπείας της *de novo* συνδυασμένης θεραπείας σε σχέση με την προσθήκη, μετά από την ανάπτυξη του ανθεκτικού στελέχους, νέου αντι-ιικού φαρμάκου χωρίς διασταυρούμενη αντίσταση με το αρχικό. Προς το παρόν, δεν συνιστάται η χορήγηση από την αρχή δύο αντι-ιικών φαρμάκων, αλλά η αλλαγή ή η προσθήκη κάποιου μετά από την ανάπτυξη του ανθεκτικού στελέχους. Η συνδυασμένη αγωγή θα μπορούσε να χορηγηθεί μετά από εξατομικευμένη απόφαση του θεράποντος γιατρού σε κίρρωτικούς ασθενείς που δεν είναι δυνατόν να παρακολουθούνται τακτικά με έλεγχο της ιαιμίας. Η απλή παρακολούθηση των τρανσαμινασών δεν αρκεί, αφού μετά από την αύξησή τους η χορήγηση του νέου αντι-ιικού φαρμάκου μπορεί να μην προλάβει να αναστρέψει την παρόξυνση της ηπατοκυτταρικής βλάβης, δεδομένων των περιορισμένων εφεδρειών του κίρρωτικού ήπατος.

Στόχος της αντι-ιικής αγωγής πρέπει να είναι η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη και παρατεταμένη καταστολή του ιικού μεταβολισμού, αφού το γεγονός αυτό συσχετίζεται αρνητικά με την πιθανότητα ανάπτυξης μεταλλαγμένου ανθεκτικού στελέχους (χωρίς ιικό πολλαπλασιασμό δεν υπάρχει ιική αντίσταση). Η αναμενόμενη μείωση της ιαιμίας σε 12 μήνες είναι κατά 5,5 log<sub>10</sub> με την 3TC, 3,5 log<sub>10</sub> με την αδεφοβίρη, 6,9 log<sub>10</sub> με την εντεκαβίρη, 6,5 log<sub>10</sub> με την τελμπιβουδίνη και 6,2 log<sub>10</sub> με την τενοφοβίρη.

Έχουν προταθεί αλγόριθμοι για τη βέλτιστη χρήση του ιικού φορτίου και των μεθόδων αντίστασης για την παρακολούθηση της αποτελεσματικότητας της θεραπείας. Η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικού στελέχους μειώνεται με τη μεγαλύτερη καταστολή του ιικού πολλαπλασιασμού στις 24 εβδομάδες (HBV DNA <1.000–10.000 ιικά γονιδιώματα/mL ή 1.000–2.000 IU/mL).<sup>85,96–99</sup> Προτείνεται η προσθήκη και άλλου αντι-ιικού φαρμάκου για ενίσχυση της αντι-ιικής δράσης μετά από διαπίστωση υπολειμματικής σημαντικής ιαιμίας (>2.000 IU/mL).<sup>100</sup>

### 14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνδυασμοί νουκλεοσιδικών αναλόγων σε μακροχρόνια χορήγηση αποτελούν το μέλλον της θεραπείας της χρόνιας HBV-λοίμωξης, αφού θα μπορούσαν να καθυστερήσουν την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών και θα επέτρεπαν τη μακροχρόνια αντι-ιική θεραπεία. Η επιτάχυνση της ταχείας μείωσης των μολυσμένων ηπατοκυττάρων θεωρητικά είναι δυνατή με τη συγχορήγηση ανοσοτροποποιητικών φαρμάκων (IFN-α) ή με το συνδυασμό δύο ή περισσότερων αντι-ιικών φαρμάκων που θα παρουσίαζαν συνεργική δράση, όπως συμβαίνει στη HIV-λοίμωξη.<sup>101</sup> Όμως, η συνδυασμένη θεραπεία 3TC με IFN-α κλασική<sup>102</sup> ή πεγκυλιωμένη δεν βελτιώνει την ανταπόκριση, ενώ η συγχορήγηση 3TC με αδεφοβίρη δεν βελτιώνει την αντι-ιική δράση, αν και καταργεί την πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικού στελέχους.

### ABSTRACT

#### The problem of viral resistance in chronic hepatitis B therapy

S.P. DOURAKIS

2nd Department of Medicine, Medical School, University of Athens, "Hippokration" General Hospital of Athens, Athens, Greece

Archives of Hellenic Medicine 2009, 26(3):295–306

Available agents for the treatment of chronic HBV infection include interferon-alpha, the nucleoside analogues lamivudine, telbivudine, entecavir and the nucleotide analogue adefovir and tenofovir. When nucleoside-nucleotide analogues are used, patients require a long duration of treatment, especially in HBeAg negative disease, with the potential for developing antiviral resistance, which limits their long-term effectiveness. Interferon-alpha lacks viral



resistance selection. Resistance rates vary by compound. Lamivudine is associated with the development of viral resistance in up to 70% within 5 years, adefovir dipivoxil in 29% after 5 years, entecavir in <1% in naïve patients for up to 4 years (39% in 4 years in lamivudine-resistant patients) and telbivudine in 22% after 2 years of therapy. Clinical consequences of nucleoside-nucleotide resistance include loss of viral response (i.e., a rise in serum HBV DNA), biochemical dysfunction with an increase in aminotransferases, and overt hepatic failure (in patients with more advanced underlying liver disease). The initial choice of antiviral agent should take into consideration both the potency and the incidence of resistance, with serial HBV DNA determination to confirm adequate viral suppression. A suboptimal response to therapy with continued high-level replication identifies a patient at high risk for viral resistance, and is an indication for a change in antiviral strategy. Routine on-treatment monitoring of HBV DNA levels is imperative for detecting virologic breakthrough as early as possible, and for transitioning patients to rescue therapy before biochemical failure and loss of response occurs. For lamivudine resistant HBV infection, adefovir or tenofovir, and for adefovir resistance lamivudine should be added. In conclusion, monitoring for drug resistance during therapy and its prompt management are crucial in managing the antiviral treatment of HBV patients.

**Key words:** Adefovir, Entecavir, Hepatitis B, Hepatitis B virus, Lamivudine, Nucleoside analogues, Nucleotide analogues, Telbivudine, Viral mutants, Viral mutations, Viral resistance

### Βιβλιογραφία

1. ΝΤΟΥΡΑΚΗΣ ΣΠ. Τι νεότερο στις χρόνιες ιογενείς ηπατίτιδες. *Ιατρική* 2005, 87:477–494
2. ΝΤΟΥΡΑΚΗΣ ΣΠ. Θεραπεία ηπατίτιδας Β. Στο: *Κλινική Ηπατολογία*. Εκδόσεις Πασχαλίδη, Αθήνα, 2005:72–81
3. ΝΤΟΥΡΑΚΗΣ ΣΠ. Νεότερα νουκλεοσι(τι)δικά ανάλογα στη θεραπεία της χρόνιας ηπατίτιδας Β. *Ιατρική* 2003, 83:111–123
4. WERLE-LAPOSTOLLE B, BOWDEN S, LOCARNINI S, WURSTHORN K, PETERSEN J, LAU G ET AL. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004, 126:1750–1758
5. WERLE B, CINQUIN K, MARCELLIN P, POL S, MAYNARD M, TRÉPO C ET AL. Evolution of hepatitis B viral load and viral genome sequence during adefovir dipivoxil therapy. *J Viral Hepat* 2004, 11:74–83
6. FOUREL I, CULLEN JM, SAPUTELLI J. Evidence that hepatocyte turnover is required for rapid clearance of duck hepatitis B virus during antiviral therapy of chronically infected ducks. *J Virol* 1994, 68:8321–8330
7. NOWAK MA, BONHOEFFER S, HILL AM, BOEHME R, THOMAS HC, McDADE H. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:4398–4402
8. AIR GM, LAVER WG, WEBSTER RG. Mechanism of antigenic variation in an individual epitope on influenza virus N9 neuraminidase. *J Virol* 1990, 64:5797–5803
9. HOLLINGER FB, LAING TJ. Hepatitis B virus. In: Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Monath TP, Roizman B, Straus SE (eds) *Field's virology*. 4th ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 2000:2971–3036
10. DRYDEN KA, WIELAND SF, WHITTEN-BAUER C, GERIN JL, CHISARI FV, YEAGER M. Native hepatitis B virions and capsids visualized by electron cryomicroscopy. *Mol Cell* 2006, 22:843–850
11. KRUGMAN S. Viral hepatitis: New clinical, epidemiological and immunological concepts. *Calif Med* 1970, 113:57–59
12. DRAKE JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993, 90:4171–4175
13. ORITO E, MIZOKAMI M, INA Y, MORIYAMA EN, KAMESHIMA N, YAMAMOTO M ET AL. Host independent evolution and genetic classification of the hepadnavirus family based on nucleotide sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989, 86:7059–7062
14. OKAMOTO H, IMAI M, KAMETANI M, NAKAMURA T, MAYUMI M. Genomic heterogeneity of hepatitis B virus in a 54-year-old woman who contracted the infection through materno-fetal transmission. *Jpn J Exp Med* 1987, 57:231–236
15. GIRONES R, MILLER R. Mutation rate of the hepadnavirus genome. *Virology* 1989, 170:595–597
16. KANEKO S, MILLER R. Heterogeneity of the core gene sequence in a patient chronically infected with the hepatitis B virus. *J Infect Dis* 1989, 160:903–904
17. BRUNELLE MN, JACQUARD AC, PICHOU D, DURANTEL D, CARROUÉE-DURANTEL S, VILLENEUVE JP ET AL. Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* 2005, 41:1391–1398
18. ZHOU T, SAPUTELLI J, ALDRICH CE, DESLAURIERS M, CONDREAY LD, MASON WS. Emergence of drug-resistant populations of woodchuck hepatitis virus in woodchucks treated with the antiviral nucleoside lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43:1947–1954
19. DURANTEL D, CARROUÉE-DURANTEL S, WERLE-LAPOSTOLLE B, BRUNELLE MN, PICHOU D, TRÉPO C ET AL. A new strategy for studying *in vitro* the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology* 2004, 40:855–864
20. NAFA S, AHMED S, TAVAN D, PICHOU D, BERBY F, STUYVER L ET AL. Early detection of viral resistance by determination of hepatitis B virus polymerase mutations in patients treated by lamivudine for chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000, 32:1078–1088
21. RICHMAN DD. The implications of drug resistance for strategies of combination antiviral chemotherapy. *Antiviral Res* 1996, 29:31–33

22. ONO-NITA SK, KATO N, SHIRATORI Y, MASAKI T, LAN KH, CARRILHO FJ ET AL. YMDD motif in hepatitis B virus DNA polymerase influences on replication and lamivudine resistance: A study by *in vitro* full-length viral DNA transfection. *Hepatology* 1999, 29:939–945
23. LOCARNINI S. Hepatitis B viral resistance: Mechanisms and diagnosis. *J Hepatol* 2003, 39:5124–5132
24. MOMMEJA-MARIN H, MONDOU E, BLUM MR, ROUSSEAU F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: Analysis and review of the literature. *Hepatology* 2003, 37:1309–1319
25. LOK AS. A practical guide to management of patients with antiviral drug-resistant HBV. Clinical care options. Annual hepatitis update 2007. Available at: <http://clinicaloptions.com/Hepatitis/Annual%20Updates/2007%20Annual%20Update/Modules/Lok/Pages/Page%201.aspx>
26. ZHANG YY, SUMMERS J. Low dynamic state of viral competition in a chronic avian hepadnavirus infection. *J Virol* 2000, 74:5257–5265
27. PALLIER C, CASTÉRA L, SOULIER A, HÉZODE C, NORDMANN P, DHUMEAUX D ET AL. Dynamics of hepatitis B virus resistance to lamivudine. *J Virol* 2006, 80:643–653
28. LIAW YF, SUNG JJ, CHOW WC, FARRELL G, LEE CZ, YUEN H ET AL. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004, 351:1521–1531
29. LOK AS, McMAHON BJ. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2007, 45:507–539
30. LIAW YF, CHIEN RN, YEH CT. No benefit to continue lamivudine therapy after emergence of YMDD mutations. *Antivir Ther* 2004, 9:257–262
31. LOK AS, LAI CL, LEUNG N, YAO GB, CUI ZY, SCHIFF ER ET AL. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2003, 125:1714–1722
32. LIAW YF. Hepatitis B virus replication and liver disease progression: The impact of antiviral therapy. *Antivir Ther* 2006, 11:669–679
33. BARTHOLOMEUSZ A, LOCARNINI SA. Antiviral drug resistance: Clinical consequences and molecular aspects. *Semin Liver Dis* 2006, 26:162–170
34. ZOULIM F. Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res* 2004, 64:1–15
35. LOK AS, ZOULIM F, LOCARNINI S, MANGIA A, NIRO G, DECRAEMER H ET AL. Monitoring drug resistance in chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patients during lamivudine therapy: Evaluation of performance of INNO-LiPA HBV DR assay. *J Clin Microbiol* 2002, 40:3729–3734
36. STUYVER L, VAN GEYT C, DE GENDT S, VAN REYBROECK G, ZOULIM F, LEROUX-ROELS G ET AL. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J Clin Microbiol* 2000, 38:702–707
37. ALLEN MI, GAUTHIER J, DES LAURIERS M, BOURNE EJ, CARRICK KM, BALDANTI F ET AL. Two sensitive PCR-based methods for detection of hepatitis B virus variants associated with reduced susceptibility to lamivudine. *J Clin Microbiol* 1999, 37:3338–3347
38. HONG SP, KIM NK, HWANG SG, CHUNG HJ, KIM S, HAN JH ET AL. Detection of hepatitis B virus YMDD variants using mass spectrometric analysis of oligonucleotide fragments. *J Hepatol* 2004, 40:837–844
39. LOK AS, ZOULIM F, LOCARNINI S, BARTHOLOMEUSZ A, GHANY MG, PAWLOTSKY JM ET AL. Antiviral drug-resistant HBV: Standardization of nomenclature and assays and recommendations for management. *Hepatology* 2007, 46:254–265
40. KIM HS, HAN KH, AHN SH, KIM EO, CHANG HY, MOON MS ET AL. Evaluation of methods for monitoring drug resistance in chronic hepatitis B patients during lamivudine therapy based on mass spectrometry and reverse hybridization. *Antivir Ther* 2005, 10:441–449
41. LOCARNINI S, HATZAKIS A, HEATHCOTE J, KEEFFE EB, LIANG TJ, MUTIMER D ET AL. Management of antiviral resistance in patients with chronic hepatitis B. *Antivir Ther* 2004, 9:679–693
42. TENNEY DJ, LEVINE SM, ROSE RE, WALSH AW, WEINHEIMER SP, DISCOTTO L ET AL. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother* 2004, 48:3498–3507
43. TIPPLES GA, MA MM, FISCHER KP, BAIN VG, KNETEMAN NM, TYRRELL DL. Mutation in HBV RNA-dependent DNA polymerase confers resistance to lamivudine *in vivo*. *Hepatology* 1996, 24:714–717
44. LING R, MUTIMER D, AHMED M, BOXALL EH, ELIAS E, DUSHEIKO GM ET AL. Selection of mutations in the hepatitis B virus polymerase during therapy of transplant recipients with lamivudine. *Hepatology* 1996, 24:711–713
45. ALLEN MI, DESLAURIERS M, ANDREWS CW, TIPPLES GA, WALTERS KA, TYRRELL DL ET AL. Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology* 1998, 27:1670–1677
46. BOZDAYI AM, UZUNALIMOGLU O, TURKYILMAZ AR, ASLAN N, SEZGIN O, SAHINT ET AL. YSDD: A novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J Viral Hepat* 2003, 10:256–265
47. WARNER N, LOCARNINI S, KUIPER M, BARTHOLOMEUSZ A, AYRES A, YUEN L ET AL. The rtL80I substitution in the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 16:2285–2292
48. YEH CT, CHIEN RN, CHU CM, LIAW YF. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2000, 31:1318–1326
49. FISCHER KP, TYRRELL DLJ. Generation of duck hepatitis B virus polymerase mutants through site-directed mutagenesis which demonstrate resistance to lamivudine *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40:1957–1960
50. DELANEY WE, YANG H, WESTLAND CE, DAS K, ARNOLD E, GIBBS CS ET AL. The hepatitis B virus polymerase mutation rtV173L is selected during lamivudine therapy and enhances viral replication *in vitro*. *J Virol* 2003, 77:11833–11841
51. LIAW YF, SUNG JJ, CHOW WC, FARRELL G, LEE CZ, YUEN H ET AL. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced

- liver disease. *N Engl J Med* 2004, 351:1521–1531
52. LAU GK, PIRATVISUTH T, LUO KX, MARCELLIN P, THONGSAWAT S, COOKSLEY G ET AL. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005, 352:2682–2695
  53. HOOFNAGLE JH, DOO E, LIANG TJ, FLEISCHER R, LOK AS. Management of hepatitis B: Summary of a clinical research workshop. *Hepatology* 2007, 45:1056–1075
  54. MARCELLIN P, LAU GK, BONINO F, FARCI P, HADZIYANNIS S, JIN R ET AL. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2004, 351:1206–1217
  55. LAI CL, DIENSTAG J, SCHIFF E, LEUNG NW, ATKINS M, HUNT C ET AL. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis* 2003, 36:687–696
  56. CHAYAMA K, SUZUKI Y, KOBOYASHI M, KOBAYASHI M, TSUBOTA A, HASHIMOTO M ET AL. Emergence and takeover of YMDD motif mutant hepatitis B virus during long-term lamivudine therapy and re-takeover by wild type after cessation of therapy. *Hepatology* 1998, 27:1711–1716
  57. YUEN MF, SABLON E, HUI CK, YUAN HJ, DECRAEMER H, LAI CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001, 34:785–791
  58. DIENSTAG JL, SCHIFF ER, WRIGHT TL, PERRILLO RP, HANN HW, GOODMAN Z ET AL. Lamivudine as initial treatment for chronic hepatitis B in the United States. *N Engl J Med* 1999, 341:1256–1263
  59. LAI CL, CHIEN RN, LEUNG NW, CHANG TT, GUAN R, TAI DI ET AL. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia hepatitis lamivudine study group. *N Engl J Med* 1998, 339:61–68
  60. MARZANO A, DEBERNARDI-VENON W, CONDREAY L, RIZZETO M. Efficacy of lamivudine re-treatment in a patient with hepatitis B virus (HBV) recurrence after liver transplantation and HBV-DNA breakthrough during the first treatment. *Transplantation* 1998, 65:1615–1621
  61. SCHIFF E, LAI CL, HADZIYANNIS S, NEUHAUS P, TERRAULT N, COLOMBO M ET AL. Adefovir dipivoxil for wait-listed and post-liver transplantation patients with lamivudine-resistant hepatitis B: Final long-term results. *Liver Transpl* 2007, 13:349–360
  62. KEEFFE EB, DIETERICH DT, HAN SH, JACOBSON IM, MARTIN P, SCHIFF ER ET AL. A treatment algorithm for the management of chronic hepatitis B virus infection in the United States. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004, 2:87–106
  63. MARCELLIN P, CHANG TT, LIM SG, TONG MJ, SIEVERT W, SHIFFMAN ML ET AL. Adefovir dipivoxil for the treatment of HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003, 348:808–816
  64. HADZIYANNIS SJ, TASSOPOULOS NC, HEATHCOTE EJ, CHANG TT, KITIS G, RIZZETTO M ET AL. Adefovir dipivoxil for the treatment of patients with hepatitis Be antigen-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2003, 348:800–807
  65. SCHIFF ER, LAI CL, HADZIYANNIS S, NEUHAUS P, TERRAULT N, COLOMBO M ET AL. Adefovir dipivoxil therapy for lamivudine-resistant hepatitis B in pre- and post-liver transplantation patients. *Hepatology* 2003, 38:1419–1427
  66. LAMPERTICO P, VIGANO M, MANENTI E, IAVARONE M, LUNGHI G, COLOMBO M. Adefovir rapidly suppresses hepatitis B in HBeAg-negative patients developing genotypic resistance to lamivudine. *Hepatology* 2005, 42:1414–1419
  67. ANGUS P, VAUGHAN R, XIONG S, YANG H, DELANEY W, GIBBS C ET AL. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* 2003, 125:292–297
  68. LACOMBE K, OLLIVET A, GOZLAN J, DURANTEL S, TRAN N, GIRARD PM ET AL. A novel hepatitis B virus mutation with resistance to adefovir but not to tenofovir in a HIV-hepatitis B virus-co-infected patient. *AIDS* 2006, 20:2229–2231
  69. HADZIYANNIS SJ, TASSOPOULOS NC, HEATHCOTE EJ, CHANG TT, KITIS G, RIZZETTO M ET AL. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005, 352:2673–2681
  70. HADZIYANNIS SJ, TASSOPOULOS NC, HEATHCOTE EJ, CHANG TT, KITIS G, RIZZETTO M ET AL. Long-term therapy with adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B for up to 5 years. *Gastroenterology* 2006, 131:1743–1751
  71. FUNG SK, ANDREONE P, HAN SH, RAJENDER REDDY K, REGEV A, KEFFE EB ET AL. Adefovir-resistant hepatitis B can be associated with viral rebound and hepatic decompensation. *J Hepatol* 2005, 43:937–943
  72. LIAW YF, LEUNG N, GUAN R, LAU GK, MERICAN I, ASIAN-PACIFIC CONSENSUS WORKING PARTIES ON HEPATITIS B. Asian Pacific consensus statement on the management of chronic hepatitis B: An update. *J Gastroenterol Hepatol* 2003, 18:239–245
  73. PROCEEDINGS OF THE EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER (EASL). International Consensus Conference on Hepatitis B, 2002, Geneva, Switzerland. *J Hepatol* 2003, 39(Suppl 1):S1–S235 and *J Hepatol* 2003, 38:533–540
  74. LEE YS, SUH DJ, LIM YS, JUNG SW, KIM KM, LEE HC ET AL. Increased risk of adefovir resistance in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B after 48 weeks of adefovir dipivoxil monotherapy. *Hepatology* 2006, 43:1385–1391
  75. FUNG SK, CHAE HB, FONTANA RJ, CONJEEVARAM H, MARRERO J, OBERHELMAN K ET AL. Virologic response and resistance to adefovir in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2006, 44:283–290
  76. SCHILDGEN O, SIRMA H, FUNK A, OLOTU C, WEND UC, HARTMANN H ET AL. Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N Engl J Med* 2006, 354:1807–1812
  77. LANGLEY DR, WALSH AW, BALDICK CJ, EGGERS BJ, ROSE RE, LEVINE SM ET AL. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. *J Virol* 2007, 81:3992–4001
  78. CHANG TT, GISH RG, DE MAN R, GADANO A, SOLLANO J, CHAO YC ET AL. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006, 354:1001–1010
  79. LAI CL, SHOVAL D, LOK AS, CHANG TT, CHEINQUER H, GOODMAN Z ET AL. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2006, 354:1011–1020
  80. COLONNO RJ, ROSE RE, POKORNOWSKI K, BALDICK CJ, KLESCZEWSKI K, TENNEY DJ. Assessment at three years shows high barrier to resistance that is maintained in entecavir-treated nucleoside naïve patients while resistance emergence increases over time in lamivudine refractory patients. *Hepatology* 2006, 44(Suppl 1):229A–230A

81. TENNEY DJ, ROSE RE, BALDICK CJ, LEVINE SM, POKORNOWSKI KA, WALSH AW ET AL. Two-year assessment of entecavir resistance in lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51:902–911
82. COLONNO RJ, ROSE RE, POKORNOWSKI K, BALDICK CJ, EGGERS B, XU D ET AL. Four year assessment of ETV resistance in nucleoside-naïve and lamivudine refractory patients. Program and abstracts of the 42nd Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Barcelona, Spain, 2007, Abstract 781
83. GISH RG, LOK AS, CHANG TT, DE MAN RA, GADANO A, SOLLANO J ET AL. Entecavir therapy for up to 96 weeks in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2007, 133:1437–1444
84. KEAM SJ. Telbivudine. *Drugs* 2007, 67:1917–1929
85. LAI CL, LEUNG N, TEO EK, TONG M, WONG F, HANN HW ET AL. A 1-year trial of telbivudine, lamivudine, and the combination in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 2005, 129:528–536
86. LAI CL, GANE E, LIAW YF, HSU CW, THONGSAWAT S, WANG Y ET AL. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2007, 357:2576–2588
87. WONG SN, LOK AS. Tenofovir disoproxil fumarate: Role in hepatitis B treatment. *Hepatology* 2006, 44:309–313
88. MARCELLIN P, BUTI M, KRASTEV Z, GERMANIDIS G, KAITA K, KOTZEV I ET AL. A randomized, double-blind, comparison of tenofovir DF (TDF) versus adefovir dipivoxil (ADV) for the treatment of HBeAg-negative chronic hepatitis B (CHB): Study GS-US-174-0102. Program and abstracts of the 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, Massachusetts, 2007, Abstract LB2
89. VAN BOMMEL F, ZOLLNER B, SARRAZIN C, SPENGLER U, HÜPPE D, MÖLLER B ET AL. Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) infection and high HBV DNA level during adefovir therapy. *Hepatology* 2006, 44:318–325
90. HEATHCOTE E, GANE E, DeMAN R, LEE S, FLISIAK R, MANNS M ET AL. A randomized, double-blind, comparison of tenofovir DF (TDF) versus adefovir dipivoxil (ADV) for the treatment of HBeAg positive chronic hepatitis B (CHB): Study GS-US-174-0103. Program and abstracts of the 58th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases, Boston, Massachusetts, 2007, Abstract LB6
91. LIM SG, NG TM, KUNG N, KRASTEV Z, VOLFOVA M, HUSA P ET AL. A double-blind placebo-controlled study of emtricitabine in chronic hepatitis B. *Arch Intern Med* 2006, 166:49–56
92. YIM HJ, HUSSAIN M, LIU Y, WONG SN, FUNG SK, LOK AS. Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology* 2006, 44:703–712
93. MUTIMER D, PILLAY D, COOK P, RATCLIFFE D, O'DONNELL K, DOWLING D ET AL. Selection of multiresistant hepatitis B virus during sequential nucleoside-analogue therapy. *J Infect Dis* 2000, 181:713–716
94. VILLET S, PICHOU D, VILLENEUVE JP, TREPO C, ZOULIM F. Selection of a multiple drug-resistant hepatitis B virus strain in a liver-transplanted patient. *Gastroenterology* 2006, 131:1253–1261
95. DOO E, LIANG TJ. Molecular anatomy and pathophysiologic implications of drug resistance in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 2001, 120:1000–1008
96. LOCARNINI S. Molecular virology and the development of resistant mutants: Implications for therapy. *Semin Liver Dis* 2005, 25:9–19
97. GAUTHIER J, BOURNE EJ, LUTZ MW, CROWTHER LM, DIENSTAG JL, BROWN NA ET AL. Quantitation of hepatitis B viremia and emergence of YMDD variants in patients with chronic hepatitis B treated with lamivudine. *J Infect Dis* 1999, 180:1757–1762
98. YUEN MF, SABLON E, HUI CK, YUAN HJ, DECRAEMER H, LAI CL. Factors associated with hepatitis B virus DNA breakthrough in patients receiving prolonged lamivudine therapy. *Hepatology* 2001, 34:785–791
99. MOMMEJA-MARIN H, MONDOU E, BLUM MR, ROUSSEAU F. Serum HBV DNA as a marker of efficacy during therapy for chronic HBV infection: Analysis and review of the literature. *Hepatology* 2003, 37:1309–1319
100. KEEFFE EB, ZEUZEM S, KOFF RS, DIETERICH DT, ESTEBAN-MUR R, GANE EJ ET AL. Report of an international workshop: Roadmap for management of patients receiving oral therapy for chronic hepatitis B. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007, 5:890–897
101. COREY L, HOLMES KK. Therapy for human immunodeficiency virus infection – what have we learned? *N Engl J Med* 1996, 335:1142–1144
102. MUTIMER D, NAOUMOV N, HONKOOP P, MARINOS G, AHMED M, DeMAN R ET AL. Combination alpha-interferon and lamivudine therapy for alpha-interferon-resistant chronic hepatitis B infection: Results of a pilot study. *J Hepatol* 1998, 28:923–929

*Corresponding author:*

S.P. Dourakis, 28 Achaïas street, GR-115 23 Athens, Greece  
e-mail: spdour@med.uoa.gr