

**Untersuchung der Dynamik von Resistenzvarianten des Hepatitis-B-Virus unter
Drittlinientherapie mit Tenofovir mittels Tiefenpyrosequenzierung bei Patienten
mit chronischer Hepatitis-B-Virusinfektion mit Schwerpunkt auf den Adefovir-
Resistenzvarianten und Verlauf der HBV-Quasispezies**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

Eingereicht von: Friederike Bock

Geburtsdatum/ Geburtsort: 16.07.1983, Berlin

Angefertigt am:

- Universitätsklinikum Leipzig AöR, Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Sektion Hepatologie und an der
- Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie (einschließlich Arbeitsbereich Stoffwechselerkrankungen)

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Berg und Dr. med. Florian van Bömmel

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom:

21.03.2017

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	2
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	5
TABELLENVERZEICHNIS	6
1 BIBLIOGRAPHISCHE ZUSAMMENFASSUNG	8
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
2 EINFÜHRUNG	10
2.1 Epidemiologie der chronischen Hepatitis-B-Virusinfektion	10
2.2 Aufbau, Replikation und Resistenzentwicklung des Hepatitis-B-Virusgenoms	10
2.3 Antivirale Therapie	13
2.4 Sequenziermethoden	14
3 AUFGABENSTELLUNG	15
4 MATERIAL UND METHODE	16
4.1 Studiendesign und Beschreibung der Kohorte	16
4.2 Evaluation der TDF-Monotherapie und Resistenzanalyse	17
4.3 Statistische Auswertung	18
4.4 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	18
4.5 Puffer	22
4.6 Geräte	22
4.7 Durchführung der Laborarbeiten	24
4.8 HBV-DNA Quantifizierung und Bestimmung biochemischer Parameter	24

4.9	Extraktion von Nukleinsäuren aus Serumproben	24
4.10	Tiefenpyrosequenzierung mittels <i>Genome Sequencer FLX System</i> (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT)	25
4.10.1	GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i>	25
4.10.2	GS FLX Emulsions-PCR	31
4.10.3	GS FLX Sequenzierung	37
4.10.4	GS FLX Datenauswertung	41
4.11	Direkte Sequenzierung mittels <i>TRUGENE™ HBV Genotyping Kit (OpenGene™ DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostic, USA)</i>	42
4.11.1	PCR-Amplifikation	42
4.11.2	<i>CLIP</i> -Amplifikations-Reaktion	42
4.11.3	Genotyp-und Variantenanalyse	44
4.12	Sequenzierung mittels <i>Line Probe Assay INNO-LiPa HBV DRv2 und v3</i> (Innogenetics, Belgium)	44
4.12.1	HBV-DNA Amplifikation	45
4.12.2	Denaturierung und Hybridisierung	46
4.12.3	Farbentwicklung	46
5	ERGEBNISSE	47
5.1	Patientencharakteristika zur Baseline	47
5.2	Virologisches Ansprechen	48
5.3	Biochemisches Ansprechen	49
5.4	Serologisches Ansprechen	50
5.5	Therapie-Adhärenz und medikamentöse Verträglichkeit	50
5.6	Ergebnisse der Tiefenpyrosequenzierung mit <i>Genome Sequencer FLX System</i> (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT)	50
5.6.1	Verschiedene Einzelverläufe der NA-Resistenzvarianten	55
5.6.2	Kombiniert oder isoliert auftretenden NA-Resistenzvarianten	57
5.6.3	Entwicklung der ADV-Resistenzvarianten	62

5.6.4	Entwicklung der LAM-Resistenzvarianten _____	66
5.6.5	Entwicklung der ETV-Resistenzvarianten _____	68
5.6.6	<i>Shift</i> der NA-Resistenzvarianten und Auswirkung auf die Dynamik der HBV-DNA _____	70
5.6.7	Entwicklung der potentiellen NA-Resistenzvarianten _____	72
5.6.8	Entwicklung der HBsAg-Varianten _____	75
5.6.9	Entwicklung der HBV-Quasispezies _____	77
5.7	Ergebnisse der direkten Sequenzierung mit <i>TRUGENE™ HBV Genotyping Kit (OpenGene™ DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostic, USA)</i> _____	80
5.8	Ergebnisse des <i>Line Probe Assays</i> mit <i>INNO-LiPa HBV DRv2 und v3</i> (Innogenetics, Belgium) _____	81
5.9	Vergleich der Sequenziermethoden _____	81
6	DISKUSSION _____	83
6.1	Patientenkohorte und Ansprechen auf die TDF-Monotherapie _____	83
6.2	Entwicklung und Einfluss der ADV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie _____	84
6.3	Entwicklung und Einfluss der LAM-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie _____	90
6.4	Entwicklung und Einfluss der ETV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie _____	92
6.5	Entwicklung und Einfluss der HBV-Wildtyp-Varianten unter TDF-Monotherapie _____	93
6.6	Entwicklung und Einfluss der potentiellen NA-Resistenzvarianten _____	94
6.7	Entwicklung und Einfluss der HBsAg-Varianten _____	96
6.8	Einfluss von multiplen Vortherapien unter TDF-Monotherapie _____	98
6.9	Entwicklung und Einfluss der HBV-DNA-Serumkonzentration _____	98
6.10	Entwicklung und Einfluss von HBV-Quasispezies unter TDF-Monotherapie _____	100
6.11	Vergleich der Sequenziermethoden _____	101
7	ZUSAMMENFASSUNG DER ARBEIT _____	106
8	LITERATURVERZEICHNIS _____	109

9 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	114
10 CURRICULUM VITAE	
11 ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	115
12 DANKSAGUNG	116

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Organisation des HBV-Polymerase- und <i>Surface</i> -Gens	12
Abbildung 2: Korrespondierende Varianten der Reversen Transkriptase und des HBsAg	12
Abbildung 3: Chemische Strukturformel von ADV und TDF	14
Abbildung 4: Lokalisation der GS FLX HBV-DNA- <i>Libraryprimer</i> PCR-I/II und NA-Resistenzvarianten der RT	26
Abbildung 5: GS FLX HBV-DNA Amplifikat	28
Abbildung 6: GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> PCR-II Amplifikationskontrolle	31
Abbildung 7: GS FLX Emulsions-PCR	32
Abbildung 8: GS FLX Tiefenpyrosequenzierung	38
Abbildung 9: Reverse Hybridisierung mittels INNO-LiPa	44
Abbildung 10: Amplifikations-Produkt der INNO-LiPa PCR	45
Abbildung 11: Medianer HBV-DNA und ALT Verlauf der Gesamtkohorte	49
Abbildung 12: Prozentualer Anteil der ADV-, LAM- und ETV-Resistenzvarianten	51
Abbildung 13: Patientenspezifische Darstellung des serologischen, biochemischen Verlaufs und Veränderungen des HBV-Genoms vor und während der TDF-Monotherapie	61
Abbildung 14: Medianer HBV-DNA Verlauf in Abhängigkeit der zum EP nachgewiesenen NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie	71
Abbildung 15: HBV-DNA Einzelverläufe in Abhängigkeit der zum EP nachgewiesenen NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie	71
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der HBV-Quasispezies zur BL bzw. EP der TDF-Monotherapie	79
Abbildung 17: Entwicklung der HBV-Quasispezies unter TDF-Monotherapie	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien	19
Tabelle 2: Reagenzien	20
Tabelle 3: Geräte	22
Tabelle 4: Primer für GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-I	27
Tabelle 5: Primer für GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-II	27
Tabelle 6: Verwendete Multiplex-Identifizierungs-Adapter	28
Tabelle 7: Zusammensetzung des MM der GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-I	29
Tabelle 8: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-I	29
Tabelle 9: Zusammensetzung des MM der GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-II	29
Tabelle 10: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-II F2/R2	30
Tabelle 11: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA- <i>Library</i> , PCR-II F3/R3	30
Tabelle 12: Zusammensetzung des Amplifikations-Mix	33
Tabelle 13: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX emPCR	34
Tabelle 14: Dauer und Reaktionstemperaturen der Anlagerung des Sequenzierungsprimers	37
Tabelle 15: Zusammensetzung des DNA- <i>Bead</i> Inkubations-Mix	39
Tabelle 16: Zusammensetzung des MM der TG-PCR	42
Tabelle 17: Dauer und Reaktionstemperaturen der TG-PCR	42
Tabelle 18: Zusammensetzung des MM der <i>CLIP</i> -Reaktion	43
Tabelle 19: Dauer und Reaktionstemperaturen der <i>CLIP</i> -Reaktion	43
Tabelle 20: Parameter der TG-Sequenzierung	44
Tabelle 21: Zusammensetzung des MM der INNO-LiPa-PCR	45
Tabelle 22: Dauer und Reaktionstemperaturen INNO-LiPa	45
Tabelle 23: Charakteristika der 18 chronisch HBV-infizierten Patienten zu Beginn der TDF-Monotherapie	48
Tabelle 24: HBV-DNA Einzelverläufe über die Dauer der TDF-Monotherapie	49
Tabelle 25: Anteil der HBV NA-Resistenzvarianten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten vor bzw. während antiviraler Behandlung mit TDF	53

Tabelle 26: HBV-Wildtyp zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie	56
Tabelle 27: ADV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie	64
Tabelle 28: LAM-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie	67
Tabelle 29: ETV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie	69
Tabelle 30: Anteil der potentiellen HBV NA-Resistenzvarianten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten vor bzw. während antiviraler Behandlung mit TDF	73
Tabelle 31: Anteil der HBsAg-Varianten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten vor bzw. während antiviraler Behandlung mit TDF	76

1 Bibliographische Zusammenfassung

Bock, Friederike

Titel der Arbeit

Untersuchung der Dynamik von Resistenzvarianten des Hepatitis-B-Virus unter Drittlinientherapie mit Tenofovir mittels Tiefenpyrosequenzierung bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virusinfektion mit Schwerpunkt auf den Adefovir-Resistenzvarianten und Verlauf der HBV-Quasispezies.

Universität Leipzig, Dissertation

117 S., 95 Lit., 17 Abb., 31 Tab.

Referat:

Eine Monotherapie mit Tenofovir disoproxil fumarate (TDF) stellt eine hoch effiziente Therapieoption für multipel vorbehandelte Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virusinfektion (HBV) dar. Eine Resistenz gegen TDF wurde bislang nicht beschrieben, jedoch wird ein möglicher negativer Einfluss von Adefovir dipivoxil (ADV)-Resistenzvarianten auf die TDF-Ansprechrates diskutiert. Diese retrospektive Kohortenstudie untersucht die Dynamik von Nukleos(t)id-Analoga (NA)-Resistenzvarianten im HBV-Polymerasegen mit Fokus auf ADV-Resistenzvarianten bei 18 chronisch HBV-infizierten Patienten mit Therapieversagen auf eine vorangegangene Lamivudin (LAM)- und ADV-Therapie, sowie nur partiellem Therapieansprechen auf eine TDF-Monotherapie. Zur Detektion von NA-Resistenzvarianten wird eine HBV-Genomsequenzierung mit Tiefenpyrosequenzierung (*Genome Sequencer FLX*, Roche Diagnostics, Germany) (UDPS), direkte Sequenzierung (*TRUGENETM HBV Genotyping Kit*, *OpenGeneTM DNA Sequencing System*, Siemens Healthcare Diagnostic, USA) (TG) und *Line Probe Assay* (INNO-LiPa DRv2 und v3, Innogenetics, Belgium) (INNO-LiPA) durchgeführt. Unter TDF kommt es zu einer quantitativen *Shift* zugunsten der ADV-Resistenzvarianten mit konstant bleibendem Anteil und deutlich höher persistierender Virämie zu Monat 12 im Vergleich zu Patienten ohne ADV-Resistenzvarianten. Vor allem werden die Varianten rtA181V und rtN236T selektiert, jedoch nicht die Variante rtA181T. Die absolute Anzahl der LAM-Resistenzvarianten hingegen halbiert sich. Varianten mit einem initial per UDPS detektierten Anteil von >20% der patientenspezifischen HBV-Population werden meist selektiert und nehmen im Verlauf den Hauptanteil der Quasispezies ein. UDPS stellte ein potentes Medium der Detektion, Identifikation und Quantifizierung von HBV-Varianten dar und ist INNO-LiPa und TG überlegen. Es ergibt sich kein Hinweis auf TDF-Resistenzvarianten, jedoch zeigt das Vorliegen von ADV-Resistenzvarianten einen tendentiell negativen Einfluss auf die virale Kinetik. Weitere größere Langzeitstudien sind zur Bestätigung dieser Beobachtung notwendig.

Abkürzungsverzeichnis

a.a.	Aminosäurenposition
ADV	Adefovir dipivoxil
ALT	Alanin-Aminotransferase
BL	<i>Baseline</i>
bp	Basenpaare
cccDNA	<i>covalently closed circular DNA</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
emPCR	Emulsions-Polymerase-Kettenreaktion
EP	Endpunkt
ETV	Entecavir
HBcAg	<i>Hepatitis B core antigen</i>
HBeAg	<i>Hepatitis B e antigen</i>
HBsAg	<i>Hepatitis B surface antigen</i>
HBV	Hepatitis-B-Virus
HBx	X-Protein
IFN	Interferon
Key	Schlüsselsequenz
LAM	Lamivudin
LdT	Telbivudin
INNO-LiPa	<i>INNOGENETICS Line Probe Assay</i>
MgSo ₄	Magensiumsulfat
MM	Mastermix
MID	Multiplex Identifizierungsadaptor
min	Minute
Mo	Monat
NA	Nukleos(t)id-Analoga
negK	Negativkontrolle
na	Nicht amplifizierbar
nk	Nukleotid
nv	Nicht vorhanden
ORF	<i>open reading frame (offener Leserahmen)</i>
oz	<i>ounce</i>

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
preC-C	<i>precore-core</i>
preS-S	<i>Presurface-Surface</i>
POL	Polymerase
RP	Rückwärtsprimer
RNase H	Ribonuklease H
RNA	Ribonukleinsäure
RT/ rt	Reverse Transkriptase/ Reverse Transkriptase-Position
s	Sekunden
S-Gen	<i>Surface-Gen</i>
SD	Standardabweichung
TDF	Tenofovir disoproxil fumarat
TG	TRUGENE™
UDPS	<i>Ultra-deep pyrosequencing</i> (Tiefenpyrosequenzierung)
ULN	<i>Upper level over normal</i>
VP	Vorwärtsprimer
WT	Wildtyp

2 Einführung

2.1 Epidemiologie der chronischen Hepatitis-B-Virusinfektion

HBV ist ein hepatotropes Virus der Familie der Hepadnaviren, dessen Genom aus zirkulär-geschlossener, partiell doppelsträngiger Desoxyribonukleinsäure (DNA) besteht. Eine chronische HBV-Infektion stellt global die führende Ursache für Leberzirrhose, Leberversagen und hepatozelluläres Karzinom dar¹. Ca. 240 Millionen Menschen weltweit leiden an einer chronischen HBV-Infektion². WHO-Schätzungen zufolge versterben jährlich ca. 780.000 Menschen/Jahr an den Spätfolgen und Komplikationen der chronischen HBV-Infektion³.

2.2 Aufbau, Replikation und Resistenzentwicklung des Hepatitis-B-Virusgenoms

Obwohl HBV ein DNA-Virus ist, findet die Replikation über ein Ribonukleinsäure (RNA)-Intermediat mittels Reverser Transkriptase (RT) mit raschem Turnover von $>10^{11}$ Virionen/Tag statt^{4,5}. HBV weist eine hohe Mutationsrate von $>10^{-5}$ Nukleotid-Substitutionen/Position/Jahr auf und die HBV-Gesamtpopulation eines Infizierten setzt sich hieraus folgend zu jedem Zeitpunkt aus einer Quasispezies zusammen, die aus allen replikationsfähigen HBV-Varianten besteht^{6,7}. Dies führt zu einer Anfälligkeit für Resistenzausbildung. Zur Beschreibung der Dynamik der Quasispezies-Population erfolgt in dieser Studie die Einteilung anhand ihres per UDPS detek-

tierten quantitativen Prävalenzanteils an der patientenspezifischen HBV-Population. Dies erfolgt anlehnend an die in der Literatur beschriebenen Detektionsgrenzen der verschiedenen Sequenzierverfahren (UDPS, *Line Probe Assay* und direkte Sequenzierung) in Minorvarianten (Prävalenzanteil <5 %), intermediäre Varianten (Prävalenzanteil 5-20 %) und dominante Varianten (Prävalenzanteil >20 %) ^{12,34,35}.

Interessant für die Resistenzausbildung ist, dass das HBV-Genom in vier sich zum Teil überlappenden **offenen Leserahmen** (*open reading frame*, ORF) organisiert ist und alle Nukleotide (nk) des viralen Genoms eine kodierende Funktion in mindestens einem ORF besitzen¹. Somit kann eine Mutation auf mehrere Genfunktionen Auswirkungen haben. Die vier ORFs beinhalten: (1) Die Polymerase (POL)-Region kodierend für das virale POL-Enzym, (2) die *Presurface-Surface* (preS-S)-Region des Genoms kodierend für das Oberflächenprotein (*hepatitis B surface antigen*, HBsAg), (3) die *precore-core* (preC-C)-Region kodierend sowohl für das Kapsidprotein (*hepatitis B core antigen*, HBcAg) als auch für das exkretorische Protein (*hepatitis B e antigen*, HBeAg)⁸ und (4) die X-Region für das X-Protein (HBx), welches die Wirts- und virale Signaltransduktion, sowie Genexpression moduliert⁹.

Das Gen, welches vor allem in Bezug auf NA-Resistenz von Relevanz ist, ist das **POL-Gen**. Es setzt sich aus den vier Domänen Terminales Protein, *Spacer*, Polymerase/Reverse Transkriptase (Pol/RT) und Ribonuklease H (RNase H) zusammen und repräsentiert wichtige Bereiche für die virale Replikation, virale Morphogenese und NA-Bindung. Weiterhin lassen sich konservierte Regionen beschreiben mit unterschiedlichen primären Funktionen: Die konservierte Region A fungiert in Deoxynucleosidtriphosphat-Bindung, Region B in *Template*-Bindung und Region C stellt ein wichtiges katalytisches Zentrum des Enzyms mit dem YMDD-Motiv dar^{10,11}. Die bisher bekannten NA-Resistenzvarianten finden sich in den konservierten Regionen A bis D der RT-Domäne (siehe Abbildung 1) und führen dazu, dass die NA nicht mehr von der viralen POL gebunden werden oder die *Priming*-Reaktion der POL nicht mehr gestört wird und folglich die virale DNA-Synthese trotz Gegenwart der antiviralen Substanz fortgesetzt werden kann.

Das **Surface (S)-Gen**, bestehend aus Pre-S1, Pre-S2 und S-Domäne, trägt wichtige Determinanten für die Oberflächenstrukturen der Virionenpartikel und ist essentiell für die virale Zellbindung, Penetration und Zusammenführung bzw. Entmantelung des viralen Genoms. Aufgrund der Genorganisation des HBV-Gens in ORFs besteht eine Überlappung zum POL-Gen (siehe Abbildung 1). Somit können NA induzierte Varianten des POL-Gens auch Auswirkungen auf das S-Gen und sein Oberflächenprotein haben mit reduzierter Antigenizität oder Virionen-Sekretionsdefizits und umgekehrt (siehe Abbildung 2)^{12,14}.

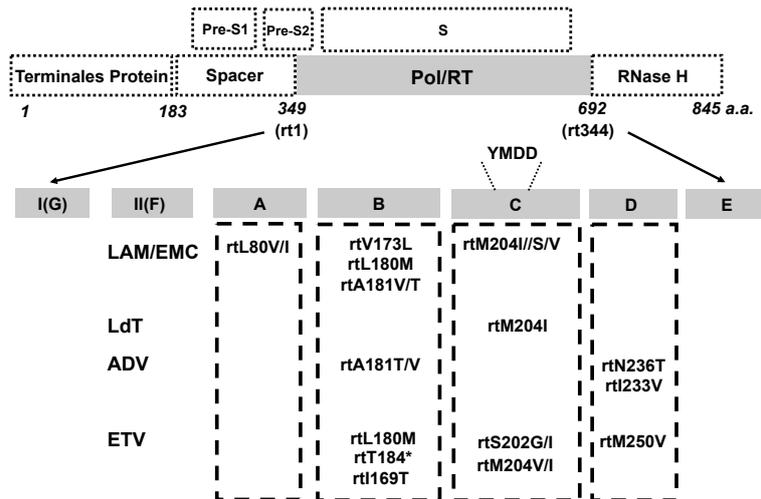


Abbildung 1: Organisation des HBV-Polymerase- und Surface-Gens

Darstellung des POL-Gens (mit den Domänen Terminales Protein, *Spacer*, Pol/RT und RNase H), des überlappenden S-Gens (mit den Domänen Pre-S1, Pre-S2 und S), sowie der bisher bekannten NA-Resistenzvarianten mit Zuordnung zu den entsprechenden konservierten Regionen (A-E). a.a.: Aminosäurenposition, rt: RT-Position, *S/A/I/L/F/G.

Korrespondierende Varianten		Korrespondierende Varianten	
RT	HBsAg	RT	HBsAg
rtR153Q	sG145R	rtT184S	sL175F
rt169T	sF161H/L	rtT184M	sL176s
rtV173L	sE164D	rtT184L	sL175F
rtL180M	Keine Veränderung	rtV191I	sW182s
rtA181T	sW172s/L	rtS202C	Keine Veränderung/sS193F
rtA181V	sL173F	rtS202I	sV194F/S
rtA184A	Keine Veränderung	rtM204V	sI195M
rtT184C	sL175 +sL176V	rtM204I	sW196s/S/L
rtT184I	Keine Veränderung	rtN236T	Hinter dem Ende des ORFs
rtT184G	sL176V		

Abbildung 2: Korrespondierende Varianten der Reversen Transkriptase und des HBsAg

Darstellung der bei überlappendem ORF zur RT korrespondierenden HBsAg-Varianten. s: Stoppcodon. Abbildung 1 und Abbildung 2 adaptiert und abgedruckt mit Erlaubnis von Elsevier nach der Publikation Zoulim, F. & Locarnini, S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* **137**, 1593–608.e1–2 (2009)¹² und Cornberg et al. 2011¹³

2.3 Antivirale Therapie

Das **Ziel einer antiviralen Therapie** ist es, das Risiko einer Progression und Entwicklung von Komplikationen einer chronischen HBV-Infektion durch potente und anhaltende Virussuppression zu reduzieren^{15,16}. Die Behandlung von HBV-Infektionen kann mit pegyliertem Interferon-alfa (IFN) oder einem NA erfolgen. Die NA stellen aufgrund ihrer hohen Wirksamkeit und guten Verträglichkeit weltweit die Standardtherapie dar und lassen sich strukturell in drei Gruppen einteilen: L-Nukleosid-Analoga (LAM, EMC, Telbivudin (LdT)), azyklische Alkylphosphate (= Nukleotid-Analoga: ADV, TDF) und D-Cyclopentane (ETV). Durch die NA erfolgt eine kompetitive Inhibition im Sinne einer direkten Bindungskonkurrenz zum natürlichen Substrat der RT mit hieraus resultierendem DNA-Kettenabbruch. Dieser Mechanismus wird bei Ausbildung einer Resistenz gestört und es kann zu virologischem und biochemischem Durchbruch und somit zur Progression der Lebererkrankung führen¹². Die Wahrscheinlichkeit der Selektion einer NA resistenten HBV-Variante ist unter anderem abhängig von der Potenz des antiviralen Wirkstoffs¹⁷. Am frühesten und häufigsten entwickeln sich Resistenzvarianten gegen LAM^{18,19}. Währenddessen zeigt sich für ADV, dass die Selektion von Resistenzvarianten erst nach einer prolongierten Behandlungszeit auftritt und einen geringeren Resistenzgrad hervorruft als vergleichsweise durch L-Nucleosid-Analoga selektierte resistente Varianten²⁰.

TDF wird bereits seit 2001 erfolgreich in der Therapie der HIV-Infektion eingesetzt^{21,22}. In HIV/HBV-koinfizierten Patienten¹ konnte die ebenfalls bestehende inhibierende Wirkung auf HBV-Infektionen gezeigt werden²³⁻²⁶. 2008 erhielt TDF die Zulassung zur HBV-Therapie in Europa und in den USA und gehört mittlerweile zur *Firstline*-Therapie¹⁵. Aufgrund seiner besonderen sterischen Konformation zeigt TDF nicht nur bei Wildtyp, sondern auch bei bekannten HBV-Resistenzvarianten eine starke inhibierende Wirkung auf die HBV-POL²⁷⁻²⁹. Obwohl sich TDF und ADV in ihrer Struktur sehr ähnlich sind (siehe Abbildung 3), scheint die Wirksamkeit von TDF gegenüber ADV-resistenten Varianten weitestgehend erhalten zu sein.

¹ die Bezeichnung Patient umfasst sowohl Patientinnen als auch Patienten

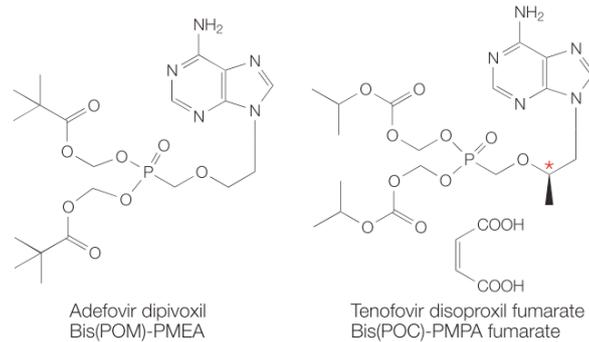


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von ADV und TDF

Abgedruckt mit Erlaubnis von Macmillan Publishers Ltd. aus der Publikation: De Clercq, E. & Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 928–40 (2005)³⁰

So zeigt sich in den Zulassungsstudien für TDF in der HBV-Behandlung bis zu Woche 144 keine Resistenzbildung und keine verminderte Ansprechrate beim Vorliegen von ADV-Resistenzen³¹. Einige neuere Studienergebnisse deuten jedoch darauf hin, dass ADV-Resistenzvarianten die TDF-Monotherapie negativ beeinflussen könnten. So zeigt z.B. eine *in-vitro*-Studie eine 3,2-fach reduzierte TDF-Ansprechrate bei Vorliegen einer rtA181V Variante und 10-fache Reduktion, wenn diese in Kombination mit einer rtN236T Variante vorliegt³². Auch in einigen klinischen Studien zeigt sich eine verminderte Virussuppression bei vorliegenden ADV-Resistenzvarianten zur BL. So erreichen nach zwölf Monaten einer TDF-Monotherapie 33% der Patienten mit einer ADV-Resistenzvariante zur BL eine supprimierte Viruslast vs. 99% ohne ADV-Resistenzvariante zur BL²⁹. In einer anderen Studie zur TDF-*Rescue*-Therapie nach LAM- und ADV-Behandlungsversagen erreichen nur 46% zu Woche 48 und 64% zu Woche 96 der Therapie eine virale Suppression von <15 IU/ml³³. Die Möglichkeit einer potentiellen TDF-ADV-Kreuzresistenz mit negativer Beeinflussung durch ADV-Resistenzvarianten auf eine TDF-Monotherapie bleibt bisher jedoch weiter offen und die Studienlage ist hierzu gering.

2.4 Sequenziermethoden

Die gängigen Methoden zur Identifikation von NA-Resistenzvarianten sind die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)-Amplifikation, direkte Sequenzierung und *Line Probe Assay*. Durch letztgenannte Methode können zwar nur vorbekannte Punktmutationen nachgewiesen werden, jedoch bis zu einer Prävalenz von 5% der Viruspopulation, wohingegen durch die anderen Methoden Varianten erst ab einer Präsenz von ca. 20% detektiert werden können^{12,34,35}. Eine Quantifizierung und Detektion von Minorvarianten ist mit diesen Methoden nicht möglich. Eine genauere Sequenzierung bis zu 1% Prävalenzanteil der Quasispezies ist durch klonale Analyse

möglich, stellt jedoch ein sehr komplex und zeitaufwendiges Verfahren dar^{12,35}. Ein neues viel versprechendes Testsystem hat sich mit UDPS im Laufe der letzten Jahre etabliert. Die *Genome Sequencer FLX Plattform* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) ermöglicht eine hoch effiziente Analyse und Quantifizierung von tausenden klonal amplifizierten Sequenzen bis zu einer Länge von ca. 400 Basenpaaren (bp) mit hoher Sensitivität bezüglich der Detektion von Quasispezies inklusive Varianten von <1% Prävalenzanteil der patientenspezifischen HBV-Population³⁶⁻³⁹. Diese neue Methodik erlaubt eine effiziente Untersuchung der Dynamik von HBV-Quasispezies in Bezug auf die NA-Resistenzbildung, was bisher in dieser Art nicht möglich war.

3 Aufgabenstellung

In der vorliegenden Studie wird die Dynamik von NA-Resistenzvarianten der RT und des HBsAg untersucht mit Schwerpunkt auf der Ausprägung von ADV-Resistenzvarianten und der quantitativen Entwicklung der HBV-Quasispezies bei 18 multipel vorbehandelten bzw. hoch resistenten chronisch HBV-infizierten Patienten unter TDF-Monotherapie mit partiellem Therapieansprechen.

Insbesondere ist es von Interesse, ob bei Patienten mit ADV-Therapieversagen oder genotypischer ADV-Resistenz unter der TDF-Monotherapie eine weitere Selektion der ADV-Resistenzvarianten stattfindet und ob dies in Zusammenhang mit einem verminderten Ansprechen auf die TDF-Monotherapie steht.

Sekundäre Endpunkte im Verlauf der TDF-Monotherapie sind:

- Auftreten von neuen Varianten der RT ohne bisher gesicherte Resistenz,
- Dynamik der LAM-/ETV-Resistenzvarianten im Verlauf der TDF-Monotherapie,
- Dynamik der Varianten im überlappenden HBsAg,
- Dynamik der HBV-Quasispezies, insbesondere Auftreten und Entwicklung von Minorvarianten <5% Prävalenzanteil der Viruspopulation,
- Vergleich von zwei etablierten Sequenziermethoden (TG, INNO-LiPA) mit einer neuartigen Methode (UDPS) zur Detektion von HBV-Varianten.

4 Material und Methode

4.1 Studiendesign und Beschreibung der Kohorte

Es handelt sich um eine retrospektive Kohortenstudie zu chronisch HBV-infizierten Patienten mit TDF-Monotherapie (Viread® 245mg/Tag) nach vorangegangenem Therapieversagen auf eine LAM- sowie ADV-Behandlung. Die Patienten wurden aus einem Patientenkollektiv der hepatologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt auf Gastroenterologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum in Berlin ausgewählt und die klinischen Daten sowie serologischen Parameter analysiert.

Die Patientendaten wurden von 2001 bis 2009 im Rahmen von *Follow-Up* Untersuchungen in dreimonatigen Abständen erhoben und die entsprechenden Serumproben bei -20 °C kryokonserviert. Alle Patienten gaben schriftliches Einverständnis zur Asservierung und Verwendung der Serumproben sowie der anonymisierten Patientendaten. Ein entsprechender Ethikantrag wurde von der Ethikkommission der Charité bewilligt (Ethikkommission der Charité, Antragsnummer: 205/2002, Votum vom 19.11.2002).

Einschlusskriterien waren:

1. männliche und weibliche Patienten mit HBeAg-positiver oder –negativer chronischer HBV-Infektion
2. ein unter TDF auftretendes partielles Therapieansprechen, welches definiert war als ein Rückgang $>1 \log_{10}$ Kopien/ml der HBV-DNA nach >12 Monaten Behandlung aber weiterhin nachweisbarer HBV-DNA mit *Real-Time PCR-Assay*.
3. ein vorheriges Therapieversagen auf eine Therapie mit LAM (100 mg/d) und ADV (10 mg/d) sequenziell oder kombiniert definiert als¹²:
 - primäres Nichtansprechen ($<1 \log_{10}$ Kopien/ml Regredienz der HBV-DNA innerhalb der ersten 3 Monate),
 - partielles Ansprechen ($>1 \log_{10}$ Kopien/ml Regredienz der HBV-DNA, aber weiterhin nachweisbare HBV-DNA mit Real-Time PCR Assay),
 - virologischer Durchbruch (erneuter HBV-DNA Anstieg $>1 \log_{10}$ Kopien/ml über Nadir nach primärem Ansprechen),
 - Resistenzentwicklung gegen NA (Nachweis einer Resistenzvariante mittels Sequenzierung),
4. die Verfügbarkeit einer Serumprobe zur TDF-BL und mindestens einem Verlaufszeitpunkt,

5. eine HBV-Monoinfektion, d.h. keine Koinfektion mit HIV, Hepatitis C oder D und
6. Adhärenz zur Einnahme von TDF, ermittelt anhand von Aufzeichnungen aus den Patientenunterlagen.

Aus der Gesamtkohorte der mit TDF behandelten chronisch HBV-infizierten Patienten (n= 76) wurden zehn Patienten wegen HIV-Koinfektion und 28 Patienten wegen fehlender Vortherapie mit LAM und/oder ADV ausgeschlossen. Von den verbleibenden Patienten (n= 38) wiesen 25 Patienten einen HBV-DNA Nachweis >35 Kopien/ml zu Monat 12 auf, hiervon mussten acht Patienten ausgeschlossen werden wegen fehlender Serumverfügbarkeit, mangelnder Therapie-Adhärenz oder unvollständiger Datenlage. Patient 1 erfüllt zwar nicht die für den Einschluss in die Studie geforderte Beobachtungszeit, da er jedoch zu Beginn der Drittlinienbehandlung in der Vortestung eine ADV-Resistenzvariante sowie multiple weitere vorbestehende Varianten aufwies, wurde trotzdem eine Untersuchung der HBV-Varianten durchgeführt.

Insgesamt wurden durch die oben genannten Einschlusskriterien 18 hoch resistente bzw. multi-
pel vorbehandelte Patienten ausgewählt. Es wurden zwei Subgruppen gebildet:

Gruppe I (6 Patienten, Patient 1 bis 6) wies mittels vormals durchgeführter direkter Sequenzierung (Daten nicht aufgeführt) bereits mindestens eine bekannte ADV-Resistenzvariante zum Beginn der TDF-Monotherapie auf. In dieser Gruppe erfolgte eine Sequenzierung je nach Serumverfügbarkeit in kurzfristigeren Therapieintervallen (BL, Monat 3, 6 und 12).

In Gruppe II (12 Patienten, Patient 7 bis 18) wies zum Beginn der TDF-Monotherapie mittels vorangegangener direkter Sequenzierung (Daten nicht aufgeführt) keine ADV-Resistenzvarianten auf. Die Sequenzierung erfolgte zur BL sowie in der Regel zu Monat 12. Ausnahmen hiervon bilden wegen fehlender Serumverfügbarkeit bzw. erfolgloser Amplifikation der entsprechenden Serumprobe Patient 11 und 18, von denen die *Follow-Up* Serumprobe von Monat 9 bzw. Monat 6 von Patient 12 zur Sequenzanalyse untersucht wurden

Weitere **Vortherapien** erfolgten bei zwei Patienten mit ETV (Patienten 1, 3), bei einem Patienten mit LdT (Patient 9) und bei drei Patienten (Patienten 3, 15, 16) mit TDF.

4.2 Evaluation der TDF-Monotherapie und Resistenzanalyse

Zeitpunkte der serologischen Untersuchungen im Verlauf der TDF-Monotherapie waren der Therapiebeginn mit TDF (BL) und mindestens ein Folgezeitpunkt, je nach Serumverfügbarkeit Monat 3, 6, 9, 12 +/-1 Monat. Zu diesen Zeitpunkten wurden u.a. die HBV-DNA und Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt.

Soweit eine PCR-basierte Amplifizierbarkeit von HBV-Genom aus der entsprechenden Serumprobe möglich war, wurden Variantenanalysen mittels drei unterschiedlicher Sequenziersysteme durchgeführt:

1. UDPS mit *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT); Sequenzierung von Gruppe I mit dem FLX Amplikon Sequenziersystem und Gruppe II mit FLX Titanium Sequenziersystem (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT)
2. Direkte Sequenzierung mit *TRUGENE™ HBV Genotyping Kit des OpenGene™ DNA Sequencing System* (Siemens Healthcare Diagnostic, USA)
3. *Line Probe Assay* mit *INNO-LiPa DRv2 und v3* (Innogenetics, Belgium).

Berücksichtigt in der Auswertung wurden die bekannten NA-Resistenzvarianten rtI169T, rtV173L, rtL180M, rtA181V/T, rtT184A/F/G/I/L/S, rtS202G/I, rtM204I/S/V, rtM250V, rtN236T und durch INNO-LiPa zusätzlich die Variante rtL80V/I. Besondere Aufmerksamkeit wurde auf die Dynamik der ADV-Resistenzvarianten (rtA181V/T, rtN236T) gelegt. Gesondert wurden die Varianten rtV191I, rtA194T, rtS219A, rtT128A/I/D/N, rtN238D/H/Y/T berücksichtigt, welche im Rahmen potentieller NA-Resistenzvarianten diskutiert werden^{12,40-42}. Weiterhin wurde das Auftreten der HBsAg-Varianten sW172s, sW182s, sW196s, sW199s, sG145R, sI195M, sE164D, sW196L näher untersucht.

4.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS, Version 22 (SPSS Inc., Chicago, USA) und Microsoft Office Excel 2011. Es wurde eine deskriptive Statistik mit Berechnung der Mittelwerte, Median, Standardabweichung und *Range* durchgeführt. Fehlende Messwerte wurden mittels linearer Interpolierung ersetzt. Es erfolgte ein Mittelwertvergleich der HBV-DNA-Serumkonzentration von Patienten mit Nachweis von ADV-Resistenzvarianten vs. Patienten mit HBV-Wildtyp bzw. LAM-/ETV-Resistenzvarianten mittels T-Test für unabhängige Stichproben bei Varianzgleichheit nach Levene-Test. Die Sequenziermethoden TG und INNO-LiPa wurden ebenso verglichen.

4.4 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Die Verbrauchsmaterialien wie Eppendorf-, PCR-, Falcon-Röhrchen, Multi-/Pipetten 0,5-1000 µl, Pipettenspitzen und ähnliches wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon, Nunc und Biozym bezogen. Pipettenspitzen ohne Filter wurden vor Gebrauch autoklaviert. Demineralisiertes

Wasser wurde mit einer Ionenaustauschanlage gewonnen (Millipore, Schwalbach, Deutschland).

Die verwendeten weiteren Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller	LotNr./Ref.
0,2 ml dünnwandige PCR-Röhrchen	Biozym	
0,2 ml PCR-Röhrchen	DOT Scientific	620-PCR
0,5-1000 µl Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf	
1,0 ml steriler Kombitip plus Spitze	Eppendorf	2226730-2
1,5 ml wenig-adhäsive Mikrozentrifugen-Röhrchen	DOT Scientific	RN 1700-GNB
1,7 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen	DOT Scientific	RN-1700-GST
10 ml verworfbar Spritze mit Luer-Verschluss	Fisher Scientific	14-823-2A
15 ml Konische Falcon-Röhrchen	Falcon, Becton Dickenson	2196
150 ml <i>Stericup</i>	Fisher Scientific	SC00 B01 RE
2,0 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen mit fixiertem Deckel	DOT Scientific	RN2005-GMT
2,0 ml Röhrchen mit Schnappverschluss, klar	DOT Scientific	608-GMT 2
3 oz weit geöffneter <i>Stericup</i> , nicht-steril	Fisher Scientific	14-375-409
5,0 ml steriler Kombitip plus Spitze	Eppendorf	22267507
50 ml Konische-Röhrchen	Fisher Scientific	14-432-22
50 ml Serologische Pipette	Fisher Scientific	13-675-52
50 ml-Röhrchenadaptor für schwingende Behälter	Beckman Coulter	359474
6,35 mm Schlauchspitze für NPT Innengewinde		
8-Spitzen Multikanalpipette	Rainin	18-200
8er Streifen 0,2 ml dünnwandige PCR-Röhrchen	Biozym	
8er Streifen 0,2 ml PCR-Röhrchen	DOT Scientific	503-8PCR
96er-Lochplatte	Fisher Scientific	E951020303
Accuvetten	Beckman Coulter	8320592
<i>Beckman Coulter</i> CC Size Standard L10, 15 ml	Beckman Coulter	6602796
Einwegspritze mit Luer-Lok 10 ml	B. Braun	
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	BectonDickinson	
Gestell für dünnwandige PCR-Röhrchen		
Haftender PCR Film	ABgene	AB-0558
Impact 8-Kanal Schnurlospipettor	Matrix	6024
Isoton II	Beckman Coulter	8546719
<i>Kimwipes</i>	Fisher Scientific	06-666A

Laborhandschuhe	DOT Scientific	1752-pf
Linspapier	Thorlabs	MC-5
Magnetischer Partikelkonzentrator	Invitrogen	120-20D
Mikropipetten, 1-1000 µl	Rainin	RL series RT-LxF
Mikropipetten, 2-1000 µl	Rainin	RL series
Nadel, stumpf, flach 16 G	Brico Medical Supplies	
Pipetten 2 -25 ml	Falcon	
Pipettenspitzen (20, 200, 1000 µl)	Rainin	RT-LxF series
Pipettenspitzen (sterile), groß, Impact	Matrix	8245
Pipettierhilfe	Fisher Scientific	13-681-15E
Repeater plus Pipette	Eppendorf	2226020-1
Stumpfe, flache Nadel, 16G	Brico Medical Supplies VWR	BN1615
<i>Swin-Lok Filter Holder Beckman</i>	Whatman	420200
Verschlussstrips für 96er-Lochplatte	Fisher Scientific	E0030127498
<i>Zeiss Moistened Cleaning Tissue Quantity</i>	B&H Photo	ZECT
Zellometer verworfene Kammerplatte	Nexcelom	CHT4-003

Die verwendeten Reagenzien sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Reagenzien

Reagenzien	Hersteller/Katalognr.	LotNr./Ref.
<u>Probenaufbereitung und Amplifikation</u>		
<i>High Pure Viral Nucleic Acid Kit</i>	Roche Ref 11858874001	11331400
<i>HotStar Taq® DNA-Polymerase Kit</i>	Qiagen, Ref 203205	133205492
Primer (HPLC aufgereinigt)	TIB Molbiol Syntheselabor GmbH	
<i>Qiagen MinElute PCR Purification Kit</i>	Qiagen 133206406	28004
<i>QIAmp DNA Blood MiniKit</i>	Qiagen Ref 51106	130170077
Set von dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Promega U1240 Promega U1420	217805 280312
<u>Gelelektrophorese</u>		
123 bp-DNA Leiter (123 bis 3075 bp)	Invitrogen 15613-029	1111568
Agarose Typ I: Low EEO	78H0701	
<i>Sieve GP Agarose</i>	Biozym 0040108C654L	
<u>HBV-DNA Quantifizierung</u>		
<i>Cobas Amplicor HBV Monitor Test, 48 Tests</i>	Roche 03610110190	
<i>Cobas® TaqMan® HBV Test, 48 Tests</i>	Roche 03500756190	

<i>High Pure System Viral Nucleic Acid Kit, 48 Tests</i>	Roche 03502295001	
FLX Amplikon/ Titanium		
18.2 MΩ Wasser		
2-Propanol (Isopropanol) 100%	Fisher Scientific	A426P-4
3M Natrium	Sigma	S-7899
<i>AMPure 5 ml Kit</i>	Agencourt	A50850
<i>AMPure 60 ml Kit</i>	Agencourt	000130
Azetatpuffer pH 5,2		
DNA 1000 LabChip	Agilent	5067-1504
DNA 7500 LabChip	Agilent	5067-1506
<i>DNA Molecular Weight Maker XIV</i>	Roche	11 721 933 001
dNTPs (je 10 mM)		NU606001
<i>emPCR Kit II und III</i>	Roche	04891384001
Ethanol (50%)	Fisher Scientific	ME-X02-881
Ethanol (70%, v/v)	Fisher Scientific	
Ethanol 100%	Fisher Scientific	ME-X02-891
Ethidium Bromid (0,005%)		
<i>FastStart High Fidelity PCR System</i>	Roche	03 553 426 001 03 553 400 001 03 553 361 001
<i>FisherBrand Sparkleen</i>	Fisher Scientific	04320-4
Fusions-Primer A (10 µM)	IDT	
Fusions-Primer B (10 µM)	IDT	
<i>Gel Loading Dye</i>		
<i>GS LR70 Sequenzier-Kit</i>	Roche	04932315001
<i>GS Picotitierplatte Kit (70x75 mm)</i>	Roche	04852427001
<i>GTG SeaKem Agarose</i>	Lonza	50071
<i>Millipore Filter</i>	Roche	05 233 674 001
<i>MinElute PCR Purification Kit</i>	QIAGEN	28004
<i>Molecular Biology Grade Wasser</i>	Fisher	E0032006205
Natriumchlorid Tablette		
Natriumhydroxid 10 N	Fisher Scientific	SS255-1
<i>Platinum HiFi Taq Polymerase</i>	Invitrogen	11304-102
<i>Platinum HiFi Taq Polymerase 5 U/µl</i>	Invitrogen	11304-102
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN	28704
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN	28106

<i>Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit</i>	Invitrogen	P-7589
<i>RiboGreen RNA Quantification Kit</i>	Invitrogen	R-11490
RNA 6000 Pico LabChip	Agilent	5067-1513
Tris-EDTA Puffer 1x, pH 8,0	Fisher Scientific	BP2473-1
<i>Tween 20, flüssig (100%)</i>	Fisher Scientific	BP337-100
INNO-LiPa		
<i>INNO-LiPa DRv2 Kit</i>	Innogenetics Ref 80349	192205 210972
<i>INNO-LiPa HBV DRv2 Strips</i>	Innogenetics Ref 59208v0	192257 206762
<i>INNO-LiPa HBV Prototyp DRv3 Strips</i> <i>INNO-LiPa HBV DRv3 Strips</i>	Innogenetics Ref 15758 Ref 60227	212893
TruGene™		
<i>TruGene™ HBV Genotyping Kit</i>	Siemens, 07364707	B012A1
<i>SureFill 6% Patrone</i>	Siemens, 06635553	2349B107
<i>MicroCel 500 Kassette</i>	Siemens, 06866237	M4361
<i>MicroCel 300 Kassette</i>	Siemens, 09044475	S3071
<i>Comb + Clips Softplug</i>	Siemens, 03728682	

4.5 Puffer

TRIS-Borat-EDTA-Puffer (1fach): 108 g TRIS Base, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA-Na₂, pH 8 auf 1 l H₂O.

4.6 Geräte

Die verwendeten Geräte sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller	Ref.
Abzugshaube, LaminAir®, HBB 2448	Heraeus Instrument	
Agarose Gel Apparat (15 × 15cm)		
<i>Bead-</i> Ablagerungsvorrichtung Gegengewicht	Roche	04 777 115 001
<i>Bead-</i> Ablagerungsvorrichtung 70×75 <i>Bead-</i> Ablagerungsvorrichtung (2 grosse Regionen)	Roche	04 777 069 001
<i>BioAnalyzer</i>	Agilent	2100
<i>Biofuge fresco</i>	Heraeus	
<i>Dual-stage</i> Regulator	TechAir	2123351-000

Eiseimer		
Elektrophoresekammer Horizon 11.14	Life Techonlogies	
Feinwaage 510	Kern	
Flexibles Rohr 6,35 mm mit rostfreier Stahlschraubenhalterung		
Fluorometer		
<i>Genome Sequencer FLX 454</i>	Roche	04 896 548 001
GS FLX Reagenzienkassette	Roche	04 959 671 001
GS FLX Vorwasch-Röhrchenhalter	Roche	04 959 680 001
Heizblock		
<i>HydroShear</i> Standardbestückung	Genomic Solutions	JHSH204004
<i>HydroShearb</i>	Genomic Solutions	JHSH000000-1
Kamera		
Kamera Abdeckungsschutz	Roche	04 777 018 001
Komprimiertes Nitrogen, ultra rein		
Kühlschrank, Eisschrank		
<i>LabQuake Roller</i>	Thermolyne	400110
Magnetischer Partikelkonzentrator	Invitrogen	120-20D
Magnetischer Partikelkonzentrator DynaMag-2	Invitrogen	123-21D
Magnetrührer Ikamag	RCT	
Mikrowelle		
Mikrozentrifuge (1000-16000 RCF)	Eppendorf	5415D
Minifuge	Biocold Scientific	UP9001
Partikelzähler Coulter Counter Z2	Beckman Coulter	6605700
PCR Abdeckung	Fisher	16-108-137
Picotiterplatten-Kartusche: 70x75 mm	Roche	
Picotiterrplatten-Kartusche <i>Bypass</i> -Röhrchen	Roche	
Polymax 1040 (Plattformschüttler, taumelnd)	Heidolph	
Skalpell		
Spannungsgesät Model 100/2.0	Bio Rad	
Stoppuhr		
Thermoblöcke	Grant, QBT	
Thermostyker <i>GeneAmp PCR System 9600</i> , inkl. 96-Lochplatte, 0,2ml Block	Perkin Elmer	
<i>TissueLyser</i>	Qiagen	85210
<i>TissueLyser</i> -Röhrchengestell	Qiagen	69982

TRUGENE™ OpenGene™ DNA Sequenziersystem	Siemens	
Ultraviolett-Lichtbox		
Vakuumpumpe	GAST	ROA-P101-AA
Ventilationssystem	Labconco Many	4862010
Vortex Duo/ Genie	Labinco	
Wasserbad		
Wiegeschüttler	GFL	
Zentrifuge	Beckman Coulter	X-12
Zentrifuge	Eppendorf	5417c
Zentrifugenrotor mit schwingenden Behältern	Beckman Coulter	SX4750A 369704

4.7 Durchführung der Laborarbeiten

Die Arbeitsbereiche für DNA-Extraktion und PCR-Amplifikation wurden zur Vermeidung von Kontaminationen strikt räumlich getrennt.

4.8 HBV-DNA Quantifizierung und Bestimmung biochemischer Parameter

Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgte durch das Zentrallabor der Charité Universitätsmedizin Berlin mit *Cobas Amplicor HBV Monitor Test* (Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, USA; unteres Detektionslimit 300 Kopien/ml) und/oder *COBAS TaqMan Assay* (Roche Diagnostic System, Branchburg, NJ, USA; unteres Detektionslimit 6 IU/ml, entspricht 35 Kopien/ml (Umrechnungsfaktor 5,8)). Die HBV-DNA wird logarithmisch (\log_{10}) in der Einheit Kopien/ml dargestellt. Die untere Detektionsgrenze beträgt in logarithmischen Darstellung 1,54 \log_{10} Kopien/ml.

Ebenfalls durch das Zentrallabor der Charité Universitätsmedizin Berlin erfolgte die Bestimmung der ALT aus Heparin Plasma oder Serum per enzymatischem Farbstest. Die Darstellung der ALT erfolgt unter Angabe der Erhöhung über den Normalwert (*Upper level over normal* (ULN); Normalwert weiblich <28 U/l, männlich <40 U/l).

4.9 Extraktion von Nukleinsäuren aus Serumproben

Die Extraktion der HBV-DNA aus den Serumproben erfolgte mittels QIAamp® DNA Mini- und Blut-Mono Kit (Qiagen) laut Standardprotokoll des Herstellers. Serumproben, bei denen mit QIAamp® DNA Mini- und Blut-Mono Kit keine erfolgreiche Extraktion möglich war, wurden mittels *High Pure Viral Nucleic Acid Kit* (Roche Applied Science, Deutschland) nach Standardprotokoll des Herstellers extrahiert.

4.10 Tiefenpyrosequenzierung mittels *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT)

UDPS ermöglicht mittels GS FLX Amplikon- bzw. Titanium-Sequenzier-Kit (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) die Detektion, Identifikation und Quantifizierung von DNA-Varianten in einer Quasispezies-Population per Massenparalleelsequenzierung. Die wesentlichen vier Schritte dieser Sequenziertechnik sind das Erstellen einer *Bead*-gebundenen DNA-*Library*, klonale Amplifikation der DNA-*Library* per Emulsions-PCR (emPCR), Tiefenpyrosequenzierung der DNA-Einzelstränge mit Messung der Pyrophosphat-Freisetzung bei Einbau von Nukleotiden am komplementären DNA-Strang und hiermit Sequenzdeterminierung³⁶.

Die UDPS-Versuchsdurchführung erfolgte in Kooperation und in den Räumlichkeiten des Max-Planck-Instituts für molekulare Genetik, Berlin (Dr. Bernd Timmermann) und die Datenanalyse in Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für Informatik, Saarbrücken (Bastian Beggel).

4.10.1 GS FLX HBV-DNA-*Library*

Um die HBV-DNA mittels GS FLX System (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) sequenzieren zu können, musste die HBV-DNA in entsprechende kompatible DNA-Fragmente, die sogenannte DNA-*Library* überführt werden. Zur kompletten Abdeckung der für die Resistenzvarianten wichtigen Regionen der RT-Domäne wurden zwei überlappenden HBV-DNA-Fragmenten amplifiziert. Die Versuchsplanung hierfür erfolgte nach Standardprotokoll des GS FLX Amplikon Sequenzier-Kit (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT), welches eine maximale Sequenzierlänge von ca. 200 bis 250 nk mit 400.000 bis 600.000 *Reads* aufweist⁴³. Es wurden die Aminosäuren 83 bis 214 (entspricht 359 nk) für das erste und 195 bis 325 (entspricht 356 nk) für das zweite Amplifikat der RT abgedeckt (siehe Abbildung 4). Mittels bidirektionaler Sequenzierung wurde die komplette Länge des Zielbereichs abgedeckt. Die Sequenzierung der HBV-DNA der Gruppe I-Patienten erfolgte mit dem GS FLX Amplikon Sequenzier-Kit (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT), die Sequenzierung der HBV-DNA der Gruppe II-Patienten mit dem GS FLX Titanium Sequenzier-Kit (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT), welches zwischenzeitlich etabliert wurde und die Determinierung von längeren Nukleotidsequenzen (ca. 350 bis 450 nk) erlaubt⁴⁴. Die oben aufgeführte Aufteilung in zwei überlappende Zielbereiche wurde beibehalten. Exemplarisch wird im Weiteren die labor-technische Durchführung für die GS FLX Amplikon Sequenzierung erläutert.

1 aattccacaa cttccacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttcct
 61 gctgggtggct ccagttcagg aacagtaaac cctgttctga ctactgcctc tcccttatcg
Start RT-Domäne
 121 tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcg ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc
 181 ctaggacccc ttctcgtggt acaggcgggg ttttcttgt tgacaagaat cctcacaata
252-VP
 241 ccgcagagtc t agactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt
 301 cttggccaaa attcgcagtc cccaacctcc aatcactcac caacctcttg tctccaact
F2-VP
 361 tgtcctgggt atcgc tggat gtgtctgcg cgttttatca tcttctctt catcctgctg
 421 ctatgcctca tcttcttgggt ggttcttctg gactatcaag gtaggtgcc cgtttgcct
 481 ctaattccag gatcctcaac aaccagcac ggaccatgcc ggacctgcat gactactgct
 541 caaggaacct ctatgtatcc ctctgttgc tgtaccaaac cttcggacgg aaattgcacc
 601 tgtattccca tccatcacc ctgggctttc ggaaaattcc rtI169 rtV173
rtL180 rtA181 rtT184 rtA194 **F3-VP**
 661 cgtttctcct ggctcagttt actagtgcca tttgttcagt ggttcgtagg gctttccccc
rtS202 rtM204 **R2-RP**
 721 actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggtat ttggg ggccaagtct gtacagcatc
rtI233 rtN236
 781 ttgagtcct tttaccgct gttaccaatt ttcttttgc tttgggtata catttaaacc
rtM250
 841 ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc taaattttat gggttatgct attggatggt
 901 atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaatgtttt agaaaacttc
 961 ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtcct ttgggttttg
 1021 ctgccccctt tacacaatgt ggttatcctg cgttgatgcc tttgtatgca tgtattcaat
R3-RP
 1081 ctaagc aggc tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga
Stop RT-Gen
 1141 acctttacc cgttgcccgg caacggccag gtctgtgcca agtgtttgct gacgcaacc
 1201 ccaactggctg gggcttggtc atgggccatc agcgcacgctg tggaaacctt tcggctcctc
1309D-RP
 1261 tgccgatcca tactgoggaa ctctagcgcg cttgttttgc tgcagcag gg tctggagcaa
 1321 acattatcgg gactgataac tctgttgcct tatcccgcaa atatacatcg tttccatggc
 1381 tgctaggctg tgctgccaac tggatcctgc gcgggacgct cttgttttac gtcccgtcgg

Abbildung 4: Lokalisation der GS FLX HBV-DNA-Libraryprimer PCR-I/II und NA-Resistenzvarianten der RT

Darstellung der Lokalisation der Primer für GS *FLX DNA-Library* PCR-I (252-Vorwärtsprimer (VP) und 1309D-Rückwärtsprimer (RP)) und PCR-II (F2-VP/R2-RP für das erste und F3-VP/R3-RP für das zweite HBV-DNA Fragment) sowie die Lokalisation der bisher bekannten Resistenzvarianten (grau) der RT.

Quelle: modifiziert nach ACCESSION Genbank : J02203 V01460, human HBV subtypeayw

4.10.1.1 GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-I

Tabelle 4: Primer für GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-I

Vorwärtsprimer	252-VP	5'-AgACTCgTggTggACTTCTCT-3'
Rückwärtsprimer	1309D-RP	5'-AgAATgTTTgCTCCAgACC-3'

Zur Herstellung der HBV-DNA-*Library* wurde eine Nested-PCR durchgeführt. Das Primerdesign der GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-I erfolgte modifiziert nach Allen et al. 1998 (siehe Tabelle 4)¹⁰. Der GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-I wurde in einer Konzentration von 50 µMol (50 pmol/µl) verwendet.

4.10.1.2 GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-II

Tabelle 5: Primer für GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-II

	Bezeichnung	Adapterprimer A/B	Key	MID	HBV-DNA-spezif. Primer (F2-VP/R2-RP und F3-VP/R3-RP)
Erstes DNA-Fragment	F2-VP_MID-Nr.	5'-gCCTCCCTCgCgCCA	TCAg	ACgAgTgCgT	TggATgTgTCTgCggCgTTT-3'
	R2-RP_MID-Nr.	5'-gCCTTgCCAgCCCgC	TCAg	ACgAgTgCgT	TgTACAgACTTggCCCCCAA-3'
Zweites DNA-Fragment	F3-VP_MID-Nr.	5'-gCCTCCCTCgCgCCA	TCAg	ACgAgTgCgT	CTTCCCCCACTgTTTGGc-3'
	R3-RP_MID-Nr.	5'-gCCTTgCCAgCCCgC	TCAg	ACgAgTgCgT	TTggCgAgAAAgTgAAAgCCT-3'

Darstellung der speziellen Amplikon-Fusionsprimer des ersten und zweiten HBV-DNA-Fragments mit Adapterprimer A (gCCTCCCTCgCgCCA) und B (gCCTTgCCAgCCCgC), der Key-Sequenz, des Multiplex-Identifizierungs-Adapters (MID, als Beispiel MID1 verwendet) und des *Target*-spezifischem PCR-Primers (F2-VP/R2-RP bzw. F3-VP/R3-RP).

Für die GS FLX HBV-DNA-*Library* PCR-II war die Verwendung spezieller Amplikon-Fusionsprimer notwendig (GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-II, siehe Tabelle 5). Das Design der Fusionsprimer erfolgte nach Standardprotokoll von GS FLX Amplikon DNA-*Library* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) und modifiziert nach Margeridon-Thermet et al. 2009 unter Verwendung des Genotyps D ayw Genoms GenBank Accession Nummer J02203 als Referenzsequenz^{39,45,46}. Der GS FLX HBV-DNA-*Libraryprimer* PCR-II wurde in einer Konzentration von 50 µMol (50 pmol/µl) verwendet.

Die Fusionsprimer umfassten eine Adapter A-/B-Sequenz und Schlüsselsequenz (*Key*) am 5'-Ende, benötigt für die klonale Amplifikation mittels emPCR und Erkennungssequenz für die Se-

quenzierreaktion⁴⁵. Am 3'-Ende befand sich zudem eine Multiplex-Identifizierungs-(MID)-Adaptor und der HBV-DNA-spezifische PCR-Primer zur Amplifikation. Es ergab sich eine Gesamtlänge des GS FLX HBV-DNA Amplifikats von 458nk bzw. 454nk zur bidirektionalen Sequenzierung (siehe Abbildung 5).

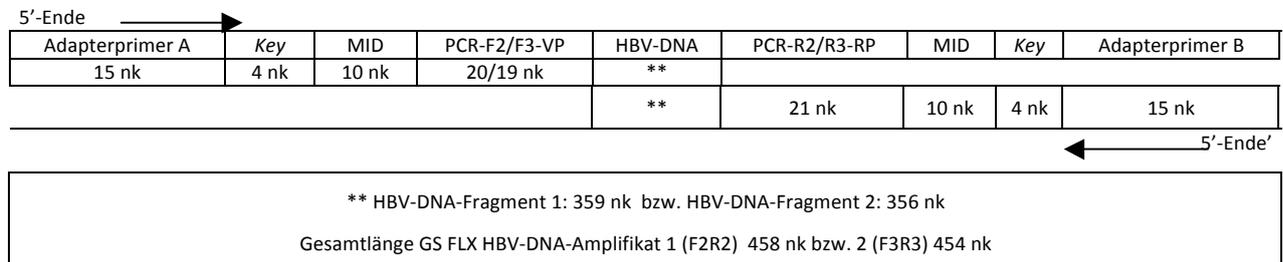


Abbildung 5: GS FLX HBV-DNA Amplifikat

Darstellung des GS FLX HBV-DNA Amplifikats mit Längenangabe modifiziert nach GS FLX Amplikon DNA-Library Preparation Method Manual, 2007⁴⁵

4.10.1.3 Multiplex-Identifizierungs-Adapter

Durch die zusätzliche Flankierung mit spezifischen Sequenzen, sogenannten Multiplex-Identifizierungs-Adaptoren (MID), war eine patientenspezifische Markierung der HBV-DNA möglich und somit eine Parallelsequenzierung aller HBV-DNA Proben zusammen. Die MIDs bestanden aus 10 nk, die sich in mindestens vier nk von den anderen MIDs unterscheidet, so dass Insertion, Deletion, Substitutionen von bis zu 3 nk als Fehler erkannt werden können⁴⁶. Jede MID war einem Patienten und einem Follow-Up Zeitpunkt spezifisch zugeordnet.

Tabelle 6: Verwendete Multiplex-Identifizierungs-Adapter

Nr.	MID	Nr.	MID	Nr.	MID	Nr.	MID
MID-1	ACgAgTgCgT	MID-8	CTCgCgTgTC	MID-17	CgTCTAgTAC	MID-24	TAgAgACgag
MID-2	ACgCTCgACA	MID-10	TCTCTATgCg	MID-18	TCTACgTAgC	MID-25	TCgTCgCTCg
MID-3	AgACgCACTC	MID-11	TgATACgTCT	MID-19	TgTACTACTC	MID-26	ACATACgCgT
MID-4	AgCACTgTAg	MID-13	CATAgTAgTg	MID-20	ACgACTACAg	MID-27	ACgCgAgTAT
MID-5	ATCAGACACg	MID-14	CgAgAgATAC	MID-21	CgTAgACTAg		
MID-6	ATATCgCgAg	MID-15	ATACgACgTA	MID-22	TACgAgTATg		
MID-7	CgTgTCTCTA	MID-16	TCACgTACTA	MID-23	TACTCTCgTg		

4.10.1.4 Nested-PCR

Zur Herstellung der GS FLX DNA-*Library* wurde eine *Nested-PCR* durchgeführt (GS FLX DNA-*Library* PCR-I und –II). Pro *Mastermix* (MM) wurde eine Negativkontrolle (negK) mit Aqua dest. angesetzt. Für die PCR wurde das *HotStar Taq*[®] DNA-Polymerase Kit (Qiagen) und HPLC-gereinigte Primer (TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin) verwendet.

4.10.1.5 GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-I

Tabelle 7: Zusammensetzung des MM der GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-I

5 µl x (N + 1)	10x Puffer
0,5 µl x (N + 1)	Primer 252-VP (50 µM)
0,5 µl x (N + 1)	Primer 1309 D-RP (50 µM)
0,5 µl x (N + 1)	dNTPs (20 mM)
1 µl x (N + 1)	MgCl ₂ (25 mM)
0,4 µl x (N + 1)	<i>HotStar Taq</i> [®] DNA-Polymerase (5 U/µl)
37,1 µl x (N + 1)	Aqua dest.

Tabelle 8: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-I

94 °C	15 min	
94 °C	30 s	40 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	

Die in Tabelle 7 genannten Reagenzien wurden auf Eis gestellt und mit Ausnahme der *HotStar Taq*[®] DNA-Polymerase vor Gebrauch gevortext und anschließend zur Kontaminationsreduzierung im *Short-Spin* zentrifugiert. Nacheinander wurden die Reagenzien zum MM in ein Eppendorfgefäß pipettiert und in autoklavierte, dünnwandige 0,2 ml PCR-Röhrchen zu je 45 µl aliquotiert. Zu jedem Aliquot wurden 5 µl HBV-DNA-Extraktionsprodukt hinzugefügt, gut vermischt und umgehend in den Thermozykler zur Amplifikation gegeben (siehe Tabelle 8). Die Amplifikationskontrolle per Gelelektrophorese auf 2%-igem Agarosegel mit 8 µl PCR-Produkt ergab einen Bandennachweis bei 1075 bp Länge.

4.10.1.6 GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-II

Tabelle 9: Zusammensetzung des MM der GS FLX HBV-DNA-*Library*, PCR-II

5 µl x (N + 1)	10x Puffer
0,5 µl x (N + 1)	dNTPs (20 mM)
1 µl x (N + 1)	MgCl ₂ (25 mM)
0,4 µl x (N + 1)	<i>HotStar Taq</i> [®] DNA-Polymerase (5 U/µl)
37,1 µl x (N + 1)	Aqua dest.
0,5 µl x (N + 1)	Primerpaar F2/R2 bzw. Primerpaar F3/R3 (50 µM)

Tabelle 10: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA-Library, PCR-II F2/R2

95 °C	15 min	
94 °C	30 s	5 Zyklen
45 °C	30 s	
72 °C	1 min	
94 °C	30 s	
64 °C	30 s	35 Zyklen
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

Tabelle 11: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX HBV-DNA-Library, PCR-II F3/R3

95 °C	15 min	
94 °C	30 s	5 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	1 min	
94 °C	30 s	
64 °C	30 s	35 Zyklen
72 °C	1 min	
72 °C	7 min	

Der MM für das erste Amplifikat wurde entsprechend Tabelle 9 auf Eis stehend vorbereitet, mit Ausnahme der *HotStar Taq*[®] DNA-Polymerase vor Gebrauch gevortextet, im *Short-Spin* zentrifugiert und in 0,2 ml dünnwandige PCR-Röhrchen zu 45 µl aliquotiert. Da pro Patient zwei sich überlappende Abschnitte des POL-Gens amplifiziert werden sollten, wurde die GS FLX HBV-DNA-Library PCR-II einmal mit GS FLX HBV-DNA-Library PCR-II Primerpaar F2-VP/R2-RP (je 50 µM) für das erste und einmal mit Primerpaar F3-VP/R3-RP (je 50 µM) für das zweite Amplifikat durchgeführt. Des Weiteren erfolgte analog die patientenspezifische Zugabe von 5 µl PCR-Produkt I, welches zur Minimierung von Primerübertrag und daraus resultierenden Fehlamplifikationen nach der ersten PCR mit Aqua dest. 1: 5 verdünnt wurde. Bei niedrig-virämischen Serumproben, bei denen die Amplifikation nach oben beschriebenem Protokoll nicht gelang, wurde 10 µl HBV-DNA-Extraktionsprodukt in die PCR-I eingesetzt bzw. auf den Verdünnungsschritt verzichtet. Gemäß dem verwendeten Primerpaar erfolgte eine entsprechende Anpassung der Reaktionstemperaturen und -dauer (siehe Tabelle 10 und Tabelle 11). Die Amplifikationskontrolle per Gelelektrophorese auf 2%-igem Agarosegel mit 8 µl PCR-Produkt ergab einen Bandennachweis bei 458 bp (1. Amplifikat) bzw. 454 bp (2. Amplifikat) (siehe Abbildung 6).

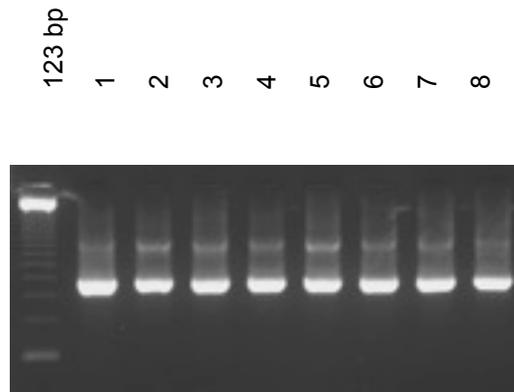


Abbildung 6: GS FLX HBV-DNA-Library PCR-II Amplifikationskontrolle

Darstellung der GS FLX HBV-DNA-Library PCR-II Amplifikationskontrolle für das zweite Amplifikat (Primerpaar F3/R3) mit Größenmarker 123 bp-Leiter (250 µg; 1 µg/µl, Invitrogen) (123 bp), beispielhaft für Patienten 1-8 zur BL.

4.10.1.7 PCR-Produkt Aufreinigung und Quantifizierung

Die Aufreinigung erfolgte mit *MinElute PCR Purifikations-Kit* (Qiagen) laut Standardprotokoll des Herstellers. Die Lagerung der Proben erfolgt bei -20 °C. Die Quantifizierung der HBV-DNA erfolgt mit *PicoGreen Fluorescence* (Invitrogen). Für die Sequenzierung wurde eine Menge von ca. 1-5 ng (0,5 ng/µl) benötigt. Es wurden Aliquots von 2×10^5 Molekülen/µl von der GS FLX HBV-DNA-Library in TBE-Puffer verdünnt und zu je 50 µl bei -15 bis -25 °C gelagert. Die Umrechnung der DNA-Library Konzentration (ng/µl) in das Äquivalent in Moleküle/µl erfolgte nach der Formel:

$$\text{Moleküle/}\mu\text{l} = \frac{(\text{Probe Konz. in ng/}\mu\text{l}) \times (6,022^* \times 10^{23})}{(656,6^{**} \times 10^9) \times (\text{Amplikonlänge in bp})}$$

*: entspricht der Avogadro-Zahl, ** Durchschnittsgewicht von Nukleotidpaaren in g/mol.

4.10.2 GS FLX Emulsions-PCR

Die emPCR erfolgte laut Standardprotokoll⁴⁷. Alle Schritte bis zur Amplifikation wurden zur Vermeidung einer Kontamination in einem separaten Arbeitsbereich unter einer Ultraviolett (UV)-Abzugshaube durchgeführt. Die weiteren Reaktionsschritte wurden im Amplifikationsarbeitsbereich durchgeführt.

Für die bidirektionale Sequenzierung wurde eine Hälfte des Reaktionsansatzes mit GS FLX emPCR Kit II prozessiert und die andere mit GS FLX emPCR Kit III (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT). Es erfolgte die Kalkulation der Reagenzien in Bezug auf zwei große Ladeansätze (à 30x60 mm) auf einer 70x75 mm Picotiterplatte (PTP) mit zwei beladbaren Regionen. Es wurden zum Laden je 8-10 Emulsionsansätze von GS FLX emPCR Kit II für die Laderegion 1 bzw. GS FLX emPCR Kit III zum Laden der Region 2 kalkuliert. Durch die Verwendung von MID-markierten Amplifikaten konnte die HBV-DNA gesammelt den GS FLX emPCRs zugeführt werden. Die prinzipiellen Schritte der GS FLX emPCR sind:

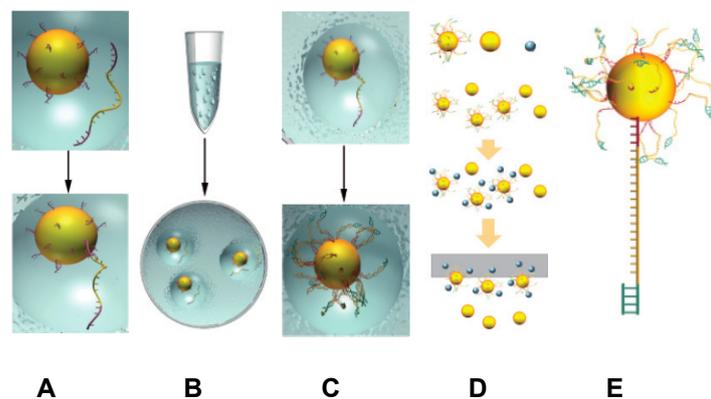


Abbildung 7: GS FLX Emulsions-PCR

Darstellung der prinzipiellen Schritte der emPCR mit GS FLX HBV-DNA-Library-Bindung (A), Emulsifikation (B), Amplifikation (C), *Bead*-Wiedergewinnung und Anreicherung (D), Anlagerung des Sequenzierungsprimers (E) (Quelle: GS FLX Amplikon DNA-Library, Preparation Method Manual, Dec 2007, Roche, abgedruckt mit Genehmigung durch 454 Life Science, Roche)

- Kovalente **DNA-Library-Bindung (A)** an *Capture-Beads* mittels Hybridisierung der Adaptor-primersequenz.
- **Emulsifikation (B)** der *Bead*-gebundenen DNA in einer Wasser-in-Öl Mischung
- **Klonale Amplifikation (C)** der emulsifizierten *Bead*-gebundenen DNA in der Mizelle per PCR und Bindung der neu amplifizierten DNA-Moleküle via *Bead*-gebundener Oligonukleotid-Primer (*Capture-Primer*), welche auch als PCR-Primer fungieren, ebenfalls an die *Beads*. Erreichte Kopienanzahl nach der Amplifikation ca. 10 bis 30 x 10⁶ Kopien/*Bead* und **Bead-Wiedergewinnung** mittels Waschen und Filtration.
- **DNA-Bead-Anreicherung (D)** durch Separierung von nicht mit DNA beladenen *Beads* von DNA-haltigen *Beads*. Hierzu erfolgte eine Bindung von Amplifikationsprimer A an magnetische *Beads* und hiernach die Kollektion am magnetischen Partikelkollektor. Durchbrechung der dop-

pelsträngigen Amplifikationsprodukte zur Separierung der DNA-haltigen *Beads* von den magnetischen *Beads*. Es verblieb die Population von *Bead* gebundenen Einzelstrang-DNA Fragmenten: die immobilisierte und amplifizierte GS FLX HBV-DNA-*Library*. Zuletzt erfolgt die **Anlagerung des Sequenzierungsprimers (E)**.

4.10.2.1 Präparation des Amplifikations-Mix

Der Inhalt der klonalen Amplifikations-Reagenzienbox wurde mit Ausnahme der Enzyme, die bei -15 bis -25 °C aufbewahrt wurden, aufgetaut und anschließend 5 s gevortexet, alle Komponenten in Mikrozentrifugenröhrchen für 10 s bei 2000 x g zentrifugiert und die Enzyme wieder bei -15 bis -25 °C gelagert. Die anderen Reagenzien wurden in den Amplifikationsarbeitsbereich gebracht.

Tabelle 12: Zusammensetzung des Amplifikations-Mix

181,62 µl x (N + 1)	Amplifikations-Mix
10,00 µl x (N + 1)	MgSO ₄
2,08 µl x (N + 1)	Amplifikationsprimer-Mix (A bzw. B)
6,00 µl x (N + 1)	<i>Platinum HiFi Taq</i> Polymerase
0,30 µl x (N + 1)	<i>PPiase</i>

Der Amplifikations-Mix wurde entsprechend der benötigten Emulsionsreaktionsmenge vorbereitet (siehe Tabelle 12), 5 s gevortexet und bei +2 °C bis +8 °C bis zur Verwendung aufbewahrt. Je nachdem, ob GS FLX emPCR Kit II oder III verwendet wurde, kam Amplifikationsprimer-Mix A bzw. B zum Einsatz.

4.10.2.2 GS FLX HBV-DNA-Library-Bindung

Es erfolgte die Herstellung von 1x *Capture-Bead-Waschpuffer* aus 10x-fachem Konzentrat. Die GS FLX DNA-*Capture-Beads* (Stockkonzentration 10.000 *Beads*/µl) wurden gevortexet, 450.000 *Beads* (entspricht 45 µl) pro Reaktion zur Immobilisation der amplifizierten GS FLX HBV-DNA-*Library* abgenommen, d.h. für 8 Reaktionen 360 µl, und in ein 1,5 ml-Röhrchen gegeben. Ein Pellet der *Beads* wurde durch 10 s Minizentrifugierung bei 2000 x g, Rotation des Röhrchen um 180° und erneute 10 s Minizentrifugierung gewonnen. Der Überstand wurde entfernt, 500 µl 1x *Capture-Bead-Waschpuffer* hinzugegeben und 5 s zur Resuspendierung gevortexet. Die Pelletierung und Resuspendierung wurden nach obigem Prinzip einmal wiederholt. Nach erneuter Pelletierung wurde der Überstand vorsichtig entnommen und verworfen. Das *Bead-Pellet* wurde in 50 µl 1x *Capture-Bead-Waschpuffer* pro Reaktion (d.h. bei 8 Reaktionen

400 µl) resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden 30 µl Überstand pro Reaktion (d.h. bei 8 Reaktionen 240 µl) entnommen und verworfen.

Für multiple Reaktionen wurde das Volumen gevortext und das exakte *Bead*-Suspensionsvolumen mittels einer Pipettenmessung bestimmt. Äquivalente Suspensionsvolumina wurden in 0,2 ml PCR-Röhrchen entsprechend der Anzahl geplanter Emulsionsreaktionen aliquotiert (z.B. 8). Die *Capture-Beads* befanden sich in ~20 µl Puffer pro Reaktion.

Die auf 2×10^5 Moleküle/µl quantifizierten und titrierten GS FLX HBV-DNA-*Library* Aliquots wurden aufgetaut und zu äquivalenten Volumina zusammengefügt. Zu jedem *Capture-Bead*-Röhrchen wurde 2,25 µl des GS FLX HBV-DNA-*Library* Pools hinzugefügt (450.000 *Beads* pro Emulsion und 1 cpb (*target copy per bead*)) und 5 s gevortext.

4.10.2.3 Emulsifikation

Pro Emulsionsreaktion wurde ein 2 ml Emulsionsöl-Röhrchen (500 µl) 10 s gevortext und anschließend je 240 µl *Mock*-Amplifikations-Mix hinzugegeben. Die Röhrchen wurden im *TissueLyser* zur Erzeugung einer Emulsion für 5 min bei 25 Schlägen/s geschüttelt. Währenddessen wurde je 160 µl Amplifikations-Mix zu den GS FLX HBV-DNA-*Library Bead*-Röhrchen gegeben. Der Mix wurde dreimal auf- und abpipettiert und den Emulsionröhrchen hinzugefügt und 5 min bei 15 Schlägen/s im *TissueLyser* geschüttelt.

4.10.2.4 Amplifikation

Jede Emulsionreaktion wurde zu 100 µl in 8 x 0,2 ml PCR-Röhrchen aufgeteilt und entsprechend Tabelle 13 amplifiziert.

Tabelle 13: Dauer und Reaktionstemperaturen der GS FLX emPCR

95 °C	4 min		Heißstart
94 °C	30 s	40 Zyklen	Amplifikation
58 °C	60 s		
68 °C	90 s		
94 °C	30 s	13 Zyklen	Hybridisierungsextension
58 °C	6 min		
10 °C	~		

Nach der Amplifikation wurden die Emulsionen auf Intaktheit geprüft und ggf. Röhrchen mit aufgelöster Emulsion verworfen.

4.10.2.5 Bead-Wiedergewinnung

Bead-Resuspension

1x DNA-Bead-Waschpuffer wurde aus 5x Konzentrat und 1x Anreicherungsflüssigkeit aus 4x Konzentrat hergestellt. Zur Herabsetzung der Viskosität der Emulsion wurde pro Röhrchen 100 µl Isopropanol hinzugefügt und der Emulsions-Isopropanol-Mix mittels einer 10 ml Spritze mit 16 G stumpfer, flacher Nadel aus jedem PCR-Röhrchen aufgezogen. Weitere 100 µl Isopropanol wurden in jedes PCR-Röhrchen gegeben, für 10 s gevortextet, kurz zentrifugiert und mit der Spritze aufgenommen.

Emulsionsbrechung und Bead-Wäsche

1. Isopropanol-Wäsche: Die Spritze wurde bis zur 9 ml Markierung mit frischem Isopropanol aufgefüllt. Es wurde 1 ml Luft aufgezogen, um die Vermischung der Emulsion und des Isopropanols zu erleichtern. Bei invertierter Spritze wurde eine *Swin-Lok*-Filtereinheit mit Nylonfilter vor die 16 G Nadel gesetzt und die Emulsion mit dem Isopropanol durch starkes Schütteln für 5 s vermischt. Vorsichtig wurde der Inhalt der Spritze über die Filtereinheit in ein Bleichmittel enthaltendes Gefäß gegeben. Die HBV-DNA-*Library-Beads* blieben im Filter zurück, während das Öl mit dem Isopropanol ausgewaschen wurde. 2. Isopropanol-Wäsche: 9 ml frisches Isopropanol wurde durch die Nadel und den *Swin-Lok*-Filter in die Spritze aufgezogen, bei invertierter Spritze 0,5 ml Luft aspiriert, 5 s kräftig geschüttelt und der Inhalt durch den Filter in ein Abfallgefäß gedrückt. Die 3. Isopropanol-Wäsche: Erfolgte wie die 2. Isopropanol-Wäsche. Danach erfolgte die Spritzenwäsche analog zur 2. Isopropanol-Wäsche mit 6 ml 1x DNA-Bead-Waschpuffer und hiernach mit 9 ml 1x Anreicherungsflüssigkeit.

Bead-Wiedergewinnung

0,5 ml 1x Anreicherungsflüssigkeit wurden in die Spritze zur Resuspendierung der amplifizierten HBV-DNA-*Library-Beads* aufgezogen. Die *Swin-Lok*-Filtereinheit wurde abmontiert und der Inhalt der Spritze in ein 1,5 ml-Röhrchen überführt. Die Filtereinheit wurde wieder aufmontiert, 0,5 ml 1x Anreicherungsflüssigkeit zur erneuten Filterspülung aufgezogen und der Inhalt nach Abmontierung des Filters in das gleiche 1,5 ml-Röhrchen zur Suspension gegeben. Die Pelletierung der *Beads* erfolgte in der Minifuge bei 2000 x g für 10 s, Rotation um 180 °C und erneuter Zentrifugierung bei 2000 x g für 10 s. Es wurde so viel Überstand entfernt wie möglich ohne die *Beads* zu verwirbeln. 100 µl 1x Anreicherungsflüssigkeit wurden pro Reaktion hinzugegeben und gevortextet. Alle amplifizierten mit Doppelstrang-DNA beladenen *Beads* der GS FLX HBV-DNA-*Library* befanden sich nun in 1x Anreicherungsflüssigkeit in einem 1,5 ml-Röhrchen.

4.10.2.6 Bead-Anreicherung

Präparation der Anreicherungs-Beads

Das Anreicherungs-*Bead*-Röhrchen wurde für 1 min gevortext. In ein 1,5 ml-Röhrchen wurden 1 ml 1x Anreicherungsflüssigkeit und 20 µl Anreicherungs-*Beads* pro Emulsionsreaktion (bis zu 4 Reaktionen) gegeben. Die verdünnten Anreicherungs-*Beads* für 5 s gevortext und in einen magnetischen Partikelkollektor (MPC) gestellt, wo eine Pelletierung der paramagnetischen Anreicherungs-*Beads* an der Seitenwand des Röhrchens erfolgte. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Das Röhrchen wurde vom MPC entfernt und mit 100 µl Anreicherungsflüssigkeit pro Reaktion resuspendiert und 3 s gevortext.

Anreicherung der DNA-Beads

100 µl der gewaschenen Anreicherungs-*Beads* wurden pro Reaktion zu den amplifizierten DNA-*Beads* gegeben und vorsichtig auf- und abpipettiert. Es erfolgte eine Inkubation von 5 min auf dem *LabQuake*-Röhrchen-Roller bei Raumtemperatur. Das Volumen der *Beadsuspension* wurde auf 1 ml mit 1x Anreicherungsflüssigkeit aufgefüllt. 1. *Bead*-Wäsche: Das Röhrchen wurde am MPC platziert, 2 min zur Pelletsammlung der paramagnetischen Anreicherungs-*Beads* an der Seite des Mikrofugen-Röhrchens zugewartet und hiernach der Magnet einige Male invertiert. Der Überstand mit allen nicht mit DNA angereicherten *Beads* wurde entnommen und zum etwaigen *Troubleshooting* bis zum erfolgreichen Abschluss der Sequenzierreaktion aufgehoben. Die Röhrchen wurden vom MPC entfernt und vorsichtig in 1 ml 1x Anreicherungsflüssigkeit resuspendiert. Zweite und dritte *Bead*-Wäsche wie erste *Bead*-Wäsche, letztere ohne Resuspendierung in Anreicherungsflüssigkeit.

Sammlung der angereicherten DNA-Beads

Die *Melt-Solution* wurde aus 9,875 ml molekularbiologisch reinem Wasser und 0,125 ml NaOH (10N) sowie 1x Anlagerungs-Puffer aus 10x Konzentrat hergestellt.

Nach der 3. *Bead*-Wäsche wurden die Röhrchen vom MPC entfernt, und das Pellet in 80 µl *Melt-Solution* resuspendiert, 5 s gevortext und in den MPC zurückgestellt. Der Überstand, der die angereicherten *Beads* enthielt, wurde in ein separates 0,2 ml Röhrchen transferiert. Dieser Schritt wurde zur besseren DNA-*Bead*-Anreicherung wiederholt, wobei der Überstand im gleichen 0,2 ml Röhrchen zusammengefügt wurde. Die angereicherten DNA-*Beads* wurden durch 10 s Zentrifugierung bei 2000 x g, Rotation um 180° und erneute 10 s Zentrifugierung pelletiert. Der Überstand wurde entfernt, die angereicherten DNA-*Beads* in 100 µl 1x Anlagerungs-Puffer resuspendiert, erneut wie oben beschrieben pelletiert und der Überstand entfernt. Dies wurde insgesamt dreimal durchgeführt und beim dritten Mal so viel Überstand wie möglich entnommen.

4.10.2.7 Anlagerung des Sequenzierungsprimers

Pro Reaktion wurden 15 µl Anlagerungs-Puffer und 3 µl Sequenzierungsprimer zum DNA *Bead*-Pellet entsprechend dem verwendeten GS FLX emPCR Kit II bzw. III hinzugefügt. Die 0,2 ml PCR-Röhrchen wurden hiernach inkubiert (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Dauer und Reaktionstemperaturen der Anlagerung des Sequenzierungsprimers

65 °C	5 min
Absenken um 0,1 °C/s auf 50 °C	
50 °C	1 min
Absenken um 0,1 °C/s auf 40 °C	
40 °C	1 min
Absenken um 0,1 °C/s auf 15 °C	
15 °C	~

Nach Abschluss der Inkubation wurden 100 µl Anlagerungs-Puffer hinzugegeben, erneut nach obigem Prinzip pelletiert und der Überstand entfernt. Die DNA-*Beads* wurden mit 200 µl 1x Anlagerungs-Puffer gewaschen und in 100 µl 1x Anlagerungs-Puffer resuspendiert. Hiernach erfolgte die Quantifizierung der DNA-*Beads* in 10 µl Aliquots und Lagerung bei +2 bis +8 °C (max. 1 Monat).

4.10.3 GS FLX Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mittels des Genome Sequencer FLX 454 (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) laut Standardprotokoll des Herstellers⁴³. Die PTP (PTP, Grösse 70x75mm) wurde in zwei große beladbare Regionen aufgeteilt (2x Laderegion à 30x 60mm) und das GS LR70 Kit verwendet für lange *Reads*.

4.10.3.1 PTP-Präparation

Die Reagenzien des GS FLX Sequenzier-Kits wurden bei Raumtemperatur mit Ausnahme der Sequenzierungs-Enzyme aufgetaut, anschließend bei +2 bis +8 °C gelagert und der *Bead*-Puffer auf Eis gestellt. Eine Vorwäsche des GS FLX Sequenziergeräts erfolgte.

Präparation Bead-Puffer 2 und 3

Anhand der DNA-*Bead*-Konzentration der emPCR wurde mittels Übersichtstabelle des Herstellers das Volumen kalkuliert, welches sich für die Beladung einer PTP-Region ergab. Bei einer DNA-*Bead* Konzentration von 2000 DNA-*Beads*/µl wurde eine große PTP mit zwei Regionen mit je 750.000 DNA-*Beads* pro Region entsprechend 2x 375 µl Volumen DNA-*Beads* und 2x 18 µl Kontroll-DNA-*Beads* beladen.

Die DNA-*Beads* wurden gevortexet, das kalkulierte Volumen abgenommen, in ein 2 ml Röhrchen gefüllt und das Volumen der Kontroll-*Beads* hinzugegeben. Es wurde je ein separates Röhrchen pro Region verwendet. Die *Beads* wurden für 1 min bei 10.000 rpm (9300 x g RCF) zentrifugiert, um 180° gedreht und erneut 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das zu verwerfende Überstandsvolumen wurde (anhand herstellereigener Tabelle) für ein Zielladevolumen von 2x 30 µl kalkuliert.

Nebenbei wurde der DNA-*Bead* Inkubations-Mix vorbereitet (siehe Tabelle 15), und in jedes der zwei im Kit enthaltenen 1,7 ml Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben, gevortexet, im *Short-Spin* anzentrifugiert und der Überstand des *Bead*-Puffer 3 verworfen.

Tabelle 15: Zusammensetzung des DNA-*Bead* Inkubations-Mix

2x 785 µl	<i>Bead</i> -Puffer 3
2x 75 µl	Polymerase-Cofaktor
2x 150 µl	DNA-Polymerase
2x 1010 µl	Totales Volumen

Für zwei große Laderegionen wurden je 870 µl DNA-*Bead* Inkubations-Mix in die DNA-*Beads* enthaltenden Mikrozentrifugen-Röhrchen gegeben, gevortexet und auf dem *Lab Rotator* bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Der restliche DNA-*Bead* Inkubations-Mix wurde auf Eis gestellt und später für die *Packing*-*Bead* Inkubation benutzt.

Präparation der Packing-Beads

Die *Packing-Beads* wurden dreimal in *Bead*-Puffer 2 gewaschen. Hierzu wurde je 1 ml *Bead*-Puffer 2 in die zwei Röhrchen der *Packing-Beads* hinzugegeben, gevortexet und bei 10.000 rpm (9300 x g RCF) zentrifugiert und der Überstand entfernt. Hiernach wurden die *Packing-Beads* auf Eis gestellt. Für zwei große zu beladende Regionen wurden 360 µl *Packing-Beads* und 80 µl DNA-*Bead* Inkubations-Mix (siehe Tabelle 15), in zwei 2 ml Röhrchen gefüllt (Gesamtvolumen je 440 µl) und die Röhrchen auf dem *Lab Rotator* 30-40 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Präparation der Enzym-Beads

Die Enzym-*Beads* wurden mittels MPC pelletiert. Dazu wurden die zwei Enzym-*Bead*-Röhrchen 30 s an den MPC gestellt, der MPC mehrmals gewendet, der Überstand entfernt und die Röhrchen vom MPC entfernt. Die Enzym-*Beads* wurden dreimal gewaschen: 1 ml *Bead*-Puffer 2 wurde zu jedem Röhrchen der Enzym-*Beads* gegeben, gevortexet, die Röhrchen an den MPC gestellt, mehrmals gewendet und 30 s gewartet, bis sich die *Beads* abgesetzt hatten. Der Überstand wurde entfernt und die Röhrchen vom MPC entfernt. Nach dem dritten Waschgang wurde *Bead*-Puffer 2 1000 µl zu jedem Röhrchen gegeben und resuspendiert. Zwei 2 ml Röhrchen wurden mit je 980 µl *Bead*-Puffer 2 und 920 µl Enzym-*Beads* bestückt und auf Eis gestellt, ebenso der Rest *Bead*-Puffer 2.

4.10.3.3 Beladung der PTP

Auftragen der DNA-Beads (1. Schicht)

Nach 30 min Inkubation der DNA-*Beads* wurden je 960 µl *Bead*-Puffer 2 zu den zwei DNA-*Beads*-Röhrchen (je 900 µl) hinzugefügt, 20 s gevortexet und auf Eis gestellt.

Mittels eines Pipettors mit 2 ml Pipettenspitze wurde so viel wie möglich vom *Bead*-Puffer 2 aus der angefeuchteten PTP in der Ablagerungsvorrichtung herausgezogen. Die DNA-*Bead* Suspension wurde für 5 s gevortexet, mittels Pipettor (1860 µl) die DNA-*Bead* Suspension des ersten Röhrchen komplett aufgenommen und damit die erste Region der PTP beladen. Mit der zweiten Region wurde ebenso verfahren. Die beladene PTP wurde 10 min zur Setzung der *Beads* in den *Wells* ruhen gelassen.

Auftragen der Packing-Beads (2. Schicht)

Nach 10 min wurde der DNA-*Bead*-Inkubationsüberstand vorsichtig und langsam aus jeder PTP-Region entfernt und in ein Set von 2 ml Röhrchen überführt. Der gesammelter Überstand wurde 10 s bei 10.000 rpm (9300 x g RCF) zentrifugiert, um 180° gedreht und für 10 s zentrifugiert. Der Überstand von zweimal 1460 µl wurde abgenommen, ohne das Pellet zu verwirbeln, und zu den *Packing-Beads* gegeben.

Die verdünnten *Packing-Beads* wurden 5 s gevortexet, durch hoch- und runterpipettieren vermischt und auf jede der zwei Regionen der PTP aufgetragen und die beladene PTP 10 min bei 1430 x g RCF zentrifugiert.

Auftragen der Enzym-Beads (3. Schicht)

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Die gewaschenen Enzym-*Beads* wurden gevortexet, durch Hoch- und Runterpipettieren vermischt und auf jede der zwei Regionen der PTP aufgetragen und die beladene PTP 10 min bei 1430 x g RCF zentrifugiert.

4.10.3.4 GS FLX Sequenzierung

Die Enzyme des Sequenzier-Kits wurden aufgetaut und auf Eis gestellt. 1000 µl DTT wurden zu jeder CB-Pufferflasche hinzugegeben und vorsichtig gemixt. Die Flaschen mit dem supplementären CB-Puffer wurden linksseitig, der aufgetaute Sequenzierreagenzien-Einsatz rechtsseitig in die Kassette gestellt. Zum Apyrase-Puffer wurden 164 µl Apyrase-Reagenz und dem dATP-Puffer-Röhrchen 1500 µl dATP-Reagenz hinzugefügt. Der Reagenzien-Einsatz wurde aus der Kassette herausgenommen und einige Male zum Mixen invertiert. Die vier CB-Puffer-Flaschen und 11 Reagenzien-Röhrchen wurden ohne Kappe mit der Kassette in das Instrument eingesetzt und der Deckel verschlossen.

Nach Auswahl des Sequenzierprogramms am GS FLX Sequenzierer wurde die PTP von der *Bead*-Ablagerungsvorrichtung nach Abnehmen des zentrifugierten Überstands der Enzym-*Beads* getrennt, in das Sequenziergerät eingefügt und der Sequenzierlauf mit 100 Zyklen gestartet.

4.10.4 GS FLX Datenauswertung

Der Rohdatensatz bestand aus einem Set von digitalen Bildern (PIF-Files), von welchem die HBV-DNA-*Library* Fragmente (*Reads*) durch die *GS FLX Amplikon Variant Analyzer Software* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT) zu Nukleotidsequenzen determiniert wurden. Die Sequenzen wurden anhand der Qualitätsscores geclippt (*PHRED SCORE* ≥ 10) und hiernach mit Hilfe von *SMALT* (Wellcome Trust Sanger Institute) zu dem Referenzgenome AM282986 (Hepatitis B Virus (Subtyp ADW2), Genotyp A, komplettes Genom) gemappt. Alle mit mindestens 100 bp gemappten Sequenzen wurden für die Erstellung der *Pileup*-Dateien verwendet.

Varianten wurden ab einer Prävalenz ≥ 1 an der HBV-Population berücksichtigt. Der *Cut-off* von $\geq 1\%$ wurde gewählt, um technisch bedingte Fehlinkorporationen von echten Minorvarianten zu unterscheiden^{38,39}. Varianten mit Prävalenz $< 5\%$ an der patientenspezifischen Viruspopulation wurden als Minorvarianten bezeichnet, mit Prävalenz zwischen 5-20% als Intermediärvarianten und mit Prävalenz $> 20\%$ als dominante Varianten.

4.11 Direkte Sequenzierung mittels *TRUGENE™ HBV Genotyping Kit (OpenGene™ DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostic, USA)*

Nach PCR-Amplifikation der aus Serum extrahierten DNA-Proben amplifiziert wurden bidirektionale Sequenzen der RT und des HBsAg durch eine *CLIP*-Reaktion unter Verwendung von zwei verschiedenen fluoreszierend markierten Primern (Cy5 und Cy5.5) generiert und unter Verwendung der Elektrophorese-Einheit, bestehend aus dem *Long-Read Tower™* DNA-Sequenzierer und *MicroCel™* Kassette, sequenziert. Abgedeckt wurden die Aminosäuren 99 bis 280 des POL-Gens und 101 bis 237 im S-Gen der Genotypen A bis G. Die Versuchsdurchführung erfolgte laut Standardprotokoll des Herstellers⁴⁸.

4.11.1 PCR-Amplifikation

Tabelle 16: Zusammensetzung des MM der TG-PCR

9 µl x (N + 1)	Nuklease freies Wasser
4,4 µl x (N + 1)	Primer-dNTP Mix
2,8 µl x (N + 1)	Puffer
2,8 µl x (N + 1)	DMSO
2,8 µl x (N + 1)	Ammoniumsulfat
37,1 µl x (N + 1)	Aqua dest.
0,3 µl x (N + 1)	PCR-Enzym

Tabelle 17: Dauer und Reaktionstemperaturen der TG-PCR

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	40 Zyklen
60 °C	30 s	
72 °C	1 min 15 s	
72 °C	3 min	

Die Reagenzien (siehe Tabelle 16) wurden mit Ausnahme des PCR-Enzyms aufgetaut, gevortexet, im *Short-Spin* zentrifugiert und auf Eis gestellt. In einem 1,5 ml autoklavierten Eppendorfröhrchen wurde der MM in oben aufgeführter Reihenfolge zubereitet und in autoklavierte, dünnwandige 0,2 ml PCR-Röhrchen zu je 20 µl aliquotiert. 5 µl extrahierte DNA wurden je Röhrchen hinzugefügt und amplifiziert (siehe Tabelle 17) und analog mit einer Negativ- und Positivkontrolle aus dem Reagenzien-Kit verfahren.

4.11.2 *CLIP*-Amplifikations-Reaktion

Für jede Patientenprobe wurde ein 0,5 ml Eppendorfröhrchen vorbereitet und nummeriert, sowie je vier RNase freie PCR-Röhrchen mit A, C, G, T beschriftet. Die *CLIP*-Reagenzien wurden mit Ausnahme des *CLIP*-Enzyms auf Raumtemperatur gebracht, gevortexet, kurz mikrozentrifugiert und auf Eis gestellt. Auf Eis stehend wurde in jedes PCR-Röhrchen 7 µl *CLIP*-Mix (A, C, G, T) entsprechend der Zuordnung auf den Boden des Gefäßes pipettiert und verschlossen.

Tabelle 18: Zusammensetzung des MM der CLIP-Reaktion

12,3 µl x (N + 1)	CLIP-Nuklease freies Wasser
5,8 µl x (N + 1)	CLIP-Puffer
2,9 µl x (N + 1)	CLIP-Enzyme

Tabelle 19: Dauer und Reaktionstemperaturen der CLIP-Reaktion

94 °C	3 min	30 Zyklen
94 °C	30 s	
57 °C	30 s	
70 °C	1 min 15 s	
70 °C	3 min	

Der CLIP-MM wurde zusammengestellt (siehe Tabelle 18), vermischt, mikrozentrifugiert und zu je 20 µl in die bereitgestellten 0,5 ml Eppendorfröhrchen aliquotiert. 5 µl des PCR-Amplikons entsprechend der Probenzuordnung bzw. Positiv-/Negativkontrolle wurden hinzugefügt, gevortextet und kurz mikrozentrifugiert. Auf Eis stehend wurden je 5 µl des CLIP-MM (beinhaltend PCR-Amplikon) vom Eppendorfröhrchen 1 in das erste Set PCR-Röhrchen A, C, G, T transferiert. Analog wurde für die weiteren Proben verfahren. Nach jeder Zugabe des CLIP-MM zu einem PCR-Röhrchen wurde die Pipettenspitze gewechselt. Die PCR-Röhrchen wurden umgehend verschlossen, zum Mischen mikrozentrifugiert und im vorgeheizten (94 °C) Zyklus amplifiziert (siehe Tabelle 19).

Umgehend nach der erfolgreichen Amplifikation wurden 12 µl Stop-Ladefärbung in jedes PCR-Röhrchen gegeben, kurz gevortextet, die Proben 3 min bei 85 °C denaturiert und sofort auf Eis gestellt.

4.11.2.1 Sequenzierung

Die *SureFill*TM 6%-Sequenzierungs-Gel Kartusche wurde auf Raumtemperatur äquilibriert, das Schlauchsystem der Gelkartusche entlüftet, die *MicroCel*TM-Kassette in den *GelToaster*TM gelegt, das Acrylamid-Gel eingefüllt und 3 min gehärtet. Anschließend wurde die *MicroCel*TM-Kassette in den *Longread Tower*TM eingesetzt und 1x TBE Puffer in die obere und untere Kammer gefüllt. Für 5 bis maximal 10 min erfolgte ein Vorlauf mit Aufheizen auf 60 °C.

Unmittelbar vor dem Laden der Gelkammern wurden diese mit 1x TBE Puffer von Luftblasen freigespült. Je 1,5 µl amplifizierte DNA aus den ersten vier PCR-Röhrchen (Probe 1: A, C, G, T) wurden in die vier Gelkammern pipettiert. 16 Kammern (vier Proben entsprechend) konnten für einen Analyselauf befüllt und analysiert werden. Nach Platzierung des Kondensationsdeckels wurde die Lasertechnik-gestützte Sequenzierung durchgeführt (siehe Tabelle 20).

Tabelle 20: Parameter der TG-Sequenzierung

Temperatur	60 °C
Spannung	2000 V
Laserkraft	50%
Sampling-Intervall	0,5 s
Laufzeit	70 min

4.11.3 Genotyp-und Variantenanalyse

Mittels der *GeneObjects™ Software* (OpenGene™ DNA Sequenziersystem, Siemens Healthcare Diagnostic, USA) wurde ein *Real-Time-Basecalling* der Proben durchgeführt. Jedes Paar der bidirektional ermittelten Sequenzen wurde zu einer Konsensussequenz kombiniert und manuell im *Assay-Manager* kontrolliert. Die Konsensussequenz wurde mit der am meisten Homologien aufweisenden Referenzsequenz der *HBV-GeneLibrary™* (OpenGene™ DNA Sequenzierungssystem, Siemens Healthcare Diagnostic, USA) aligniert und der Genotyp und die RT- und HBsAg-Varianten bestimmt.

4.12 Sequenzierung mittels *Line Probe Assay INNO-LiPa HBV DRv2 und v3* (Innogenetics, Belgium)

Basierend auf dem Prinzip der Reversen Hybridisierung von immobilisierten Oligonukleotid-Sonden erlaubt dieses Testsystem nach PCR-Amplifikation von extrahierter DNA die Detektion von vorbekannten Punktmutationen von ca. 5%-Anteil der viralen Gesamtpopulation.

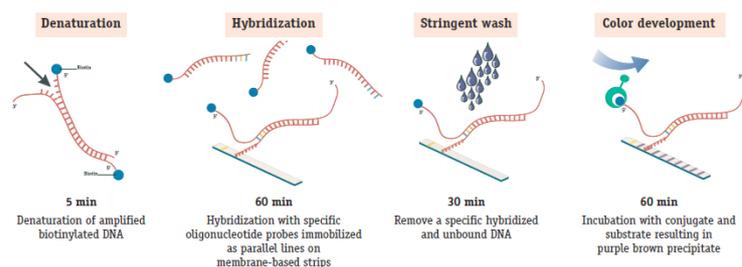


Abbildung 9: Reverse Hybridisierung mittels INNO-LiPa

Darstellung der Reversen Hybridisierungs-Durchführung mittels INNO-LiPa System. Hierbei sind die Oligonukleotid-Sonden als parallele Banden auf einem Nitrozellulose-Membranstreifen fixiert und zeigen eine Farbreaktion bei positivem DNA-Vorkommen.

Quelle: Innogenetics, Belgium (abgedruckt mit Genehmigung)

4.12.1 HBV-DNA Amplifikation

Die Durchführung erfolgte nach dem Standardprotokoll des Herstellers (*INNO-LiPa HBV DRv2 und v3*, Innogenetics, Belgium). Der INNO-LiPa MM wurde zusammengestellt (siehe Tabelle 21), kurz gemischt und 30 µl des MM in autoklavierte Amplifikationsröhrchen verteilt. 20 µl gereinigte DNA oder 20 µl destilliertes Wasser für die Negativkontrolle wurden in die entsprechenden PCR-Röhrchen hinzugefügt, durch auf-/ abpipettieren vermischt und amplifiziert (siehe Tabelle 22).

Tabelle 21: Zusammensetzung des MM der INNO-LiPa-PCR

22,2 µl x (N + 1)	Autoklaviertes destilliertes Wasser
5,0 µl x (N + 1)	10x <i>Qiagen</i> PCR-Puffer
0,4 µl x (N + 1)	dNTP-Mix (25 mM)
1,0 µl x (N + 1)	Primer-Mix
1,0 µl x (N + 1)	MgCl ₂ (25 mM)
0,4 µl x (N + 1)	<i>Qiagen HotStarTaq DNA-Polymerase</i> 5U/µl

Tabelle 22: Dauer und Reaktionstemperaturen INNO-LiPa

95 °C	15 min	
94 °C	30 s	50 Zyklen
55 °C	30 s	
72 °C	40 s	
72 °C	10 min	

Nach dem Amplifikationsprozess wurden die Proben umgehend mit den INNO-LiPa HBV DR v2/v3-Teststreifen benutzt oder bei -15 bis -25 °C eingelagert. Die Amplifikationskontrolle per Gelelektrophorese auf 2%-igem Agarosegel mit 5 µl PCR-Produkt ergab einen Bandennachweis bei 867 bp (siehe Abbildung 10).

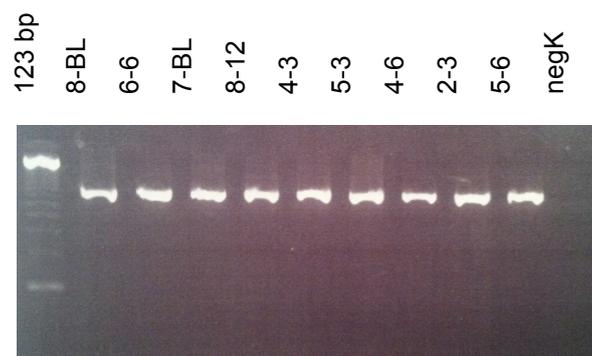


Abbildung 10: Amplifikations-Produkt der INNO-LiPa PCR

Darstellung der INNO-LiPa-PCR Amplifikationskontrolle beispielhaft für die Patienten 2, 4, 5, 6, 7, 8 zu verschiedenen Zeitpunkten (BL: Baseline, 3: Monat 3, 6: Monat 6, 12: Monat 12) mit Negativkontrolle (negK) und Grössenkontrolle mit 123 bp-Leiter (123 bp).

4.12.2 Denaturierung und Hybridisierung

Die Hybridisierungslösung und die *Stringent*-Waschlösung wurden zur Kristalllösung im Wasserbad (37-49 °C) gewärmt. Für jede Probe wurde ein Teststreifen entnommen und eine Wanne in der Schale vorbereitet. 10 µl Denaturierungslösung wurden mit der Pipette in jede Wanne gegeben, anschließend 10 µl PCR-Produkt bzw. Negativkontrolle hinzugegeben und für 5 min bei Raumtemperatur denaturiert.

2 ml Hybridisierungslösung wurden in jede Wanne gefüllt und ein Teststreifen mit der Markierungslinie nach oben mittels Pinzette hinzugelegt. Es wurde sichergestellt, dass die Teststreifen völlig in die Lösung eintauchten, immer mit Flüssigkeit bedeckt waren und frei beweglich. Die Schale wurde im Schüttelwasserbad (ca. 80 U/m, 49±0,5 °C) für 60 min inkubiert und hiernach entnommen.

4.12.2.1 Waschen der Teststreifen

Die Flüssigkeit wurde mittels Vakuumpipette aus der Wanne entnommen, 2 ml *Stringent*-Waschlösung in jede Wanne gefüllt und der Teststreifen durch Rütteln der Schale 1 min bei 20-25 °C gespült. Die Lösung wurde aus jeder Wanne wieder herausgesaugt. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt. Erneut wurden 2 ml *Stringent*-Waschlösung in jede Wanne gefüllt und die Schale im Schüttelwasserbad (ca. 80 U/m, 49±0,5 °C) für 30 min inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde die Spülarbeitslösung entsprechend der benötigten Menge in einer 5-fachen Verdünnung aus dem Spüllösungskonzentrat und destilliertem Wasser hergestellt. Ebenso wurde die Konjugatlösung aus Konjugatkonzentrat 100-fach verdünnt in Konjugat-Verdünner hergestellt.

4.12.3 Farbentwicklung

Die Lösung wurde mittels Vakuumpipette aus der leicht geneigten Wanne entfernt, 2 ml Spülarbeitslösung in jede Wanne gefüllt und die Teststreifen durch Rütteln der Schale 1 min bei Raumtemperatur gewaschen. Die Lösung wurde aus jeder Wanne abgesaugt und der Waschschritt einmal wiederholt. 2 ml Konjugat-Arbeitslösung wurden in jede Wanne gefüllt und im Schüttler (ca. 50 U/m, 20-25 °C) für 30 min inkubiert. Zum Vorbereiten der Substratarbeitslösung wurde das Substratkonzentrat 100-fach in Substratpuffer verdünnt. Nach Ende der Inkubation wurde die Schale aus dem Schüttler genommen und mittels Vakuumpipette die Lösung aus jeder Wanne entfernt. 2 ml Spülarbeitslösung wurde in jede Wanne gefüllt und die Teststreifen durch Rütteln der Schale 1 min bei 20-25 °C gewaschen. Die Lösung wurde abgesaugt und dieser Schritt einmal wiederholt. 2 ml Substratpuffer wurde in jede Wanne gefüllt und die

Teststreifen durch Rütteln der Schale 1 min bei 20-25 °C gewaschen, die Lösung hiernach abgesaugt. 2 ml Substratarbeitslösung wurden in jede Wanne gefüllt, auf einen Schüttler bei 20-25 °C gestellt und für 30 min inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurde die Farbentwicklung durch Waschen der Teststreifen gestoppt, dazu die Schale aus dem Schüttler entfernt, die Lösung aus jeder Wanne absaugt und 2 ml destilliertes Wasser in jede Wanne gefüllt und für mindestens 3 min bei 20-25 °C auf den Schüttler gestellt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Jeder Teststreifen wurde mit einer Pinzette aus seiner Wanne entfernt und mit der Markierungslinie nach oben auf absorbierendes Papier gelegt. Die Teststreifen wurden vor dem Ablesen der Resultate vollständig getrocknet. Die entwickelten und trockenen Teststreifen wurden im Dunklen gelagert. Ein Test galt als positiv, wenn ein klares violett-braunes Band am Ende des Testverfahrens zu erkennen war mit positiver Kontrollbande. Die detektierten Varianten konnten mit Hilfe des Herstellereigenen Ableseschablone zugeordnet werden.

Durch den Einsatz von *INNO-LiPa HBV DRv2 und v3* konnten folgende NA-Resistenzvarianten nachgewiesen werden: rtL80V/I, rtV173G/L, rtL/M180A/T/V, rtM204I/S/V, rtN236T, rtT184SCGA/ILFM, rtS202G/C/I, rtA194T, rtI233V und rtM250I/L/V.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika zur Baseline

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Kohorte aus 18 Patienten mit chronischer HBV-Infektion untersucht, welche divers und über einen langen Zeitraum vorbehandelt waren mit Therapieversagen auf die vorangegangenen Therapieansätze mit NA. Die Charakteristika der Patienten zur BL sind in Tabelle 23 dargestellt.

Unter den Patienten befinden sich vier weibliche Patienten. Das mittlere Alter liegt bei 41 ± 14 (19-64) Jahren. Drei Patienten sind asiatischer Herkunft, vier afrikanisch und 11 europäisch. Die meisten der Patienten (50%) sind vom Genotyp-D, je drei Patienten (je 17%) Genotyp-A bzw. E, zwei Patienten (11%) Genotyp-C und ein Patient (5%) Genotyp-B.

Eine **Vorbehandlung** mit LAM und ADV ist bei allen Patienten erfolgt (mediane Behandlungsdauer LAM 20 ± 22 (8 bis 98) Monate und ADV 15 ± 11 (3 bis 43) Monate). Weiterhin besteht eine ETV-Vortherapie bei zwei Patienten (Patient 1 und 3, mediane Behandlungsdauer ETV $12 \pm 0,5$ (11 bis 12) Monate), eine LdT-Vortherapie bei einem Patienten (Patient 9, 11 Monate) und eine TDF-Vortherapie bei drei Patienten (Patienten 3, 15, 16, mediane Behandlungsdauer TDF 4 ± 25 (2 bis 47) Monate).

Zu Beginn der TDF-Monotherapie liegt die mediane Höhe der HBV-DNA-Serumkonzentration bei $7,8 \pm 0,7$ (6,3 bis 8,8) \log_{10} Kopien/ml. Der mediane ALT ULN liegt zur TDF-BL bei 21 ± 104 (-10 bis 442) U/l und bei vierzehn Patienten über dem Normalbereich.

Tabelle 23: Charakteristika der 18 chronisch HBV-infizierten Patienten zu Beginn der TDF-Monotherapie

Patient	w/m	Alter	Gewicht (kg)	HBeAg	HBV-GT	TDF-Monotherapie Dauer (Monate)	Vortherapie (Monate)				HBV-DNA (\log_{10} Kopien/ml)	ALT ULN (U/l)
							IFN	LAM	ADV	andere		
1	m	45	105	+	D	6	9	43	ETV 11	7,6	20	
2	w	45	52	+	B	12	12	29	17	6,7	6	
3	m	64	78	+	D	12		31	44	TDF 4 ; ETV 12	8,2	101
4	m	45	71	+	D	12	10	29	17		6,9	6
5	m	45	76	+	D	12		17	20		8,0	62
6	m	48	107	+	A	12		36	23		8,0	57
7	w	53	56	+	C	12	13	15	17		8,0	33
8	m	41	85	+	D	12	25	20	13		7,0	29
9	m	30	74	+	A	12		18	3	LdT 11	7,9	57
10	m	25	66	+	A	12		14	25		6,9	-7
11	m	31	75	+	E	12		13	8		7,5	-2
12	w	60	70	+	D	12	5	98	12		7,9	115
13	w	29	56	+	D	12	15	11	5		8,0	8
14	m	19	72	+	E	12		22	15		6,4	-10
15	m	49	78	+	D	12	7	35	14	TDF 2	6,3	-6
16	m	28	85	+	C	12		19	9	TDF 47	8,8	22
17	m	64	73	+	D	12		62	14		6,5	9
18	m	24	70	+	E	12		8	9		8,0	442

Darstellung der Charakteristika der Kohorte zur BL der TDF-Monotherapie mit Aufführung der Vortherapien, HBV-DNA (\log_{10} Kopien/ml) und ALT ULN (ALT-Wert über dem Normalbereich in U/l). w: weiblich; m: männlich; HBV-GT: HBV-Genotyp A-E.

5.2 Virologisches Ansprechen

Zu Therapiebeginn mit TDF findet sich bei allen Patienten unter einer Behandlung mit NA eine stark erhöhte Virämie (mediane HBV-DNA $7,8 \pm 0,7$ (6,3 bis 8,8) \log_{10} Kopien/ml (siehe Abbildung 11 und Tabelle 24). Innerhalb der ersten drei Monate nach Umstellung auf die TDF-Monotherapie kann bei allen Patienten ein deutlicher Abfall der Viruslast beobachtet werden (mediane HBV-DNA zu Monat 3 $4,8 \pm 1,0$ (3,1 bis 6,1) \log_{10} Kopien/ml. Hiernach reduziert sich die Abnahmedynamik zu Monat 6 bzw. 9 (mediane HBV-DNA zu Monat 6 $3,7 \pm 1,0$ (2,1-5,5) bzw. zu Monat 9 $3,6 \pm 0,9$ (2,2-5,4) \log_{10} Kopien/ml). Keiner der Patienten erreicht eine komplette Suppression der HBV-DNA im Verlauf der ersten zwölf Monate der TDF-Monotherapie. Vielmehr bleibt bei allen Patienten die Viruslast über der Detektionsgrenze von 35 Kopien/ml (1,54

\log_{10} Kopien/ml) im Sinne eines partiellen Ansprechens (mediane HBV-DNA zu Monat 12 $3,4 \pm 0,9$ (1,72 bis 4,9) \log_{10} Kopien/ml).

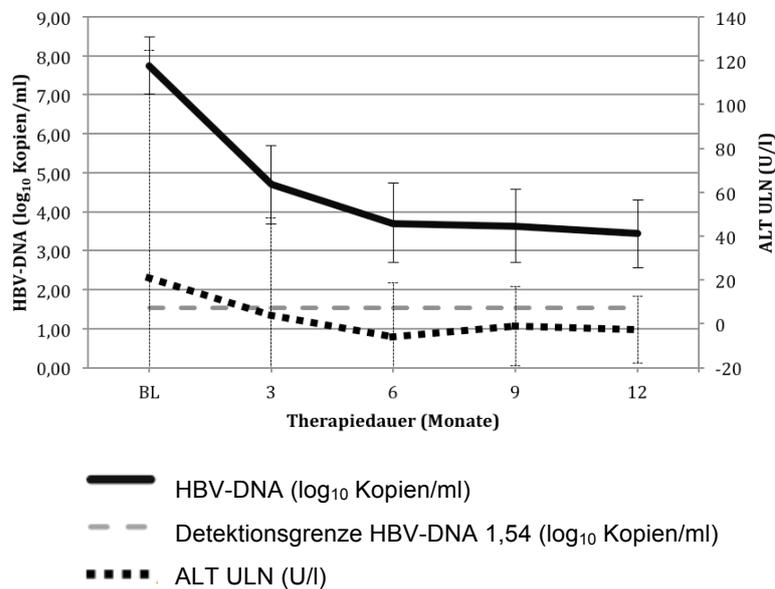


Abbildung 11: Medianer HBV-DNA und ALT Verlauf der Gesamtkohorte

Ausser bei Patient 15 nach TDF-Dosishalbung mit folgendem Wiederanstieg der Virämie, kommt es bei keinem Patienten zu einem viralen Durchbruch (Wiederanstieg der HBV-DNA $>1 \log_{10}$ Kopien/ml) während der TDF-Monotherapie.

Tabelle 24: HBV-DNA Einzelverläufe über die Dauer der TDF-Monotherapie

TDF-Therapie (Monate)	Patienten/ HBV-DNA (in \log_{10} Kopien/ml)																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
BL	7,6	6,68	8,21	6,9	8	8	8	6,98	7,9	6,88	7,54	7,92	8	6,38	6,3	8,8	6,46	8
3	3,09	3,53	6,06	4,73	5,43	6,05	4,41	4,68	3,98	4,29	5,23	5,99	5,77	3,97	5,18	5,5	3,56	3,08
6	2,09	2,29	4,15	4,27	5,46	4,89	3,93	3,43	3,55	2,5	3,84	4,45	4,76	3,58	3,4	5,16	2,95	2,23
9		2,18	2,69	4,28	5,43	4,51	3,93	3,83	2,67	2,96	3,26	3,5	3,97	3,63	4,44	5,04	2,59	2,42
12		2,14	1,72	3,93	3,69	3,96	4,1	3,49	2,82	2,52	2,56	2,56	3,44	3,86	4,28	4,92	2,58	2,61

5.3 Biochemisches Ansprechen

Ein kontinuierliches Absinken der ALT kann über den Verlauf der TDF-Monotherapie verzeichnet werden. Zur BL liegt bei vierzehn Patienten ein über den Normalwert erhöhter ALT-Wert vor, zu Monat 3 bei zwölf Patienten, zu Monat 6 und 9 bei sieben Patienten und zu Monat 12 bei fünf Patienten (Patienten 3, 5, 7, 8, 14). Der mediane ALT ULN-Wert liegt zur BL bei 21 ± 104

(-10 bis 442) U/l, zu Monat 3 bei 4 ± 44 (-18 bis 162) U/l, zu Monat 6 -6 ± 25 (-19 bis 88) U/l, zu Monat 9 -1 ± 18 (-19 bis 46) U/l und zu Monat 12 -3 ± 15 (-25 bis 33) U/l (siehe Abbildung 11).

5.4 Serologisches Ansprechen

Alle Patienten sind zur BL HBe-Antigen positiv. Patient 17 weist zur BL anti-HBeAg-Antikörper auf und zeigt als einziger Patient zu Monat 12 eine HBeAg-Serokonversion. Bei keinem Patienten kommt es innerhalb des Beobachtungszeitraums zu einem HBsAg-Verlust bzw. -Serokonversion.

5.5 Therapie-Adhärenz und medikamentöse Verträglichkeit

Aus den Aufzeichnungen aus den Patientenakten geht bei keinem Patienten ein Hinweis auf Non-Adhärenz zur TDF-Monotherapie hervor. Ferner sind bei allen Patienten regelmäßige Vorstellungen in der hepatologischen Ambulanz der Klinik für Innere Medizin mit Schwerpunkt auf Gastroenterologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum in Berlin, in etwa dreimonatigen Abständen verzeichnet. Die Verschreibung von TDF erfolgte in einer Packungsgröße von 90 Tabletten TDF (Viread® 245 mg), was auf eine ausreichende Verfügbarkeit der Medikation innerhalb dieses Zeitraums schließen lässt.

Insgesamt zeigt sich eine gute Verträglichkeit der Monotherapie mit TDF. Als häufigste Nebenwirkungen werden gastrointestinale Symptome u.a. Nausea, Vomitus und epigastrische Schmerzen angegeben (7x), weiterhin treten Müdigkeit und Schlafstörungen (5x) auf. Bei Patient 15 wurde nach 5 Monaten eine Dosishalbung vorgenommen wegen anhaltender Nebenwirkungen (Nausea, Emesis, Appetitlosigkeit, Unruhe), welche hiernach sistierten.

5.6 Ergebnisse der Tiefenpyrosequenzierung mit *Genome Sequencer FLX System* (454 Life Science, Roche Diagnostic, Branford, CT)

Insgesamt werden 1.295.832 Sequenzen generiert (Gruppe I mit GS FLX Amplikon Sequenzierung 477.273, Gruppe II mit GS FLX Titanium Sequenzierung 818.559). Nach der Qualitätskontrolle und *Mapping* über eine Mindestlänge von ≥ 100 stehen 1.291.468 Sequenzen (Gruppe I 473.476, Gruppe II 817.992) der Auswertung zur Verfügung. Die mediane Sequenzlänge nach der Qualitätskontrolle und *Mapping* beträgt in Gruppe I 263 ± 38 (88-272) bp und in Gruppe II 400 ± 1 (396-400) bp. Aufgrund der fortentwickelten Testbeschaffenheit des GS FLX Titanium Sequenziersystems können längere Sequenzen gewonnen und analysiert werden im Vergleich zum GS FLX Amplikon Sequenziersystems.

Bei Patient 1 (Monat 6), 2 und 3 (je Monat 12) ist keine Amplifizierbarkeit für UDPS möglich, am ehesten aufgrund geringer HBV-DNA-Serumkonzentration von 122 Kopien/ml (Patient 1), 121 Kopien/ml (Patient 2) bzw. 52 Kopien/ml (Patient 3). Ebenfalls zeigt sich bei Patient 12 zu Monat 12 keine Amplifizierbarkeit trotz HBV-DNA-Serumkonzentration von 2152 Kopien/ml. Bei diesen Patienten wird der jeweilig vorherige *Follow-Up*-Zeitpunkt mit verfügbarer Serumprobe für die Sequenzanalyse verwendet (für Patient 1 von Monat 3, für Patient 2 und 3 je von Monat 6). Bei allen anderen Patienten ist die Testdurchführung problemlos möglich.

Insgesamt können bei 43 Proben von 18 Patienten 74 NA-Resistenzvarianten detektiert werden (1,72/Probe) (siehe Tabelle 25). Zur BL werden 37 NA-Resistenzvarianten (2,1/Probe, ges. 18 Proben), zu Monat 3 12 (2,4/Probe, ges. 5 Proben), zu Monat 6 13 (2,2/Probe, ges. 6 Proben), zu Monat 9 keine (2 Proben) und zu Monat 12 12 (1/Probe, ges. 12 Proben) der NA-Resistenzvarianten detektiert. Von allen detektierten NA-Resistenzvarianten liegen 23% (17/74) als Minorvarianten mit einer Prävalenz von <5% der patientenspezifischen HBV-Population vor, 12% (9/74) als Intermediärvarianten in einem Prävalenzbereich von 5-20% sowie 65% (48/74) als dominante Varianten in einem Prävalenzbereich >20%.

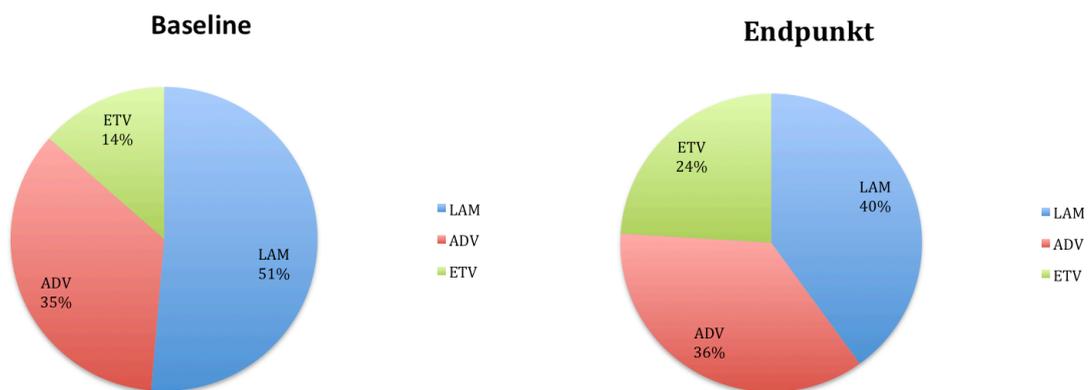


Abbildung 12: Prozentualer Anteil der ADV-, LAM- und ETV-Resistenzvarianten

Darstellung des Anteils der ADV-, LAM-, ETV-Resistenzvarianten zur BL und zum letzten Behandlungszeitpunkt der TDF-Monotherapie, zu dem eine Sequenzanalyse des HBV-Genoms durchgeführt werden konnte (Endpunkt)

Zur **BL** zeigen 12 der 18 Patienten (67%) mindestens eine bekannte NA-Resistenzvariante. Die meisten der 37 NA-Resistenzvarianten zur BL sind LAM-Resistenzvarianten mit 51% (19/37), gefolgt von ADV- mit 35% (13/37) und ETV-Resistenzvarianten mit 14% (5/37) (siehe Abbildung 12). Im Verlauf der TDF-Monotherapie können 57% (21/37) der BL NA-Resistenzvarianten nicht mehr detektiert werden, während 43% (16/37) persistieren. Die Gesamtzahl der NA-Resistenzvarianten nimmt bis zum Endpunkt (**EP**), dem letzten Behandlungszeitpunkt, zu dem

eine Sequenzanalyse des HBV-Genoms durchgeführt werden konnte (im Mittel Monat 12, Ausnahmen wie oben aufgeführt), auf 25 Varianten ab. Bei 61% (11/18) der Patienten liegen zum EP noch Resistenzvarianten vor. Die LAM-Resistenzvarianten bleiben weiterhin die anzahlreichsten Varianten, zeigen jedoch einen Verlust von 10% auf einen Anteil von 40% (10/25), gefolgt von den ADV-Resistenzvarianten mit gleichbleibenden Anteil 36% (9/25) und ETV-Resistenzvarianten mit leichter Zunahme auf 24% (6/25)

Zur BL weisen sechs Patienten (33%, Patienten 11, 13, 14, 15, 16, 18) **keine NA-Resistenzvarianten** auf. Von diesen zeigen fünf (Patienten 11, 14, 15, 16, 18) während des gesamten TDF-Monotherapieverlaufs einen HBV-Wildtyp. Zum EP zeigen sieben Patienten (39%) keine NA-Resistenzvariante. Bei zwei Patienten (Patienten 8, 10) sind die zur BL vorhandenen NA-Resistenzvarianten im TDF-Monotherapieverlauf nicht mehr nachweisbar, wohingegen bei einem Patienten (Patient 13) im Verlauf NA-Resistenzvarianten nachweisbar sind.

5.6.1 Verschiedene Einzelverläufe der NA-Resistenzvarianten

Im Verlauf der TDF-Monotherapie kann man verschiedene Entwicklungen der NA-Resistenzvarianten beobachten: (1) Persistenz und Neuauftreten von NA-Resistenzvarianten, (2) Verlust von initial vorhandenen NA-Resistenzvarianten und (3) kein Auftreten von NA-Resistenzvarianten (Persistenz des HBV-Wildtyps).

5.6.1.1 Persistenz und Neuauftreten von NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

Bei sieben Patienten kommt es zu einer Persistenz von NA-Resistenzvarianten, welche zur BL nachweisbar waren. Hierbei handelt es sich um fünf ADV- (verteilt auf vier Patienten: 2, 4, 5, 6), acht LAM- (verteilt auf drei Patienten: 1, 3, 12) und drei ETV-Resistenzvarianten (verteilt auf zwei Patienten: 1, 3).

Ein Neuauftreten von NA-Resistenzvarianten im TDF-Monotherapieverlauf ist bei fünf Patienten der Fall (Prävalenz 1,1- 99,6%). Hierbei handelt es sich um vier ADV- (Patienten 1, 9, 13), zwei LAM- (Patient 17) und drei ETV-Resistenzvarianten (Patienten 13, 17).

Nur bei einem von diesen Patienten treten die Varianten nach Vorliegen eines Wildtyps zu Beginn der TDF-Monotherapie neu auf (Patient 13: rtS202G mit 5,2% und rtN236T mit 99,0%). Bei den anderen Patienten tritt die Variante in einem Fall zusätzlich zu den persistierenden BL-LAM-Resistenzvarianten neu zu Monat 3 auf (Patient 1: rtA181T mit 1,1%), währenddessen in den verbleibenden drei Fällen ein kompletter Austausch der NA-Resistenzvarianten stattfindet mit Verlust sämtlicher initialer NA-Resistenzvarianten zur BL trotz breitem Prävalenzbereich (Patienten 7, 9, 17 mit 1-69,6%) und stattdessen neu auftretenden ADV-, LAM- und ETV-Resistenzvarianten (1,8-99,6%).

5.6.1.2 Verlust von initial vorhandenen NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

Bei zehn Patienten sind unter TDF-Monotherapie einige der zur BL vorhandenen NA-Resistenzvarianten im Verlauf nicht mehr detektierbar. Zu beobachten ist auch die Konstellation, dass bei Patienten mit mehreren NA-Resistenzvarianten zur BL einige persistieren und andere nicht mehr detektiert werden, z.B. Patient 2 mit Verlust der zur BL vorhandenen Varianten rtA181V, rtL180M, rtM204V, jedoch Persistenz der Variante rtN236T. Weitere Fälle von nach der BL nicht mehr detektierbaren Varianten (neben persistierenden anderen Varianten) sind acht ADV- (verteilt auf sieben Patienten: 2, 4, 5, 7, 8, 10, 17), elf LAM- (verteilt auf fünf Patienten: 2, 6, 7, 9, 17) und zwei ETV-Resistenzvarianten (bei Patient 1). Nur zwei von diesen Patienten weisen zum EP keinerlei NA-Resistenzvarianten mehr auf im Sinne eines HBV-WTs (Patienten 8, 10). Initial weisen diese beiden Patienten zur BL der TDF-Monotherapie eine LAM-

/ADV-Resistenzvariante rtA181T als Minor- (3,2%) bzw. Intermediärvariante (6,4%) auf, welche im Verlauf der TDF-Monotherapie nicht weiter detektiert werden. Patient 10 zeigt einen etwas stärkeren HBV-DNA Abfall im Vergleich zu Patient 8 zu Monat 12 (2,60 vs. 3,50 log₁₀ Kopien/ml) bei annähernd gleicher BL-Virämie (6,88 vs. 6,98 log₁₀ Kopien/ml).

5.6.1.3 HBV-Wildtyp unter TDF-Monotherapie

Bei fünf Patienten (Patienten 11, 14, 15, 16, 18) sind weder zur BL der TDF-Monotherapie bekannte NA-Resistenzvarianten vorhanden noch treten diese während des TDF-Monotherapieverlaufs auf.

Tabelle 26: HBV-Wildtyp zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie

	BL		EP	
	Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)	Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)
11	-	7,54	- ^a	2,56
14	-	6,38	-	3,86
15	-	6,30	-	4,28
16	-	8,80	-	4,92
18	-	8,00	- ^a	2,61

Darstellung der HBV-Wildtypen zur BL bzw. zum EP der TDF- Behandlung detektiert mittels UDPS, sowie Angabe der HBV-DNA (log₁₀ Kopien/ml). -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; ^a abweichende UDPS Durchführung zu Monat 9.

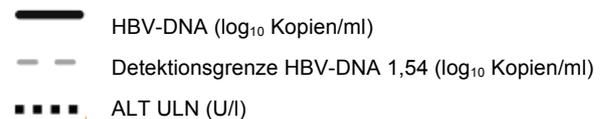
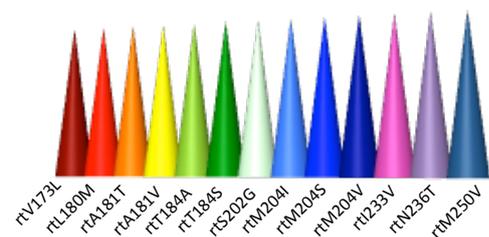
Dennoch zeigt sich bei den Patienten mit durchgehendem HBV-Wildtyp zu Beginn und unter der TDF-Monotherapie entgegen den Erwartungen ebenfalls eine stark erhöhte HBV-DNA-Serumkonzentration. Hierunter sind die zwei Patienten mit der höchsten HBV-DNA-Serumkonzentration der gesamten Patientenkohorte (Patient 15 und 16 mit 4,28 bzw. 4,92 log₁₀ Kopien/ml) (siehe Tabelle 26). Patient 15 zeigt nach der zu Monat 5 durchgeführten TDF-Dosishalbung (aufgrund von Nebenwirkungen) ein erneutes Ansteigen der HBV-DNA-Serumkonzentration auf den oben genannten Wert (siehe Tabelle 24 auf Seite 49 und Tabelle 26). Die hohe Viruslast bei Patient 16 bleibt unklar, klare Hinweise auf eine Medikamenten Non-Adhärenz sind nicht ersichtlich.

Die mediane HBV-DNA-Serumkonzentration der Patienten mit durchgehendem WT-Nachweis über die gesamte Zeitdauer der TDF-Monotherapie liegt zur BL bei 7,54±1,07 (6,30-8,80) log₁₀ Kopien/ml. Die mediane BL-Virämie der Patienten, welche zum EP einen WT-Nachweis aufweisen (d.h. incl. Patient 8 und 10 mit Verlust der initial vorhandenen BL-Resistenzvarianten), liegt bei 6,98±0,91 (6,30-8,80) log₁₀ Kopien/ml und zu Monat 12 bei 3,05 ±0,96 (2,52-4,92) log₁₀ Kopien/ml (letzterer Wert unter Ausschluss von Patient 15 mit Dosishalbung).

5.6.2 Kombiniert oder isoliert auftretenden NA-Resistenzvarianten

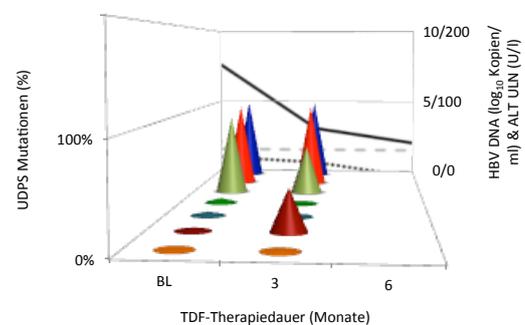
Innerhalb der untersuchten HBV-Serumproben treten bei einigen Proben isolierte Resistenzvarianten auf, während an den übrigen Genabschnitten HBV-Wildtyp zu finden ist. In anderen Serumproben lassen sich Kombinationen aus verschiedenen Resistenzvarianten.

Sechsmal zur BL lassen sich die Resistenzvarianten als Kombination von verschiedenen NA-Resistenzvarianten vorfinden, so viermal als LAM-ADV-Resistenzvarianten (Patienten 2, 6, 7, 17) und zweimal als LAM-ETV-Resistenzvarianten (Patienten 1, 3) und sechs Patienten isolierte ADV- bzw. LAM-Resistenzvarianten (Patienten 4, 5, 8, 9, 10, 12). Zum EP zeigt sich eine Abnahme der kombinierten NA-Resistenzvarianten auf vier Patienten: einmal (Patient 13) für ADV-ETV-, einmal (Patient 1) ADV/LAM-ETV- und zweimal (Patienten 3, 17) für LAM-ETV-Resistenzvarianten. Die Anzahl der isoliert vorkommenden Resistenzvarianten steigt auf sieben Patienten an, hierunter fünfmal isolierte ADV-Resistenzvarianten (Patienten 2, 4, 5, 6, 9) und je einmal für LAM-Resistenzvarianten (Patient 12) bzw. ETV-Resistenzvarianten (Patient 7). Eine detaillierte Erläuterung erfolgt unter der Verlaufsbeschreibung der einzelnen NA-Resistenzvarianten.



	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtM204V	UDPS	99,4%	99,4%	na		
	TG	+	M/I/V +	na		
	INNO-LiPa	+	+	-		
rtL180M	UDPS	99,0%	99,3%	na		
	TG	+	L/M +	na		
	INNO-LiPa	+	+	-		
rtT184A	UDPS	91,2%	56,6%	na		
	TG	+	T/A +	na		
	INNO-LiPa	T/SCGA +	T/SCGA +	-		
rtT184S	UDPS	4,9%	0,0%	na		
	TG	-	-	na		
	INNO-LiPa	T/SCGA +	T/SCGA +	-		
rtM250V	UDPS	4,0%	0,3%	na		
	TG	M/V +	-	na		
	INNO-LiPa	+	-	-		
rtV173L	UDPS	2,8%	42,8%	na		
	TG	-	-	na		
	INNO-LiPa	-	-	-		
rtA181T	UDPS	0,5%	1,1%	na		
	TG	-	-	na		
	INNO-LiPa	-	-	-		
rtA181V	UDPS	0,1%	0,1%	na		
	TG	-	A/V +	na		
	INNO-LiPa	-	-	-		

nv



a) Verlauf Patient 1

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtN236T	UDPS	37,3%	7,5%	97,6%		na
	TG	N/T +	N/T +	N/T +		na
	INNO-LiPa	N/T +	N/T +	N/T +		N/T +
rtM204V	UDPS	1,6%	0,1%	0,2%		na
	TG	-	-	-		na
	INNO-LiPa	M/V +	M/V (+)	-	nu	-
rtL180M	UDPS	1,3%	0,0%	0,0%		na
	TG	-	-	-		na
	INNO-LiPa	-	-	-		-
rtA181V	UDPS	1,2%	0,1%	0,1%		na
	TG	-	-	-		na
	INNO-LiPa	-	-	-		-

b) Verlauf Patient 2

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtM204V	UDPS	99,4%		99,5%		
	TG	+		+		
	INNO-LiPa	+		+		
rtL180M	UDPS	99,2%		99,3%		
	TG	+		+		
	INNO-LiPa	+		+	nu	na
rtT184A	UDPS	50,8%	nv	52,3%		
	TG	+		+		
	INNO-LiPa	T/SCGA +		T/SCGA +		
rtS202G	UDPS	44,5%		45,9%		
	TG	S/G +		S/G +		
	INNO-LiPa	-		-		

c) Verlauf Patient 3

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtA181V	UDPS	91,0%	81,1%	99,4%		99,2%
	TG	+	+	+		+
	INNO-LiPa	A/V +	A/V +	A/V +		+
rtN236T	UDPS	17,6%	29,1%	0,1%		0,0%
	TG	N/T +	N/T +	-	nu	-
	INNO-LiPa	N/T +	N/T +	-		-
rtA194T	UDPS	nv	nv	nv		nv
	TG	-	-	-		-
	INNO-LiPa	-	(+)	-		-

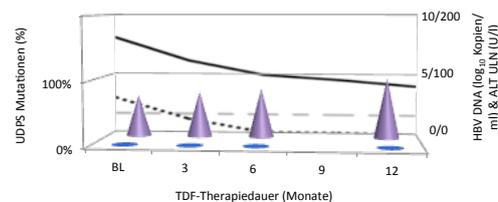
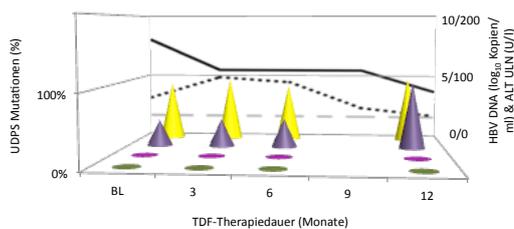
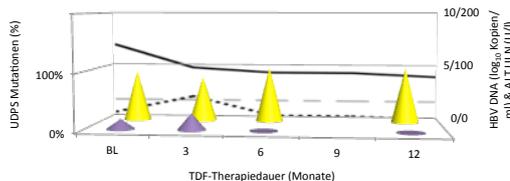
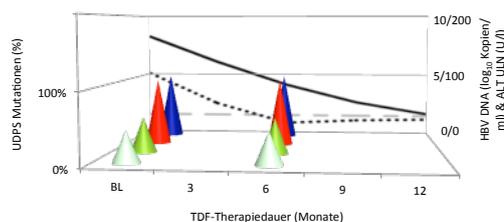
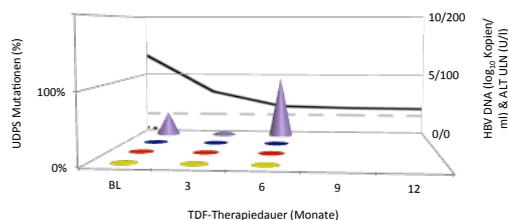
d) Verlauf Patient 4

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtA181V	UDPS	89,7%	96,1%	86,0%		99,1%
	TG	+	+	A/V +		+
	INNO-LiPa	A/V +	A/V +	+		A/V +
rtN236T	UDPS	39,7%	41,8%	42,7%		98,9%
	TG	N/T +	N/T +	-		N/T +
	INNO-LiPa	N/T +	N/T +	N/T +	nu	N/T +
rtI233V	UDPS	1,7%	0,2%	0,0%		0,1%
	TG	-	-	-		-
	INNO-LiPa	I/V +	-	-		-
rtT184A	UDPS	0,0%	0,2%	1,6%		0,2%
	TG	-	-	-		-
	INNO-LiPa	-	-	-		-

e) Verlauf Patient 5

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtN236T	UDPS	67,3%	74,0%	79,9%		97,7%
	TG	N/T +	N/T +	N/T +		na
	INNO-LiPa	N/T +	N/T +	N/T +		N/T +
rtM204I	UDPS	1,4%	1,6%	0,1%	nu	0,1%
	TG	-	-	-		na
	INNO-LiPa	-	M/I +	-		-

f) Verlauf Patient 6



	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtA181T	UDPS	5,6%				0,1%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				-
rtM204I	UDPS	2,8%				0,1%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				-
rtL180M	UDPS	1,7%		nu		0,0%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	M/L +				-
rtM250V	UDPS	0,2%				2,5%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				-

g) Verlauf Patient 7

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtA181T	UDPS	3,2%				0,1%
	TG	-		nu		-
	INNO-LiPa	T/A +				-

h) Verlauf Patient 8

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtL180M	UDPS	69,6%				0,0%
	TG	L/M +				-
	INNO-LiPa	L/M +				-
rtM204V	UDPS	55,4%				0,2%
	TG	M/V +				-
	INNO-LiPa	+				-
rtV173L	UDPS	42,3%				0,0%
	TG	V/L +				-
	INNO-LiPa	V/L +				-
rtM204I	UDPS	32,6%		nu		0,1%
	TG	M/I +				-
	INNO-LiPa	+				-
rtM204S	UDPS	11,2%				0,0%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				-
rtA181V	UDPS	0,1%				1,8%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				-
rtN236T	UDPS	0,0%				21,1%
	TG	-				+
	INNO-LiPa	-				N/T +

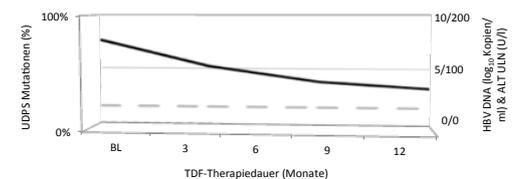
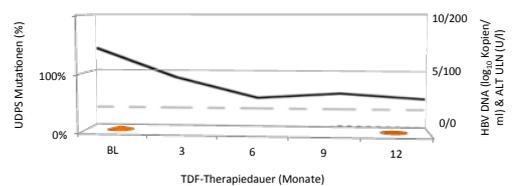
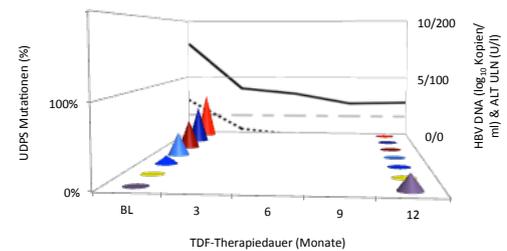
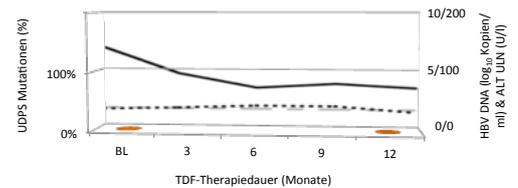
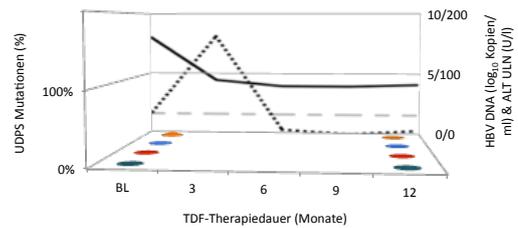
i) Verlauf Patient 9

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtA181T	UDPS	6,4%				0,1%
	TG	-		nu		-
	INNO-LiPa	A/T +				-

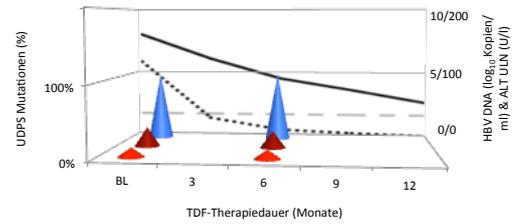
j) Verlauf Patient 10

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
keine Resistenzvarianten per UDPS, TG, INNO-LiPa detektierbar						

k) Verlauf Patient 11

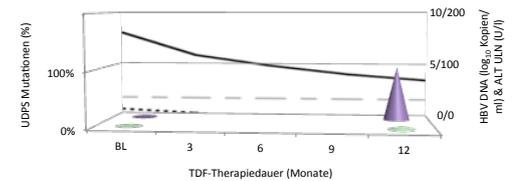


	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtM204I	UDPS	98,9%		99,4%		
	TG	+		+		
	INNO-LiPa	+		+		
rtV173L	UDPS	28,0%		24,2%		
	TG	V/L +		V/L +		
	INNO-LiPa	-	nu	V/L +	nv	na
rtL180M	UDPS	13,1%		12,6%		
	TG	-		-		
	INNO-LiPa	L/M +		L/M +		
rtL80V	UDPS	nv		nv		
	TG	nv		nv		
	INNO-LiPa	+		+		



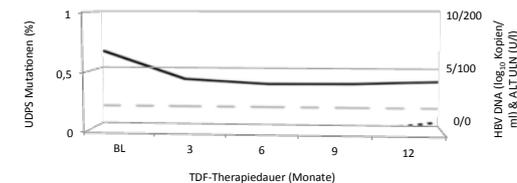
l) Verlauf Patient 12

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtN236T	UDPS	0,0%				99,0%
	TG	-				N/T +
	INNO-LiPa	-				N/T +
rtS202G	UDPS	0,1%				5,2%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-	nv			-
rtA181T	UDPS	0,2%				0,1%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				A/T (+)
rtM204I	UDPS	0,1%				0,1%
	TG	-				-
	INNO-LiPa	-				M/I (+)



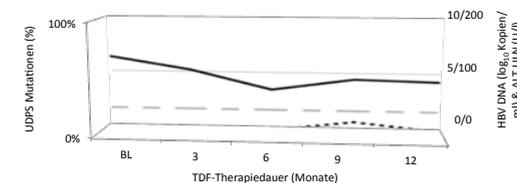
m) Verlauf Patient 13

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
keine Resistenzvarianten per UDPS, TG, INNO-LiPa detektierbar						



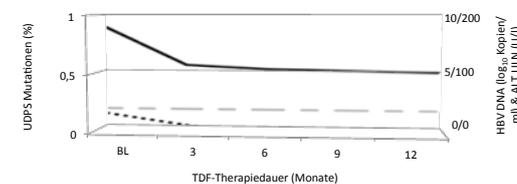
n) Verlauf Patient 14

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
keine Resistenzvarianten per UDPS, TG, INNO-LiPa detektierbar						



o) Verlauf Patient 15

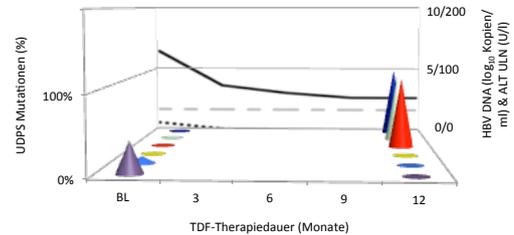
	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtI233V	UDPS	-				-
	TG	-		nu		-
	INNO-LiPa	-				I/V



p) Verlauf Patient 16

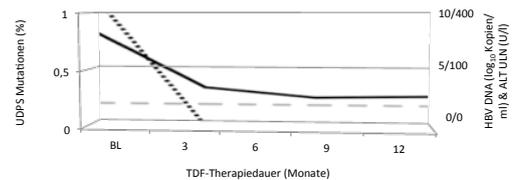
	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
rtM204V	UDPS	0,2%				99,6%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	-				M/V (+)
rtS202G	UDPS	0,3%				98,0%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	S/C/G (+)				-
rtL180M	UDPS	0,4%				99,1%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	-				L/M +
rtA181V	UDPS	1,0%				0,1%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	-				A/V (+)
rtM204I	UDPS	9,4%				0,0%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	M/I (+)				M/I +
rtN236T	UDPS	41,2%				0,0%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	N/T +				-
rtI233V	UDPS	0,5%				0,2%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	I/V (+)				-
rtM250V	UDPS	0,2%				0,2%
	TG	M/L +				na
	INNO-LiPa	-				-
rtT184S/ A/G	UDPS	0,2%				0,2%
	TG	-				na
	INNO-LiPa	-				T/SCGA (+)
rtL80V	UDPS	nv				nv
	TG	nv				nv
	INNO-LiPa	-				L/V +

nu



q) Verlauf Patient 17

	Test	Therapiedauer (in Monate)				
		0	3	6	9	12
keine Resistenzvarianten per UDPS, TG, INNO-LiPa detektierbar						



r) Verlauf Patient 18

Abbildung 13: Patientenspezifische Darstellung des serologischen, biochemischen Verlaufs und Veränderungen des HBV-Genoms vor und während der TDF-Monotherapie

Seitenwand/Kegelel: NA-Resistenzvarianten detektiert per UDPS (Prävalenz in % der patientenspezifischen HBV-Population) zur BL, Monat 3, 6, 9 und 12 der TDF-Monotherapie.

Rückwand: **HBV-DNA-Serumkonzentration** (in \log_{10} Kopien/ml, 0 bis 10 \log_{10} Kopien/ml); **HBV-DNA Detektionslimit** (1,54 \log_{10} Kopien/ml); **ALT ULN** (in U/l, 0 U/l bis 200 U/l; abweichend Patient 18 mit Maximum 400 U/l).

Tabelle: NA-Resistenzvarianten detektiert mit UDPS, TG und INNO-LiPa. UDPS mit Prävalenz in % der patientenspezifischen HBV-Population; (+): schwach positiver Bandennachweis; -: keine Resistenzvariante detektiert bzw. <1% Prävalenzanteil; nv: keine Serumprobe verfügbar; na: Serumprobe nicht amplifizierbar; nu: Serumprobe zu diesem Zeitpunkt nicht untersucht.

5.6.3 Entwicklung der ADV-Resistenzvarianten

5.6.3.1 Allgemein

Dreizehn ADV-Resistenzvarianten werden zur **BL** verteilt auf acht Patienten per UDPS detektiert, hiervon dreimal die Variante rtA181T (Patienten 7, 8, 10), viermal rtT181V (Patienten 2, 4, 5, 17), und fünfmal rtN236T (Patienten 2, 4, 5, 6, 17). Die Variante rtI233V wird einmal bei Patient 5 als Minorvariante gefunden (siehe Tabelle 27 und Abbildung 13).

Unter den Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zur BL sind auch Patienten der Gruppe II (Patienten 7-18), welche durch vorherige direkte Sequenzierung (Daten nicht aufgeführt) keine ADV-Resistenzvarianten aufzeigten. Passend hierzu zeigen sich diese Varianten in Gruppe II zur BL meist im niedrigen Prävalenzbereich der patientenspezifischen HBV-Population zwischen 1,0-6,5%, mit Ausnahme von Patient 17 (rtN236T mit 41,2%). Währenddessen treten die ADV-Resistenzvarianten in Gruppe I (Patienten 1-6) meist im dominanten Prävalenzbereich zwischen 17,6-91,0% auf mit Ausnahme von Patient 2 (rtA181V mit 1,2%). Zwei Patienten (Patienten 1, 3) aus Gruppe I, bei denen in vorheriger direkter Sequenzierung ADV-Resistenzvarianten beschrieben waren, blieben nun ohne entsprechenden Nachweis.

Zum **EP** zeigt sich insgesamt eine Abnahme auf neun ADV-Resistenzvarianten verteilt auf sieben Patienten (Patienten 1, 2, 4, 5, 6, 9, 13). Hiervon liegen jedoch die meisten Varianten (7/9) als dominante Varianten vor (rtN236T mit 21,1- 99,0%) und nur zwei als Minorvarianten (Patient 1: rtA181T mit 1,1% und Patient 9: rtA181V mit 1,8%). Im Verlauf der TDF-Monotherapie sind 4 der 9 Varianten bei drei Patienten neu aufgetreten, darunter die oben genannten beiden Minorvarianten (Patienten 1, 9) und die beiden dominante Varianten (Patient 9: rtN236T mit 21,1% und Patient 13: rtN236T mit 99,0%). Die restlichen Varianten sind persistierende BL-Varianten mit starker Zunahme der Prävalenz auf 97,6-99,1% der Viruspopulation (Patienten 2, 4, 5, 6). Die ADV-Resistenzvarianten, welche im Verlauf nicht mehr nachweisbar sind (acht Varianten), sind in der Regel Minorvarianten (4/8) oder Intermediärvarianten (3/8). Eine Ausnahme bildet Patient 17, bei dem ebenfalls die dominante BL-Variante (rtN236T mit 41,2%) im Verlauf nicht mehr nachweisbar ist.

5.6.3.2 Einzelverläufe

Von insgesamt acht Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zur BL sind die vier Patienten 2, 4, 5 und 6 die einzigen Patienten, bei denen BL-ADV-Resistenzvarianten bis zum EP persistieren (siehe Tabelle 27). Die Patienten 4 und 5 zeigen jeweils nur die isolierten ADV-Varianten rtA181V+ rtN236T ohne weitere NA-Resistenzvarianten zur BL (rtA181V mit 91,0 bzw. 89,7%, rtN236T mit 17,6 bzw. 39,7%), Patient 5 zusätzlich rtI233V (1,7%). Zum EP zeigt Patient 4 eine isolierte Variante rtA181V (99,2%), wohingegen bei Patient 5 beide Varianten persistieren

(rtA181V mit 99,1%+ rtN236T mit 98,9%). Im Unterschied hierzu treten die ADV-Resistenzvarianten bei Patientin 2 und 6 zur BL in Kombination mit LAM-Minorvarianten auf (Patient 2: rtA181V mit 1,2%+ rtN236T mit 37,3%+ rtL180M mit 1,3%+ rtM204V mit 1,6%, Patient 6: rtN236T mit 67,3%+ rtM204I mit 1,4%, zum EP jedoch als isolierte ADV-Resistenzvarianten (rtN236T mit 97,6 bzw. 97,7%). Bei den vier Patienten (Patienten 2, 4, 5, 17) mit zur BL nachgewiesener Kombination von rtA181V+rtN236T zeigt sich eine unterschiedliche Ausprägung der Varianten im Verlauf. Nur bei Patient 5 persistieren beide Resistenzvarianten über den gesamten Behandlungsverlauf bei initial dominanter Prävalenz. Bei Patient 17 sind beide Varianten im Verlauf nicht mehr nachweisbar, währenddessen bei Patient 2 nur rtN236T selektiert wird und bei Patient 4 rtA181V.

Bei drei Patienten (Patienten 1, 9, 13) ohne ADV-Resistenzvariante zur BL treten diese im Verlauf neu auf. Bei Patient 1 tritt zum EP die ADV/LAM-Resistenzvariante rtA181T mit 1,1% neu auf. Die zu BL bereits existenten LAM-ETV-Varianten werden selektiert (BL: rtV173L mit 2,8%+ rtL180M mit 99,0%+ rtM204V mit 99,4%+ rt184A/S mit 91,2%/4,9%+ rtM250V mit 4,0%, EP: rtA181T mit 1,1%+ rtV173L mit 42,8%+ rtL180M mit 99,3%+ rtM204V mit 99,4%+ rtT184A mit 56,6%). Patient 9 zeigt zur BL isolierte LAM-Resistenzvarianten (rtV173L mit 42,3%+ rtL180M mit 69,9%+ rtM204I/S/V mit 32,6/11,2/55,4%) ohne weiteren Nachweis mehr im Verlauf, es treten stattdessen die neuen Varianten rtA181V mit 1,8%+ rtN236T mit 21,1% auf. Patient 13 weist einen HBV-Wildtyp zur BL und zum EP die neue Variante rtN236T mit 99,0% und begleitende ETV-Resistenzvariante (rtS202G mit 5,2%) auf.

Bei den anderen vier Patienten (Patienten 7, 8, 10, 17) mit ADV-Resistenzvarianten zur BL zeigt sich keine weitere Detektion mehr dieser Varianten im Verlauf. Auffällig hierbei ist, dass sich diese BL-Resistenzvarianten meist als Minor- oder Intermediärvarianten finden lassen (Patienten 7, 8, 10: rtA181T mit 5,6-6,4%; Patient 17: rtA181V mit 1,0% und Patient 4: rtN236T mit 17,6%) mit einer Ausnahme (Patient 17: rtN236T mit 41,2%) Bei Patient 7 liegt die ADV-/LAM-Resistenzvariante rtA181T (5,6%) in Kombination mit weiteren LAM-Minor-Resistenzvarianten zur BL vor (rtL180M mit 1,7%+ rtM204I mit 2,8%), bei Patient 8 und 10 als isolierte BL-ADV/LAM-Resistenzvariante (rtA181T mit 3,2 bzw. 6,4%) und bei Patient 17 liegt eine Kombination der ADV-Resistenzvarianten mit LAM-Resistenzvariante vor (rtA181V mit 1,0%+ rtN236T mit 41,2%+rtM204I mit 9,4%).

Die Hälfte der Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zur BL weisen kombinierte LAM-ADV-Resistenzvarianten auf (Patienten 2, 6, 7, 17), der Rest isolierte ADV-Resistenzvarianten. Von den sieben Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zum EP weisen fünf Patienten (Patienten 2, 4, 5, 6, 9) diese isolierte auf, während nur noch zwei Patienten (Patienten 1, 13) ADV- in Kombination mit LAM- bzw. ETV-Resistenzvarianten zeigen.

Tabelle 27: ADV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie

	BL			EP		
	andere Resistenzvarianten	ADV-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)	andere Resistenzvarianten	ADV-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)
1	LAM, ETV	-	7,60	LAM, ETV	rtA181T (1,1) ^a	2,09*
2	LAM	rtA181V (1,2), rtN236T (37,3)	6,68	-	rtN236T (97,6) ^a	2,14
4	-	rtA181V (91,0), rtN236T (17,6)	6,90	-	rtA181V (99,2)	3,93
5	-	rtA181V (89,7), rtN236T (39,7), rtI233 (1,7)	8,00	-	rtA181V (99,1), rtN236T (98,9)	3,69
6	LAM	rtN236T (67,3)	8,00	-	rtN236T (97,7)	3,96
7	LAM	rtA181T (5,6)	8,00	ETV	-	4,10
8	-	rtA181T (3,2)	6,98	-	-	3,49
9	LAM	-	7,90	-	rtA181V (1,8), rtN236T (21,1)	2,82
10	-	rtA181T (6,4)	6,88	-	-	2,52
13	-	-	8,00	ETV	rtN236T (99,0)	3,44
17	LAM	rtA181V (1,0), rtN236T (41,2)	6,46	LAM, ETV	- ^a	2,58

Darstellung der ADV- und. begleitenden LAM-/ETV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie detektiert mittels UDPS (Prävalenz der patientenspezifischen Viruspopulation in %), sowie Angabe der HBV-DNA (in log₁₀ Kopien/ml). -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; ^aabweichende UDPS Durchführung zu Monat 3 (Patient 1), Monat 6 (Patient 2) und Monat 9 (Patient 17); *HBV-DNA bei Patient 1 zu Monat 6, bei allen anderen Patienten zu Monat 12

Die mediane **HBV-DNA-Serumkonzentration** der Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zur BL liegt bei 6,94±0,65 (6,46-8,00) log₁₀ Kopien/ml. Die mediane BL-Virämie der Patienten mit EP-Nachweis von ADV-Resistenzvarianten liegt hingegen bei 7,90±0,56 (6,68-8,00) log₁₀ Kopien/ml und für Monat 12 bei 3,57±0,72 (2,14-3,96) log₁₀ Kopien/ml bzw. bei Patient 1 mit der ADV-/LAM-Resistenzvariante rtA181T (1,1%) zu Monat 6 bei 2,09 log₁₀ Kopien/ml.

Auffallend ist, dass bei den Patienten mit der Variante rtN236T zum EP (Patienten 2, 5, 6, 9, 13) recht unterschiedliche HBV-DNA-Serumkonzentrationen zu Monat 12 zu beobachten sind. Die Virämie liegt bei den Patienten 5, 6 und 13 >1 log₁₀-Einheit höher als bei den Patienten 2 und 9 (3,44-3,96 vs. 2,14-2,82 log₁₀ Kopien/ml). Allerdings liegt auch die Ausgangsviruslast zu TDF-Beginn bei den drei zuerst genannten Patienten höher (siehe Tabelle 27).

Während bei Patient 9 die Variante rtN236T zum EP neu dominant (21,1%) in Kombination mit rtA181V (1,8%) auftritt, handelt es sich bei Patient 2 um eine selektierte BL-Variante mit deutlicher Prävalenzzunahme zum EP (37,3% auf 97,6%) ohne weitere Detektion der initial begleitenden restlichen Minorvarianten, darunter auch die Variante rtA181V (rtL180M, rtA181V, rtM204V je <2% Prävalenz). Die HBV-DNA-Serumkonzentration zeigt bei beiden Patienten ei-

nen initial relativ raschen Abfall innerhalb der ersten Monate mit hiernach Stagnation (HBV-DNA Minimum 2,09 bzw. 2,67 log₁₀ Kopien/ml).

Bei den anderen vier Patienten mit erhöhter Virämie (Patienten 4, 5, 6, 13: 3,69- 3,96 log₁₀ Kopien/ml) zeigen zwei Patienten (Patienten 4, 5) isolierte ADV-Resistenzvarianten zu BL auf (rtA181V+rtN236T). Bei Patient 5 werden beide zur BL dominant auftretenden Varianten (89,7% bzw. 39,7%) selektiert mit Anstieg der Prävalenz auf ≥98,9%. Die zur BL bei diesem Patienten zusätzlich nachweisbare Minorvariante rtI233V ist nicht weiter nachweisbar. Bei Patient 4 hingegen wird nur die dominante Variante rtA181V selektiert mit Prävalenzanstieg (91% auf 99,2%), wohingegen die intermediäre Variante rtN236T (17,6%) nicht weiter nachweisbar ist. Bei Patient 6 handelt es sich bei der Variante rtN236T um eine persistierende BL-Variante mit Prävalenzanstieg (67,3% auf 97,7%), währenddessen bei Patient 13 diese Variante dominant neu auftritt (99,0%).

Zusammenfassend reduziert sich die Anzahl der ADV-Resistenzvarianten von der BL (13/37, 35%) zum EP (9/25, 36%) leicht, bleibt jedoch vom prozentualen Anteil an allen NA-Resistenzvarianten gleich. Die Patientenanzahl mit ADV-Resistenzvarianten reduziert sich um eine Person auf sieben Patienten zum EP, welche eine höhere persistierende Virämie zu Monat 12 zeigen als Patienten ohne ADV-Resistenzvarianten bei vergleichsweise niedrigerer BL-Viruslast. In den meisten Fällen sind isolierte ADV-Resistenzvarianten im Verlauf zu detektieren ohne weiteren Nachweis der initial begleitenden anderweitigen (Minor-)Resistenzvarianten. Die BL LAM/ADV-Resistenzvariante **rtA181T** wird nur einmal (Patient 1) selektiert bzw. ist neu auftretend und ist stets nur in geringer Prävalenz (bis max. 6,4%) nachweisbar. Die BL-Variante **rtA181V** wird in zwei von vier Fällen weiter selektiert, in denen sie in hoher Prävalenz auftritt (Patienten 4, 5). Bei niedriger Prävalenz zur BL (Patienten 2, 17) tritt sie im Verlauf nicht weiter auf. Nur einmalig tritt diese Variante neu zum EP als Minorvariante auf (Patient 9). Die BL-Variante **rtN236T** wird in drei von fünf Fällen selektiert (Patienten 2, 5, 6) und tritt zweimal als dominante Variante neu auf (Patienten 9, 13). Bei den selektierten Fällen tritt sie in höherer BL-Prävalenz auf (37,7-67,3%), währenddessen sie bei den im Verlauf nicht mehr detektierten Fällen eine BL-Prävalenz von 17,6% (Patient 4) und 41,0% (Patient 17) aufweist. Patient 5 ist der einzige Patient, der durchgängig eine Kombination der ADV-Resistenzvarianten rtA181V+rtN236T zeigt.

5.6.4 Entwicklung der LAM-Resistenzvarianten

5.6.4.1 Allgemein

Neunzehn LAM-Resistenzvarianten sind zur **BL** verteilt auf acht Patienten zu finden, sie stellen den größten Anteil der BL-Varianten dar. Die Variante rt173L findet sich dreimal (Patienten 1, 9, 12), rtL180M sechsmal (Patienten 1, 2, 3, 7, 9, 12), rtM204I fünfmal (Patienten 6, 7, 9, 12, 17), rtM204S einmal (Patient 9) und rtM204V viermal (Patienten 1, 2, 3, 9) (siehe Tabelle 28 und Abbildung 13 auf Seite 61). Die Variante rtA181V/T, mit LAM- als auch ADV-Resistenz assoziiert, wird primär unter den ADV-Resistenzvarianten aufgeführt und nicht erneut aufgelistet. Die Hälfte der LAM-Resistenzvarianten zur BL wird als dominante Variante gefunden.

Zum **EP** zeigt sich eine Abnahme auf zehn LAM-Resistenzvarianten verteilt auf vier Patienten. Bis auf eine Ausnahme liegen alle Varianten zum EP als dominante Varianten vor (9/10), nur Patient 12 weist eine Intermediärvariante rtL180M (12,6%). Im Verlauf der TDF-Monotherapie sind zwei der zehn Varianten bei einem Patienten neu aufgetreten mit hoher Prävalenz von $\geq 99,1\%$ (Patient 17: rtL180M und rtM204V). Die restlichen Varianten (8/10) sind selektierte BL-Varianten mit ungefähr gleichbleibender Prävalenz (Patienten 1, 3, 12: 12,6-99,5%). Einzig bei Patient 1 zeigt sich eine starke Selektionierung der rtV173L Variante mit Zunahme der Prävalenz von 2,8% zur BL auf 42,8% nach drei Monaten. Die LAM-Resistenzvarianten, welche im Verlauf nicht mehr nachweisbar sind (11 Varianten), sind in der Regel Minorvarianten (5/11) oder Intermediärvarianten (1/11). Eine Ausnahme bildet Patient 9, bei dem sämtliche Varianten (Prävalenz 11,2-55,4%) im Verlauf nicht mehr nachweisbar sind. Dieser Patient weist isoliert nur diese LAM-Resistenzvarianten zur BL auf.

5.6.4.2 Einzelverläufe

Die Anzahl der Patienten mit LAM-Resistenzvarianten halbiert sich von acht Patienten zur BL auf vier zum EP. Nur bei drei Patienten (Patienten 1, 3, 12) werden die BL-LAM-Resistenzvarianten bis zum EP selektiert. Von den selektierten Varianten liegen nur bei Patient 12 isolierte LAM-Resistenzvarianten zur BL und EP vor, bei den anderen beiden Patienten liegt eine Kombination mit ETV-Resistenzvarianten nach erfolgter ETV-Behandlung vor. Die Prävalenzausprägung der Varianten bleibt bei den Patienten in etwa gleich hoch. Bei Patient 1 kommt es zu einer Zunahme der rtV173L Variante von 2,8 auf 42,8%, während die gleiche Variante bei Patient 12 von gleich bleibendem Prävalenzanteil bleibt.

Bei Patient 17 mit initialem Nachweis einer Variante rtM204I (9,4%) und ADV-Resistenzvarianten werde diese zum EP durch zwei neue dominante LAM-Resistenzvarianten ersetzt (rtL180M+rtM204V $>99\%$) in Kombination mit einer ETV-Resistenzvariante (rtS202G 6 98,0%) ohne vorhergehende ETV-Therapie.

Bei fünf Patienten kommt es zu keiner weiteren Detektion der ursprünglichen BL-LAM-Resistenzvarianten. Diese liegen vorwiegend als Minor- (Patienten 2, 6, 7 1,3-2,8%) oder Intermediärvarianten (Patient 17 rtM204I 9,0%) vor und in Kombination mit begleitenden zumeist dominanten ADV-Resistenzvarianten. Eine Ausnahme hiervon stellt Patient 9 dar mit Nachweis isolierter LAM-Resistenzvarianten, von denen keine mehr nachweisbar ist trotz initialem Vorliegen im höheren Prävalenzbereich (11,2-69,6%).

Zur BL sind die LAM-Resistenzvarianten viermal in Kombination mit ADV- (Patienten 2, 6, 7, 17), zweimal mit ETV-Resistenzvarianten (Patienten 1, 3) und zweimal isoliert (Patienten 6, 17) zu finden. Zum EP liegt einmal eine Kombination mit ADV-, dreimal mit ETV- und einmal eine isolierte LAM-Resistenzvarianten vor.

Tabelle 28: LAM-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie

	BL			EP		
	andere Resistenzvarianten	LAM-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)	andere Resistenzvarianten	LAM-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)
1	ETV	rtV173L (2,8), rtL180M (99,0), rtM204V (99,4)	7,60	ETV, ADV	rtV173L (42,8), rtL180M (99,3), rtM204V (99,4) ^a	2,09*
2	ADV	rtL180M (1,3), rtM204V (1,6)	6,68	ADV	-	2,14
3	ETV	rtL180M (99,2), rtM204V (99,4)	8,21	ETV	rtL180M (99,3), rtM204V (99,5) ^a	1,72
6	ADV	rtM204I (1,4)	8,00	ADV	-	3,96
7	ADV	rtL180M (1,7), rtM204I (2,8)	8,00	ETV	-	4,10
9	-	rtV173L (42,3), rtL180M (69,6), rtM204I (32,6), rtM204S (11,2), rtM204V (65,4)	7,90	ADV	-	2,82
12	-	rtV173L (28,0), rtL180M (13,1), rtM204I (98,9)	7,92	-	rtV173L (24,2), rtL180M (12,6), rtM204I (99,4)	2,56
17	ADV	rtM204I (9,4)	6,46	ETV	rtL180M (99,1), rtM204V (99,6)	2,58

Darstellung der ADV- und. begleitenden ADV-/ETV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie detektiert mittels UDPS (Prävalenz der patientenspezifischen Viruspopulation in %), sowie Angabe der HBV-DNA (in log₁₀ Kopien/ml). -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; ^aabweichende UDPS Durchführung zu Monat 3 (Patient 1), Monat 6 (Patient 3) und Monat 9 (Patient 17); *HBV-DNA bei Patient 1 zu Monat 6, bei allen anderen Patienten zu Monat 12

Die mediane **HBV-DNA-Serumkonzentration** der Patienten mit LAM-Resistenzvarianten liegt zur BL bei 7,92±0,71 (6,46-8,21) log₁₀ Kopien/ml und mit EP-Nachweis von LAM-Resistenzvarianten (Patienten 3, 12, 17) bei 2,56±0,49 (1,72-2,58) log₁₀ Kopien/ml zu Monat 12 bzw. bei Patient 1 bei 2,09 log₁₀ Kopien/ml zu Monat 6. In der weiteren Nachbeobachtung zeigt Patient 12 zu Monat 15 eine weitere Abnahme der Virämie auf 1,61 log₁₀ Kopien/ml (Daten nicht aufgeführt). Die Virämie der drei Patienten mit LAM-Resistenzvarianten zum EP liegt bei Monat 12 >1 log-Stufe unter der Virämie der sechs ADV-resistenten Patienten.

Zusammengefasst halbiert sich sowohl die Anzahl der Patienten mit LAM-Resistenzvarianten von acht auf vier Patienten als auch die absolute LAM-Resistenzvariantenzahl von 19 auf zehn Varianten. Der prozentuale Anteil an allen NA-Resistenzvarianten nimmt von 51% (19/37) zur BL auf 40% (10/25) ab, stellt jedoch weiterhin den größten Anteil der NA-Resistenzvarianten. Die Patienten mit LAM-Resistenzvarianten zum EP weisen weiterhin eine persistierende Virämie auf, allerdings auf deutlich tieferem Niveau im Vergleich zu den Patienten mit ADV-Resistenzvarianten.

5.6.5 Entwicklung der ETV-Resistenzvarianten

5.6.5.1 Allgemein

Die ETV-Resistenzvarianten stellen den kleinsten Anteil der detektierten NA-Resistenzvarianten dar und treten meist in Kombination mit anderen NA-Resistenzvarianten auf.

Zur **BL** werden fünf Varianten verteilt auf zwei mit ETV vorbehandelte Patienten (Patienten 1, 3) detektiert. Sie treten als Minorvarianten (2/5, Patient 1: rtT184S mit 4,9% und rtM250V mit 4,0%) und dominante Varianten auf (3/5, Patient 1: rtT184A mit 91,2%, Patient 3: rtT184A mit 50,8% und rtS202G mit 44,5%) (siehe Tabelle 29 und Abbildung 13 auf Seite 61).

Zum **EP** zeigt sich eine Zunahme der ETV-Resistenzvarianten auf sechs Varianten. Jedoch sind zwei BL Minorvarianten des mit ETV vorbehandelten Patienten 1 (rtT184S und rtM250V) im Verlauf nicht mehr nachweisbar sind. Stattdessen treten jedoch erstaunlicher Weise drei ETV-Resistenzvarianten bei drei ETV-naiven Patienten neu auf mit breitem Prävalenzspektrum (Patient 7: rt250V mit 2,5%, Patient 13: rtS202G mit 5,2% und Patient 17: rtS202G mit 98,0%). Die bei den mit ETV vorbehandelten Patienten persistierenden Varianten bleiben bei Patient 3 von der Prävalenz her in etwa gleich (44,5 bis 52,3%), bei Patient 1 ist eine leichte Prävalenzabnahme der Variante rtT184A zu verzeichnen (BL 91,2% auf Monat 3 56,6%). Kurzzeitig ist bei Patient 5 zu Monat 6 eine Minorvariante rtT184A (1,6%) zu finden, welche jedoch zum EP nicht mehr nachweisbar ist. Die Varianten rtl169T, rtT184F/G/I/L und rtS202I werden zu keinem Zeitpunkt detektiert.

5.6.5.2 Einzelverläufe

Außer bei den zwei mit ETV vorbehandelten Patienten 1 und 3 zeigen sich bei keinem weiteren Patienten ETV-Resistenzvarianten zur BL. Bei diesen beiden Patienten liegt eine Persistenz der BL-Varianten in Kombination mit den LAM-Resistenzvarianten rtL180M+rtM204V vor, wobei diese bei Patient 3 von gleichbleibender Prävalenz bleiben (rtT184A mit 50,8-56,6% und rtS202G mit 44,5-46,0%), während es bei Patient 1 zu einer Prävalenzabnahme der Variante

rtT184A von 91,2 auf 56,6% kommt und die beiden Minorvarianten rtT184S (4,9%) und rtM250V (4,0%) im Verlauf nicht mehr detektierbar sind.

Zum EP treten bei drei Patienten, welche nicht im Vorfeld mit ETV behandelt wurden, ETV-Resistenzvarianten neu auf (Patienten 7, 13, 17: zweimal rtS202G, einmal rtM250V). Bei Patient 13 findet sich neu die Intermediärvariante rtS202G (5,2%) in Kombination mit einer ebenso neu auftretenden dominanten ADV-Resistenzvariante rtN236T (99,0%), wohingegen die Variante rtS202G bei Patient 17 als dominante Variante (98,0%) in Kombination mit den LAM-Resistenzvarianten rtL180M+rtM204V auftritt. Nur ein Patient (Patient 7) weist eine isolierte ETV-Minorvariante (rtM250V mit 2,5%). Ansonsten liegen die ETV-Varianten stets in Kombination mit LAM- (Patienten 1, 3, 17) oder ADV-Resistenzvarianten (Patient 13) vor. Transient tritt die Minorvariante rtT184A (1,6%) bei Patient 5 einmalig zu Monat 6 auf.

Tabelle 29: ETV-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie

	BL			EP		
	andere Resistenzvarianten	ETV-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)	andere Resistenzvarianten	ETV-Resistenzvarianten	HBV-DNA (log ₁₀ Kopien/ml)
1	LAM	rtT184A (91,2), rtT184S (4,9), rtM250V (4,0)	7,60	LAM, ADV	rtT184A (56,6) ^a	2,09*
3	LAM	rtT184A (50,8), rtS202G (44,5)	8,21	LAM	rtT184A (52,3), rtS202G (45,9) ^a	1,72
7	ADV, LAM	-	8,00	-	rtM250V (2,5)	4,10
13	-	-	8,00	ADV	rtS202G (5,2)	3,44
17	ADV, LAM	-	6,46	LAM	rtS202G (98,0)	2,58

Darstellung der ADV- und. begleitenden ADV-/LAM-Resistenzvarianten zur BL bzw. zum EP der TDF-Monotherapie detektiert mittels UDPS (Prävalenz der patientenspezifischen Viruspopulation in %), sowie Angabe der HBV-DNA (in log₁₀ Kopien/ml). -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; ^aabweichende UDPS Durchführung zu Monat 6 (Patienten 1, 3); *HBV-DNA bei Patient 1 zu Monat 6, bei allen anderen Patienten zu Monat 12

Die mediane **HBV-DNA-Serumkonzentration** der Patienten mit ETV-Resistenzvarianten liegt zur BL bei 7,90±0,43 (7,60-8,21) log₁₀ Kopien/ml und bei Patienten mit EP-Nachweis von ETV-Resistenzvarianten zu Monat 12 bei 3,01±1,04 (1,72-4,11) log₁₀ Kopien/ml und weist eine große Streubreite auf. Patient 1 weist wie bereits vorher erwähnt zu Monat 6 ein Virämie von 2,09 log₁₀ Kopien/ml auf.

Zusammengefasst treten neue ETV-Resistenzvarianten unter der TDF-Monotherapie mit variablem Prävalenzspektrum auf. Meist sind diese Varianten in Kombination mit anderen NA-Resistenzvarianten zu finden, sie nehmen weiterhin den kleinsten Teil der NA-Resistenzvarianten ein. Die Patienten mit ETV-Resistenzvarianten zum EP zeigen weiterhin

eine persistierende Virämie zu Monat 12 allerdings auf tieferem Niveau als die Patienten mit ADV-Resistenzvarianten.

5.6.6 Shift der NA-Resistenzvarianten und Auswirkung auf die Dynamik der HBV-DNA

Es zeigt sich in der gesamten Kohorte eine leichte quantitative *Shift* zugunsten der ADV-Resistenzvarianten mit konstantem prozentualen Anteil an den Gesamtvarianten (BL: 35% (13/37) und EP 36% (9/25)) und eine Zunahme der ETV-Resistenzvarianten (BL: 14% (5/37) und EP 24% (6/25)). Die Anzahl der Patienten mit ADV-Resistenzvarianten nimmt um eine Person auf sieben Patienten zum EP ab, wohingegen die Anzahl der Patienten mit ETV-Resistenzvarianten von zwei auf fünf Patienten zunimmt. Die LAM-Resistenzvarianten werden hingegen weniger selektiert. Sie nehmen zwar weiterhin den größten Anteil der NA-Resistenzvarianten zum EP ein, aber sowohl die Anzahl der Patienten als auch der nachgewiesenen Varianten halbiert sich (BL 51% (19/37) verteilt auf acht und EP 40% (10/25) verteilt auf vier Patienten).

Die Beobachtung des medianen HBV-DNA Verlaufs der Patienten mit Nachweis von ADV-Resistenzvarianten zum EP zeigt, dass diese Patienten die höchste persistierende Virämie der Kohorte aufweisen im Vergleich zu den WT-Patienten bzw. zu den in einer Gruppe zusammengefassten verbleibenden Patienten mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten – da meist in gegenseitiger Kombination auftretend- (aber ohne Kombination mit ADV-Resistenzvarianten). Die mediane HBV-DNA-Serumkonzentration zu Monat 12 liegt bei den Patienten mit ADV-Resistenznachweis zum EP bei $3,57 \pm 0,72$ ($2,14-3,96$) \log_{10} Kopien/ml), in der Gruppe der verbleibenden Patienten mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten (ohne Kombination mit ADV-Resistenzvarianten) bei $2,57 \pm 0,99$ ($1,72-4,10$) \log_{10} Kopien/ml), ($t(8)=0,717$, $p=0,303$) bzw. mit WT-Nachweis bei $3,05 \pm 0,96$ ($2,52-4,92$) \log_{10} Kopien/ml, $t(10)=0,007$, $p=0,995$). Der Unterschied ist nicht statistisch signifikant. In letzter Gruppe wurde Patient 15 wegen Dosishalbung und hierunter steigender Viruslast nach Monat 6 nicht mehr in der Kalkulation berücksichtigt. Erstaunlich ist die trotzdem ebenfalls stark erhöhte persistierender Virämie der verbleibenden WT-Patienten ohne offensichtliche Hinweise auf Therapie-Non-Adhärenz.

Weiterhin zeigt sich, dass die Patienten mit Nachweis von ADV-Resistenzvarianten zum EP eine gleich hohe BL-Virämie (mediane HBV-DNA $7,9 \pm 0,56$ ($6,68-8,00$) \log_{10} Kopien/ml) haben wie die Gruppe der Patienten mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten (mediane HBV-DNA $7,96 \pm 0,80$ ($6,46-8,21$) \log_{10} Kopien/ml) bzw. eine etwas höhere Virämie als die Patienten mit WT (mediane HBV-DNA $6,98 \pm 0,91$ ($6,30-8,80$) \log_{10} Kopien/ml). Dieser Unterschied zeigt sich nicht signifikant ($t(9)=-0,158$, $p=0,878$ bzw. $t(12)=0,78$, $p=0,451$).

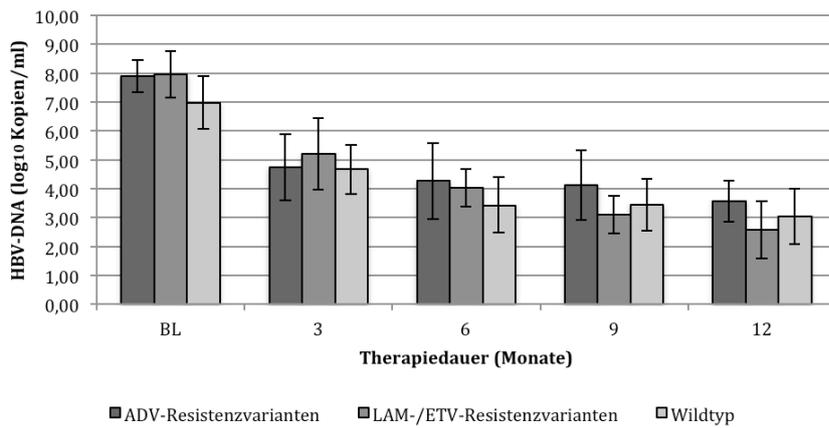


Abbildung 14: Medianer HBV-DNA Verlauf in Abhängigkeit der zum EP nachgewiesenen NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

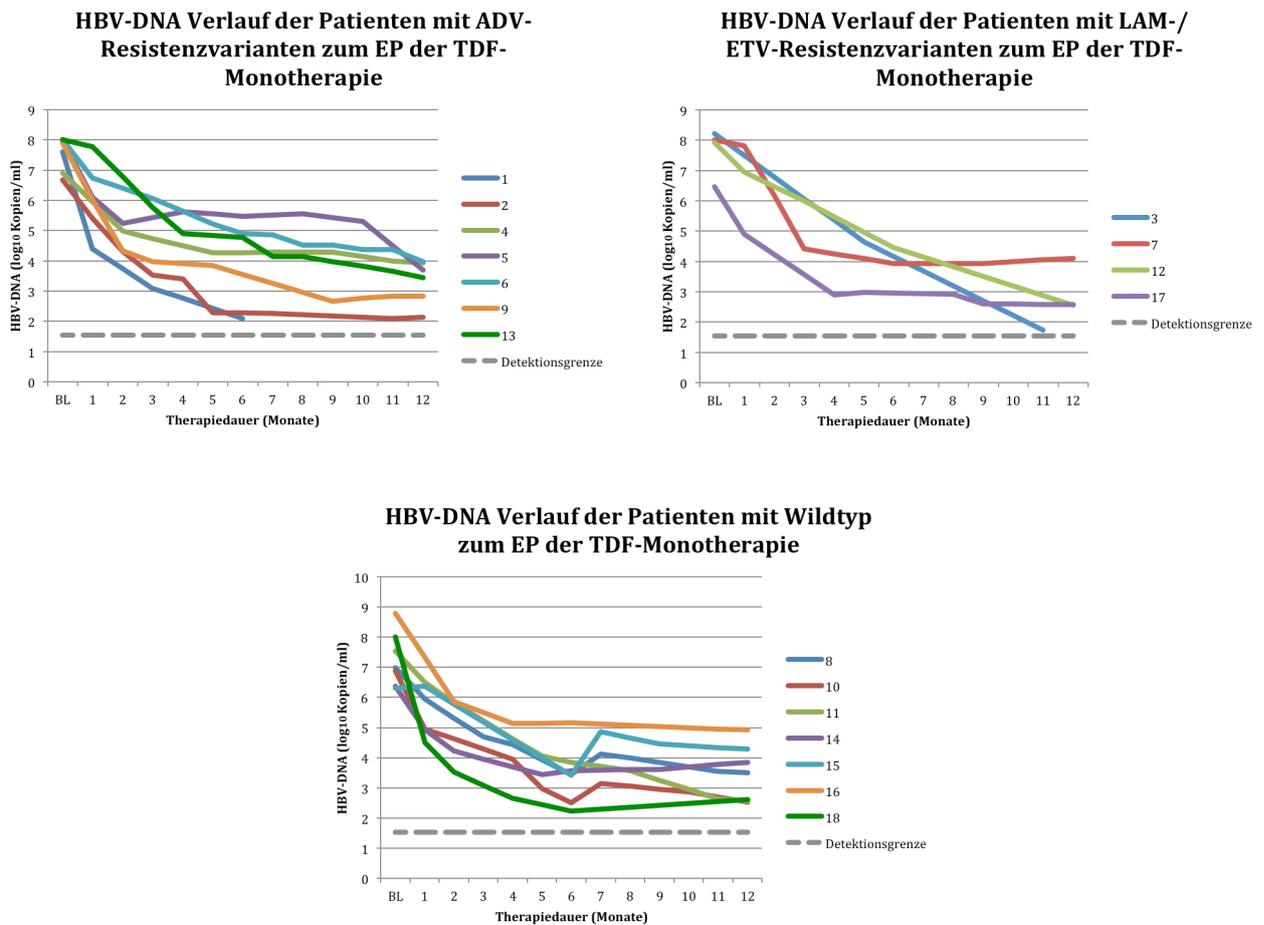


Abbildung 15: HBV-DNA Einzelverläufe in Abhängigkeit der zum EP nachgewiesenen NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

5.6.7 Entwicklung der potentiellen NA-Resistenzvarianten

5.6.7.1 Allgemein

Zum anderen werden die Varianten rtV191I, rtA194T, rtS219A, rtT128A/I/D/N, rtN238D/H/Y/T untersucht, welche als potentielle NA-Resistenzvarianten diskutiert werden. Von diesen können insgesamt 46 Varianten detektiert werden (1,07/Probe) bei 43 Proben. Der größte Anteil der detektierten Varianten liegt als dominante Variante vor mit 52% (24/46), gefolgt von 33% (15/46) als Minorvarianten und 15% (7/46) als Intermediärvarianten (siehe Tabelle 30).

Von den zur BL 23 potentiellen NA-Resistenzvarianten bei dreizehn Patienten sind zum EP nur noch zehn bei neun Patienten weiterhin nachweisbar. Von diesen Resistenzvarianten zeigen fünf Varianten eine Zunahme des Prävalenzanteils (Patient 2: rtT128N und Patient 5: rtS219A auf >99,0%, Patient 17: rtN238H auf 99,1%, Patient 9: rtS219A auf 2,0%) und drei Varianten einen gleichbleibenden Prävalenzanteil (Patient 1: rtT128N, Patient 3: rtN238H, Patient 12: rtT128I mit 96,3-99,1%) im Sinne einer Persistenz unter TDF-Monotherapie. Patient 18 zeigt eine Prävalenzabnahme einer BL-Intermediärvariante unter TDF-Monotherapie zu Monat 9 (rtV191I mit 3,6%). Bei drei Patienten tritt eine potentielle NA-Resistenzvariante neu im Verlauf als Intermediär- bzw. Minorvariante auf (Patient 2: rtN238Y mit 10,12% und Patient 7 mit rtT128A 1,0%), sowie transient zu Monat 6 bei Patient 5 (rtN238D mit 8,71%).

Dreizehn potentielle NA-Resistenzvarianten verteilt auf sieben Patienten werden im Verlauf der TDF-Monotherapie nicht mehr detektiert. Hiervon liegen ungefähr die Hälfte als Minorvarianten vor (7/13, Patient 5: rtT128I und rtV191I, Patient 7: rtN238T, Patient 9: rtV191I, Patient 10: rtS219A und rtT128N, Patient 13: rtT128I), vier als Intermediärvarianten (Patient 7: rtV191I, Patient 10: rtT128D und rtV191I, Patient 11: rtT128N) und zwei als dominante Varianten (Patient 5: rtT128N, Patient 6: rtS219A). Analog zu den oben erläuterten bekannten NA-Resistenzvarianten kommt es auch hier v.a. zu einer Selektion der dominanten BL-Varianten, währenddessen die Minorvarianten und intermediären Varianten im Verlauf nicht mehr detektiert sind.

Tabelle 30: Anteil der potentiellen HBV NA-Resistenzvarianten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten vor bzw. während antiviraler Behandlung mit TDF

Baseline																		
	rtV191I		rtA194T			rtS219A		rtT128N		rtT128I		rtT128A/D		rtN238H		rtN238DY	rtN238T	
	UDPS	TG	UDPS	TG	LiPa	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	UDPS	TG
1	-	-	-	-	-	-	-	99,1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	38,1	T/N	-	-	-	-	96,9	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,0	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	1,0	-	-	-	-	95,1	+	49,0	T/N	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	29,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,2	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	1,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	18,6	-	-	-	-	3,0	-	1,6	-	-	-	D 7,04	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	5,6	-	-	-	-	-	-	-	-	96,0	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98,8	+	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3,1	-	-	-	-	-
18	17,2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Σ	5	0	0	0	0	4	1	5	3	3	1	1	0	3	1	0	2	1

Monat 3																		
	rtV191I		rtA194T			rtS219A		rtT128N		rtT128I		rtT128A/D		rtN238H		rtN238DY	rtN238T	
	UDPS	TG	UDPS	TG	LiPa	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	UDPS	TG
1	-	-	-	-	-	-	-	99,0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	1,4	-	-	-	-	-	98,9	-	-	-	-
3	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
4	-	-	-	-	(T+)	-	-	5,4	-	-	-	-	-	-	-	-	1,2	-
5	-	-	-	-	-	99,2	+	63,2	T/N	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	24,5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Σ	0	0	0	0	1	2	2	4	2	0	0	0	0	1	0	0	1	0

Monat 6																		
	rtV191I		rtA194T			rtS219A		rtT128N		rtT128I		rtT128A/D		rtN238H		rtN238DY	rtN238T	
	UDPS	TG	UDPS	TG	LiPa	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	UDPS	TG
1	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
2	-	-	-	-	-	-	-	99,4	T/N	-	-	-	-	85,3	-	Y 10,12%	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	99,1	+	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	89,7	S/A	42,8	N/I	-	-	-	-	-	-	D 8,71	-	-
6	-	-	-	-	-	40,9	S/A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	98,8	+	-	-	-	-	-	-	-
Σ	0	0	0	0	0	2	2	2	2	1	1	0	0	2	1	2	0	0

Monat 9																		
	rtV191I		rtA194T			rtS219A		rtT128N		rtT128I		rtT128A/D		rtN238H		rtN238DY	rtN238T	
	UDPS	TG	UDPS	TG	LiPa	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	UDPS	TG
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	96,3	+
18	3,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Σ	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1

Monat 12																		
	rtV191I		rtA194T			rtS219A		rtT128N		rtT128I		rtT128A/D		rtN238H		rtN238DY	rtN238T	
	UDPS	TG	UDPS	TG	LiPa	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	TG	UDPS	UDPS	TG
1	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
2	na	na/-	na	na	-	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
3	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	99,7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	na/-	-	na	-	-	na	-	na	-	na	-	na	-	na	-	-	na
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A 1,0	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	-	-	-	-	-	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
12	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	na/-	-	na	-	-	na	-	na	-	na	-	na	99,1	na	-	-	na
18	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv	nv
Σ	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0

Darstellung der potentiellen HBV NA-Resistenzvariante zur BL, Monat 3, 6, 9, 12 der TDF-Monotherapie der Patienten 1-18 detektiert mittels UDPS, TG und LiPa. Angabe der Resistenzvarianten-Prävalenz an der patientenspezifischen Viruspopulation in % bei UDPS. -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; nv: keine Serumprobe verfügbar; na: Serumprobe nicht amplifizierbar.

5.6.7.2 Einzelverläufe

Die Variante **rtV191I** wird zur BL fünfmal per UDPS nachgewiesen (Patienten 5, 7, 9, 10, 18) jeweils als Minor- oder Intermediärvariante mit Prävalenz <20% an der patientenspezifischen Viruspopulation. Sie persistiert allerdings nur bei einem Patienten (Patient 18) mit abnehmender Prävalenz von 17,2 auf 3,6% zu Monat 9. Eine Detektion durch direkte Sequenzierung findet nicht statt.

Die Variante **rtA194T** wird durch UDPS und direkte Sequenzierung keimlich nachgewiesen, eine schwach positive Bande zeigt sich einmalig mit INNO-LiPa bei Patient 4 zu Monat 3.

Die Variante **rtS219A** wird in variablem Frequenzspektrum viermal (Patienten 5, 6, 9, 10) per UDPS zur BL detektiert. Eine durchgehende Persistenz liegt nur bei zwei Patienten (Patienten 5, 9) vor, hierbei nimmt die Prävalenz der Variante bei Patient 5 leicht zu (von 95,1 auf 99,7%), bei Patient 9 bleibt diese ungefähr gleich (2%). Bei den anderen beiden Patienten erfolgt keine weitere Detektion. Bei Patient 6 ist trotz initialem Prävalenzanstieg (von 29,8% zur BL auf 40,9% Monat 6) zu Monat 12 kein Nachweis mehr möglich.

Die Variante **rtT128N** ist zur BL fünfmal (Patienten 1, 2, 5, 10, 11) detektiert mit Persistenz der drei dominanten Varianten (Patient 1: 99,0% bis Monat 3, Patient 2: 99,4%, Patient 5: 42,8% bis Monat 6). Zu Monat 12 ist jedoch auch bei Patient 5 kein weiterer Nachweis möglich. Die Varianten **rtT128I** bzw. **rtT128D** werden dreimal (Patienten 5, 12, 13) bzw. einmal (Patient

10) zur BL nachgewiesen. Allerdings zeigt sich nur bei einem Patienten, welcher die rtT128I Variante in hoher Prävalenz (98,8%) aufweist eine Persistenz im Verlauf mit gleichbleibendem Prävalenzanteil. Die restlichen rtT128I/T Varianten sind nicht mehr nachweisbar. **rtT128A** tritt einmalig neu als Minorvariante zu Monat 12 bei Patient 7 auf.

Die Varianten **rtN238H** bzw. **rtN238T** werden zur BL dreimal (Patienten 2, 3, 17) bzw. zweimal (Patienten 7, 11) detektiert. Hiervon zeigt sich bei vier Patienten eine Persistenz zum Teil mit bereits initial hohem Prävalenzanteil (Patienten 2, 3, 11 85-96,3%) bzw. mit Zunahme (Patienten 17 3,1 auf 99,1%). Bei Patient 2 mit Genotyp B stellt rtH238 die Wildtypvariante dar. Patient 7 zeigt keine weitere Detektion der BL-Minorvariante rtN238T (Prävalenz 2,2%). Die Varianten **rtN238D** und **rtN238Y** können jeweils einmalig zu Monat 6 bei Patient 2 und 5 nachgewiesen werden.

5.6.8 Entwicklung der HBsAg-Varianten

5.6.8.1 Allgemein

Insgesamt beträgt die Anzahl der detektierten HBsAg-Varianten zur BL 29, zu Monat 3 sechs, zu Monat 6 fünf, zu Monat 9 eine und zu Monat 12 zwei HBsAg-Varianten. Der größte Anteil hiervon sind Stoppcodon-Varianten (sW182s, sW172s, sW196s): zur BL 17/29, Monat 3 3/6, Monat 6 2/5, Monat 9 1/1 und Monat 12 1/2.

Der größte Anteil (53% (23/43)) der HBsAg-Varianten ist als Minorvariante und 35% (15/43) als dominante Varianten zu finden. Am häufigsten wird zur BL die Stoppcodon-Variante sW182s (6/29) detektiert, gefolgt von den Varianten sW172s, sI195M, sW196s und sW196L (je 4/29). Auffällig ist, dass die meisten der HBsAg-Varianten im Verlauf nicht weiter selektiert werden. Zum EP sind nur noch neun HBsAg-Varianten zu beobachten. Von diesen sind nur noch die Stoppcodon-Varianten sW182s einmal (Patient 18) und sW172s zweimal (Patienten 1, 5) zu detektieren sowie sE164D zweimal (Patienten 1, 12) und sI195M dreimal (Patienten 1, 3, 17) (siehe Tabelle 31).

Wie bereits erwähnt, wird die Stoppcodon-Variante **sW182s**, korrespondierend zur rtV191I Variante, am häufigsten unter den Stoppcodon-Varianten zur BL detektiert (6/29). Jedoch wird sie nur bei einem Patienten im Verlauf der TDF-Monotherapie weiterhin detektiert und bei diesem ebenfalls mit abnehmender Prävalenz (Patient 18 BL 17,3%, Monat 9 3,7%). Bei Patient 10, der einen Nachweis der sW182s-Variante im ähnlichen Prävalenzbereich wie Patient 18 aufweist (18,8%), kann die Variante ebenso wie bei allen anderen Patienten mit sW182s BL-Nachweis (Patienten 5, 7, 8, 9) im Verlauf nicht mehr nachgewiesen werden.

Tabelle 31: Anteil der HBsAg-Varianten zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten vor bzw. während antiviraler Behandlung mit TDF

	Baseline	Beobachtungszeitpunkt (Monat)			
		3	6	9	12
1	sE164D (2,79), <u>sI195M (99,23)</u>	sE164D (42,83), sW172s (1,72), <u>sI195M (99,05)</u>	na	nv	nv
2	<u>sI195M (1,59)</u>	-	-	nu	na
3	<u>sI195M (99,40)</u>	nv	<u>sI195M (99,37)</u>	nu	na
4	-	-	sW172s (25,98)	nu	-
5	sW172s (1,48), sW182s (1,35)	sG145R (3,71)	-	nu	sW172s (1,15)
6	sW196s (1,87), sW199s (1,00)	sW196s (1,54), sW199s (1,67)	sW199s (2,11)	nu	-
7	sW172s (5,89), sW182s (11,52), sW196L (2,16), sW196s (0,99)	nu	nu	nu	-
8	sW172s (3,55), sW182s (1,03) <u>sE164D (42,28)</u> , sW182s (1,11), <u>sI195M (55,31)</u> , sW196L (1,42), sW196s (31,30), sW199s (26,45)	nu	nu	nu	-
9	sW172s (6,63), sW182s (18,75), sW199s (2,31)	nu	nu	nu	-
10	sG145R (4,5)	nu	nu	-	nv
11	<u>sE164D (27,88)</u> , sW196L (99,04)	nu	<u>sE164D (24,22)</u> , <u>sW196L (99,56)</u>	nv	na
12	-	nu	nu	nu	-
13	-	nu	nu	nu	-
14	-	nu	nu	nu	-
15	-	nu	nu	nu	-
16	-	nu	nu	nu	-
17	sW196L (4,78), sW196s (4,90)	nu	nu	nu	sI195M (99,41)
18	sW182s (17,27)	nv	nu	sW182s (3,70)	nv

Darstellung der HBsAg-Varianten zu BL, Monat 3, 6, 9, 12 der TDF-Monotherapie der Patienten 1-18 detektiert mittels UDPS und TG (unterstrichen). Angabe der Prävalenz an der patientenspezifischen Viruspopulation in % bei UDPS. -: keine Variante detektiert bzw. <1% Prävalenz; nv: keine Serumprobe verfügbar; na: Serumprobe nicht amplifizierbar; nu: Serumprobe nicht untersucht.

Die Stoppcodon-Variante **sW172s**, korrespondierend zur Variante rtA181T, tritt zur BL bei vier Patienten auf (Patienten 5, 7, 8, 10) mit maximalem Prävalenzanteil von 6,6%. Nur bei einem Patienten persistiert die Variante sW172s bis Monat 12 als Minorvariante (Patient 5). Bei den anderen Patienten mit BL-Nachweis ist diese im Verlauf nicht mehr detektierbar. Ein Neuauftreten von sW172s ist im Verlauf bei zwei Patienten zu beobachten, einmal als Minorvariante (Patient 1 Monat mit 3 1,7%) und einmal als dominante Variante (Patient 4 Monat mit 6 25,9%), letztere ist allerdings nicht persistierend und interessanter Weise auch ohne Nachweis der korrespondierenden rtA181T Variante.

Die Stoppcodon-Varianten **sW196s** und **sW196L**, korrespondierend zur Variante rtM204I, treten bei vier Patienten zur BL auf, davon in 3/4 Fällen in Kombination miteinander (Patienten 7, 9, 17) ohne jedoch weiteren Nachweis im Verlauf der TDF-Monotherapie, obwohl Patient 9 die Variante sW196s in höherer Prävalenz aufweist (31,3%). Patient 6 weist kurzzeitig zu Monat 3 noch eine Minorvariante sW196s auf, diese ist aber zu Monat 12 ebenfalls nicht mehr detektierbar.

bar. Patient 12 weist die Variante sW196L in hoher Prävalenz (99,56%) zur BL auf mit unveränderter Persistenz bis Monat 6.

Bezüglich der für die Antigen-Antikörper Bindung wichtigen HBsAg-Varianten (sG145R, sE164D, I195M, sW196S), welche zu einer reduzierten Antikörperbindung an das HBsAg führen, lässt sich folgendes beobachten:

Die Variante **sG145R** (*Vaccine Escape*) liegt nur einmal zur BL bei Patient 11 (4,5%) und bei Patient 5 zu Monat 3 vor (3,7%), eine Selektionierung der Variante findet nicht statt, im weiteren Verlauf ist diese bei beiden Patienten nicht mehr nachweisbar.

Die Variante **sE164D**, korrespondierend zur Variante rtV173L, wird insgesamt bei drei Patienten zur BL detektiert, hiervon bei zwei Patienten im dominanten Prävalenzbereich (Patient 9 mit 42,3%, Patient 12 mit 27,9%). Trotz dessen wird die Variante sE164D bei Patient 9 nicht weiter selektiert, während sie in ungefähr gleichbleibender Prävalenz bei Patient 12 bis Monat 9 persistiert. Bei Patient 1, welcher initial eine geringe Prävalenz von 2,8% aufweist, wird die Variante bis Monat 3 in einer Prävalenz von 42,8% selektiert.

Die Variante **sI195M**, korrespondierend zur rtM204V Variante, ist zur BL viermal zu beobachten, mit dreimalig dominantem Nachweis (Patienten 1, 3, 9: 55,3-99,4%) und einmal als Minorvariante (Patient 2: 1,6%). Bei letztgenanntem Patienten und ebenfalls bei Patient 9 wird die Variante im Verlauf trotz höherer Prävalenz nicht weiter selektiert. Patient 1 und 3 weisen sI195M in gleichbleibender Prävalenz weiterhin auf. Ein Neuauftreten dieser Variante ist bei Patient 17 zu Monat 12 zu beobachten mit hoher Prävalenz (99,4%) ohne vorhergehenden BL-Nachweis. Eine **Kombination sE164D** und **sI195M** liegt bei zwei Patienten vor (Patienten 1, 9).

Die Variante **sW199s** tritt zur BL dreimal auf (Patienten 6, 9, 10), ist im Verlauf jedoch nur bei Patient 6 als Minorvariante weiterhin nachweisbar.

Bei Patienten 13 bis 16 wurden keine HBsAg-Variante detektiert.

5.6.9 Entwicklung der HBV-Quasispezies

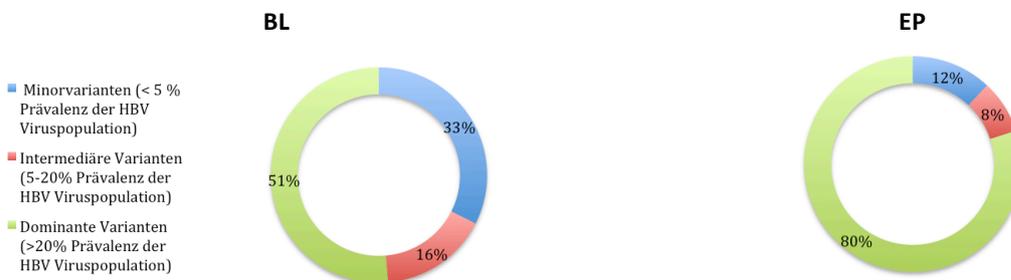
Bezüglich des Verlaufs der **HBV-Quasispezies** kommt es zu einer Homogenisierung während der TDF-Monotherapie mit Verlust der Minor- und intermediären NA-Resistenzvarianten und zu einer Selektionierung der dominanten NA-Resistenzvarianten der HBV-Population. Zu Beginn der TDF-Monotherapie ist eine große Prävalenz-Streubreite von Minor- bis zu dominanten Varianten der HBV-Population zu verzeichnen. Zum EP ändert sich dies und es sind vorwiegend dominanten NA-Resistenzvarianten zu finden. Der prozentuale Anteil der dominanten NA-Resistenzvarianten nimmt von 51% (19/37) zur BL auf 80% (20/25) zum EP zu, während die

Minor- und intermediären NA-Resistenzvarianten stark abnehmen von 33% (12/37) auf 12% (3/25) bzw. von 16% (6/37) auf 8% (2/25). 78% der ADV-, 80% der LAM- und 67% der ETV-Resistenzvarianten liegen zum EP als dominante Varianten vor (siehe Abbildung 16).

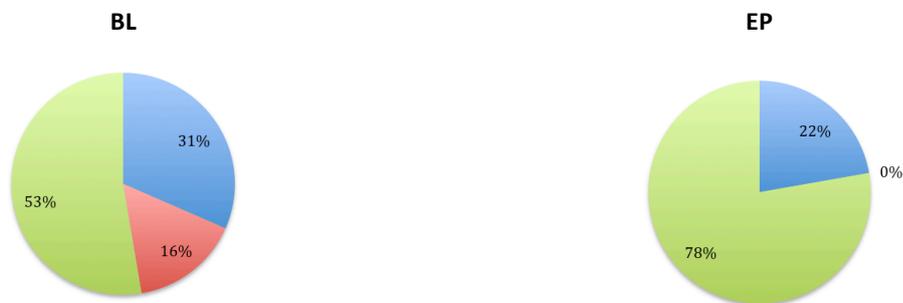
BL			EP		
ADV	LAM	ETV	ADV	LAM	ETV
4	6	2	2	1	2
3	3	0	0	1	0
6	10	3	7	8	4
13	19	5	9	10	6

Minor-NA-Resistenzvarianten
(<5% Prävalenz der patientenspezif. HBV-Population)
Intermediäre NA-Resistenzvarianten
(5-20% Prävalenz der patientenspezif. HBV-Population)
Dominante NA-Resistenzvarianten
(>20% Prävalenz der patientenspezif. HBV-Population)
Σ (absolute Anzahl)

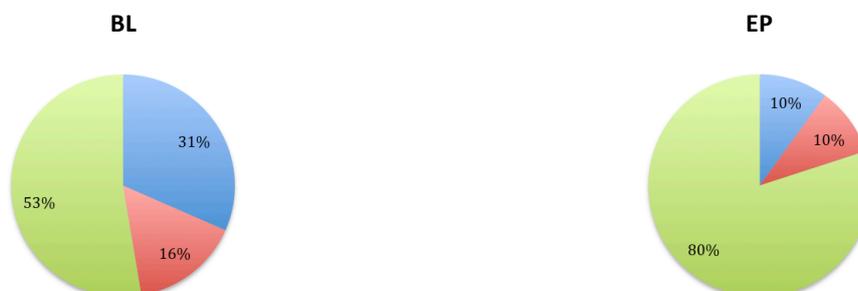
Quasispeziesanteil aller NA-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie zur/zum:



Quasispeziesanteil der ADV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie zur/zum:



Quasispeziesanteil der LAM-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie zur/zum:



Quasispeziesanteil der ETV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie zur/zum:



Abbildung 16: Prozentualer Anteil der HBV-Quasispezies zur BL bzw. EP der TDF-Monotherapie

Darstellung des prozentualen Anteils der Minor-, Intermediär- und dominanten Varianten der patientenspezifischen HBV-Population zur BL und EP während der TDF-Monotherapie in Abhängigkeit der vorliegenden NA-Resistenzvarianten.

In den meisten Fällen werden die Minorvarianten mit Prävalenz <5% an der patientenspezifischen Viruspopulation nicht weiter selektiert. Über die Hälfte der 21 BL-Resistenzvarianten, welche im Verlauf der TDF-Monotherapie nicht mehr nachweisbar sind, liegen als Minorvarianten vor (52% (11/21)). Der Anteil der Minorvarianten an den nicht weiter detektierten BL-Resistenzvarianten liegt für ADV- bei 50% (4/8), für LAM- bei 46% (5/11) und ETV-Resistenzvarianten bei 100% (2/2). Hingegen liegen die meisten der 16 persistierenden NA-Resistenzvarianten als dominante Resistenzvarianten vor (86% (14/16)) (siehe Abbildung 17). Der Anteil der dominanten Resistenzvarianten an den persistierenden BL-Resistenzvarianten liegt für ADV- bei 100% (5/5), für LAM- bei 75% (6/8) und für ETV-Resistenzvarianten bei 100% (3/3). Neuauftretende NA-Resistenzvarianten zeigen sich von gemischter Prävalenz an der Viruspopulation. Die neu aufgetretenen Resistenzvarianten sind für ADV-Resistenzvarianten je zur Hälfte dominante und Minor-Resistenzvarianten (je 2/4), für LAM- in 100% (2/2) dominante Varianten und für ETV-Resistenzvarianten in 66% (2/3) Minorvarianten.

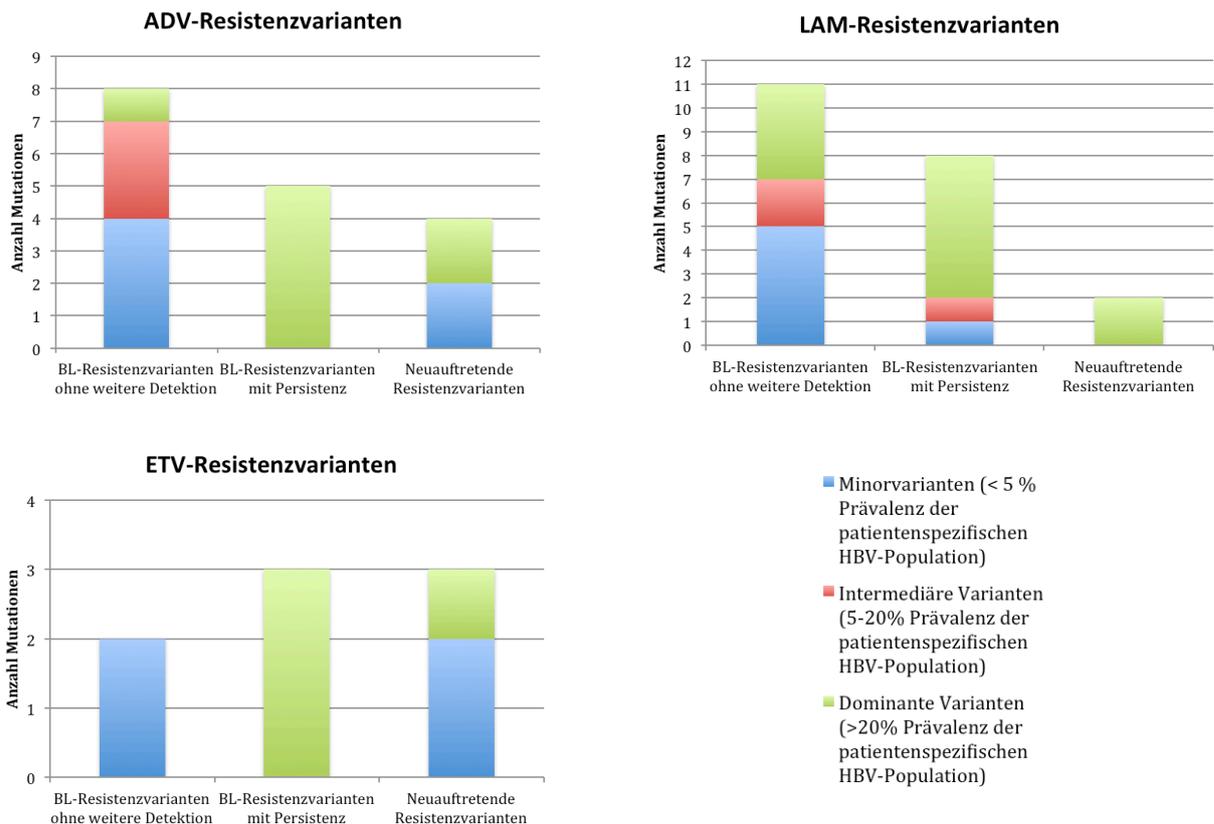


Abbildung 17: Entwicklung der HBV-Quasispezies unter TDF-Monotherapie

Darstellung des Anteils der Minor-, Intermediär- und dominanten NA-Resistenzvarianten ohne weitere Detektion, mit Persistenz und Neuauftreten in absoluten Zahlen während der TDF-Monotherapie.

5.7 Ergebnisse der direkten Sequenzierung mit *TRUGENE™ HBV Genotyping Kit (OpenGene™ DNA Sequencing System, Siemens Healthcare Diagnostic, USA)*

Insgesamt wurden 41 Serumproben mittels direkter Sequenzierung mit TG analysiert und hierbei 45 NA-Resistenzvarianten (1,1/Probe) detektiert. Zur BL können 21 NA-Resistenzvarianten (1,2/Probe, ges. 18 Proben), zu Monat 3 neun Varianten (1,8/Probe, ges. 5 Proben), zu Monat 6 zehn Varianten (1,7/Probe, ges. 6 Proben), zu Monat 9 keine Variante (ges. 2 Proben) und zu Monat 12 fünf Varianten (0,5/Probe, ges. 10 Proben) detektiert werden (siehe Tabelle 25 auf Seite 53 und Abbildung 13 auf Seite 61). Die mittels TG detektierten potentiellen NA-Resistenzvarianten können Tabelle 30 (Seite 73) und die HBsAg-Varianten Tabelle 31 (Seite 76) entnommen werden.

Bei Patient 1, 2 und 3 gelingt aufgrund geringer HBV-DNA-Serumkonzentration von 122 Kopien/ml (Patient 1 Monat 6), 121 Kopien/ml (Patient 2 Monat 12) und 52 Kopien/ml (Patient 3

Monat 12) keine direkte Sequenzierung mittels TG. Trotz einer Viruslast von 9091, 2152 bzw. 377 Kopien/ml ist bei den Patienten 6, 12 und 17 zu Monat 12 ebenfalls keine direkte Sequenzierung möglich. Die Gründe hierfür sind nicht zu eruieren. Hingegen ist für INNO-LiPa und UDPS eine Amplifikation der Serumproben von Patient 6 und 17 zu diesem Zeitpunkt möglich. Lediglich für die Serumprobe von Patient 12 zu Monat 12 ist mit allen Testsystemen keine Sequenzierung möglich. Bei den restlichen Patienten ist die Testdurchführung problemlos möglich.

5.8 Ergebnisse des *Line Probe Assays* mit *INNO-LiPa HBV DRv2 und v3* (Innogenetics, Belgium)

Es werden 44 Serumproben analysiert und 65 Resistenzvarianten (1,48/Probe) detektiert. Zur BL werden 28 Resistenzvarianten (1,6/Probe, ges. 18 Proben), zu Monat 3 elf Varianten (2,2/Probe, ges. 5 Proben), zu Monat 6 elf Varianten (1,8/Probe, ges. 6 Proben), zu Monat 9 keine Varianten (2 Proben) und zu Monat 12 fünfzehn Varianten (1,2/Probe, ges. 13 Proben) detektiert. Zusätzlich wird die Variante L80V/I, welche aufgrund der DNA-Fragmentauswahl nur durch INNO-LiPa detektierbar ist, dreimal (Patient 12 zur BL und zu Monat 6, bei Patient 17 zu Monat 12) detektiert (siehe Tabelle 25 auf Seite 56 und Abbildung 13 auf Seite 61). Die mittels INNO-LiPa detektierten potentiellen NA-Resistenzvarianten können Tabelle 30 (Seite 73) und die HBsAg-Varianten Tabelle 31 (Seite 76) entnommen werden.

Bei Patient 1 zu Monat 6 und bei Patient 3 zu Monat 12 ist wegen geringer HBV-Serumkonzentration von 122 Kopien/ml bzw. 53 Kopien/ml keine Sequenzierung mit INNO-LiPa möglich. Bei Patient 2 zu Monat 12 ist von allen Testsystemen einzig mit INNO-LiPa eine Sequenzierung bei einer HBV-DNA-Serumkonzentration 121 Kopien/ml möglich.

5.9 Vergleich der Sequenziermethoden

Im Vergleich zu den mittels UDPS detektierten **NA-Resistenzvarianten** zeigt sich INNO-LiPa deutlich sensitiver als TG. Von den 74 insgesamt durch UDPS detektierten NA-Resistenzvarianten können 43 Varianten (58%) ebenfalls durch TG und 55 Varianten (74%) durch INNO-LiPa detektiert werden. Insbesondere zeigt sich INNO-LiPa in der Detektion der Minor- und Intermediärvarianten der TG-Testung überlegen. Von den 17 per UDPS detektierten Minorvarianten wird nur eine (6%) durch TG und sechs (35%) durch INNO-LiPa detektiert. Von den neun per UDPS detektierten intermediären Varianten werden 2 (22%) durch TG und sechs (67%) ebenfalls durch INNO-LiPa detektiert.

Bei den dominanten per UDPS detektierten NA-Resistenzvarianten nähert sich die Detektionsrate von TG und INNO-LiPa an. Hier werden von den 48 per UDPS detektierten dominanten Varianten 40 (83%) mit TG und 43 (90%) ebenfalls mit INNO-LiPa detektiert.

Die mediane Prävalenz an der HBV-Population, bei der die NA-Resistenzvarianten sowohl durch UDPS als auch durch TG detektiert werden liegt bei $81,1 \pm 31,1$ (4,0-99,5) % (Mittelwert 70,1%) und für INNO-LiPa bei $68,4 \pm 38,0$ (1,6-99,6) % (Mittelwert 60,0%). Der Unterschied zeigt sich als nicht signifikant ($t(97)=1,413$, $p=0,161$). Für die per UDPS jedoch durch TG nicht detektierten NA-Resistenzvarianten liegt eine mediane Prävalenz an der HBV-Population von $2,8 \pm 13,3$ (1,0-42,8) % (Mittelwert 9,3%) und für INNO-LiPa von $2,8 \pm 26,1$ (1,0-98,0) % (Mittelwert 16,6%) vor. Der Unterschied zeigt sich als nicht signifikant ($t(43)=1,235$, $p=0,224$).

In zwei Fällen wird eine NA-Resistenzvariante durch TG detektiert, welche per UDPS nicht detektiert wird (Patient 1 Mo 3 rtA181V und Patient 17 BL rtM250V). Hingegen werden in zehn Fällen NA-Resistenzvarianten durch INNO-LiPa detektiert, welche nicht durch UDPS angezeigt werden. Diese umfassen Patient 2 zu Monat 3 rtM204M/V, Patient 4 zu Monat 3 rt194A/T, Patient 13 zu Monat 12 rtA181A/T und rtM204M/I, Patient 16 zu Monat 12 rtI233I/V, Patient 17 zur BL rtS202S/C/G und rtI233I/V und zu Monat 12 rtA181A/V, rtM204I und rtT184T/SCGA. Hierbei liegen sehr schwache Nachweisbanden in der INNO-LiPa Testung vor und die Varianten treten einmalig isoliert ohne weiteres Vorkommen in den vorherigen oder nachfolgenden *Follow-Up* Proben auf, so dass wahrscheinlich falsch positive Ergebnisse vorliegen. Einzig bei Patient 17 ist auffällig, dass die rt204I Variante zur BL mit UDPS und INNO-LiPa detektiert wird, im Verlauf jedoch nur noch durch INNO-LiPa angezeigt wird und umgekehrt beim gleichen Patienten eine rtS202G Variante zur BL nur durch INNO-LiPa schwach detektiert wird, diese im Verlauf zu Monat 12 jedoch auch durch UDPS, aber nicht mehr durch INNO-LiPa detektiert wird. Bei Patient 2 zu Monat 12 detektierte INNO-LiPa eine rtN236T Variante, wohingegen für UDPS und TG keine Amplifikation möglich war. Zu den vorherigen *Follow-Up* Zeitpunkten war ebenfalls eine Variante rtN236T bereits dominant detektierbar in allen Testsystemen, so dass vom Vorliegen der ADV-Resistenzvariante zu diesem Zeitpunkt auszugehen ist.

Bezüglich der in der Literatur als **potentielle NA-Resistenzvarianten** diskutierte Varianten werden deutlich weniger Varianten mittels TG als durch UDPS (41%, 19/46) detektiert. Dies liegt vor allem daran, dass knapp die Hälfte (22/46) der Varianten als Minor- oder Intermediärvarianten vorliegen und von diesen keine Variante durch TG detektiert wird. Es werden nur potentielle NA-Resistenzvarianten auch mit TG detektiert, welche als dominante Varianten vorliegen. 79,2% (19/24) der dominanten potentiellen NA-Resistenzvarianten werden auch mit TG detektiert (siehe Tabelle 30). Mittels INNO-LiPa ist aufgrund der Testbeschaffenheit nur die Detektion der rtA194T wie oben aufgeführt möglich.

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die HBsAg-Varianten. Nur 28% (12/43) der per UDPS detektierten **HBsAg-Varianten** können ebenfalls durch TG detektiert werden. Von diesen liegen alle als dominante Varianten vor. Hierunter wird fünfmal die HBsAg-Variante sI195M, dreimal sE164D, zweimal sW196L und je einmal die Varianten sW196s und sW199s auch per TG detektiert. Per UDPS detektierte Minor- und Intermediärvarianten werden nicht durch TG detektiert, aber auch zwei Varianten mit höherer Prävalenz werden ebenfalls nicht detektiert (Patient 4 zu Monat 6: sW172s mit 25,98%, Patient 17: sI195M mit 99,42%) (siehe Tabelle 31). Eine Testung mittels INNO-LiPa dieser Varianten ist nicht möglich.

6 Diskussion

Bezüglich des viralen Ansprechens ist es bei fast allen sowohl nicht vorbehandelten als auch vorbehandelten Patienten möglich, die virale HBV-Replikation mittels einer TDF-Monotherapie soweit zu unterdrücken, dass mit heute verwendeten, hoch-sensitiven Nachweisverfahren keine HBV-DNA mehr im Serum quantifiziert werden kann^{31,49}. Dies ist selbst bei Patienten mit vorausgegangenem partiellem Ansprechen auf ADV der Fall, obwohl hier eine potentielle Kreuzresistenz mit TDF postuliert wird⁵⁰. Eine Resistenz gegen TDF im Sinne eines Wiederaanstiegs der HBV-Replikation unter laufender TDF-Monotherapie wurde bislang nicht beschrieben, obwohl sich die chemischen Strukturen von TDF und dem relativ resistenzanfälligen ADV sehr ähnlich sind³⁰. Jedoch zeigt sich bei einigen wenigen Patienten unter TDF-Monotherapie eine fortwährende geringe Virusreplikation im messbaren Bereich ohne genaue Kenntnis der Ursache^{33,51}. Die zentrale Frage dieser Arbeit ist, ob bei Patienten mit partiellem Ansprechen auf eine TDF-Monotherapie eine Selektion von bestimmten HBV-Varianten - insbesondere den ADV-Resistenzvarianten - stattfindet und ob das Vorliegen von ADV-Resistenzvarianten einen negativen Einfluss auf die virale Suppression unter TDF-Monotherapie zeigt. Ferner soll geklärt werden, ob der Einsatz von UDPS als eines hochsensitiven Verfahrens einen Vorteil gegenüber anderen Nachweisverfahren bei der Detektion resistanzassoziierter HBV-Varianten bietet.

6.1 Patientenkohorte und Ansprechen auf die TDF-Monotherapie

Alle in dieser Studie untersuchten Patienten weisen nur ein partielles Therapieansprechen mit persistierender HBV-Virämie unter TDF-Monotherapie auf detektiert mittels hoch-sensitiver quantitativer *Real-Time*-PCRs. Das Patientengut dieser Studie ist hochselektiert, weist multiple Vorbehandlungen und vorbestehende NA-Resistenzvarianten auf. Ein solches Patientengut ist selten und nicht einfach für Studienzwecke zu finden, eignet sich aber besonders gut für longitudinale Sequenzanalysen. Es besteht aktenanamnestisch glaubhaft eine hohe Medikamen-

tenadhärenz, weshalb eine Nicht-Einnahme von TDF als Grund für das partielle Ansprechen unwahrscheinlich ist.

Die Patienten dieser Studie zeigen -wie durch die gewählten Einschlusskriterien zu erwarten- ein schlechteres Ansprechen auf eine TDF-Monotherapie als Patienten in bisherigen Studien. So erreichen nur 38,9% (7/18) der Patienten eine HBV-DNA von ≤ 400 Kopien/ml zu Monat 12. Vergleichsweise wiesen in der TDF-Zulassungsstudie 93% der HBeAg-negativen und 76% der HBeAg-positiven Patienten mit TDF-Monotherapie eine Virämie < 400 Kopien/ml in der *intention-to-treat* Analyse zu Woche 48 auf. Von den 39 Patienten der TDF-Behandlungsgruppe mit persistierender Virämie ≥ 300 Kopien/ml weisen zwei Patienten Varianten der konservierten Region ohne viralen Durchbruch auf mit in der phenotypischen Analyse erhaltenem TDF-Ansprechen bzw. nicht-replikativen Virus in der Zellkultur. Zehn Patienten zeigen einen virologischen Durchbruch bei 2/3 vermutlich bedingt durch medikamentöse Non-Adhärenz, sieben Patienten sind ohne Resistenzvariantennachweis und drei mit unterschiedlichen polymorphen Varianten. Sechs von den zehn Patienten sind in der phenotypischen Analyse weiterhin ansprechend auf TDF, vier können aufgrund von zu geringer HBV-DNA-Serumkonzentration nicht phenotypisch analysiert werden⁵². In einer retrospektiven Studie von van Bömmel et al. erreichen 95% (19/20) der Patienten mit viralem Durchbruch nach LAM-Behandlung und persistierender Viruslast unter ADV nach Umstellung auf eine TDF-Monotherapie eine Viruslast von < 400 Kopien/ml innerhalb einer medianen Zeit von 3,5 Monaten und unabhängig von vorliegenden LAM-Resistenzvarianten. ADV-Resistenzvarianten werden nicht detektiert²⁸. 81% der Patienten in der Studie von Berg et al. erreichen zu Woche 48 unter TDF- oder TDF/EMC-Behandlung eine Viruslast von < 400 Kopien/ml unabhängig von LAM- oder ADV-Resistenzvarianten⁵⁰.

Das suboptimale Therapieansprechen mit weitergehender viraler Replikation zu Monat 12 der Behandlung stellt ein Risiko dar für die Selektion von NA-Resistenzvarianten und somit für die Gefahr eines Therapieversagens und progredienten Krankheitsverlaufs mit Entwicklung von Leberzirrhose und Hepatozellulärem Karzinom^{12,53}.

6.2 Entwicklung und Einfluss der ADV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

Passend zu den LAM- und ADV-Vorbehandlungen werden bereits zu Beginn der TDF-Monotherapie bei der Mehrheit der Patienten (67%, 12/18 Patienten) NA-Resistenzvarianten detektiert. Zum letzten Zeitpunkt unter TDF-Monotherapie, zu dem noch eine Detektion von HBV-Varianten möglich war, werden ebenfalls noch bei 61% (11/18) der Patienten NA-Resistenzvarianten nachgewiesen. Während der TDF-Monotherapie ist in dieser Kohorte eine

leichte quantitative *Shift* zugunsten der Selektion von ADV-Resistenzvarianten zu bemerken. Diese zeigen nur eine leichte Anzahlabnahme und bleiben konstant in ihrem prozentualen Anteil an den Gesamtresistenzvarianten (BL 35% (13/37) und EP 36% (9/25)). Von initial acht wiesen weiterhin sieben Patienten weiterhin zum EP ADV-Resistenzvarianten auf. Hingegen halbiert sich sowohl die Anzahl der Patienten mit LAM-Resistenzvarianten als auch die Anzahl dieser Varianten (BL 51% (19/37) verteilt auf acht und zum EP 40% (10/25) verteilt auf vier Patienten).

Von initial dreizehn ADV-Resistenzvarianten bei acht Patienten zur BL persistieren fünf Varianten bei vier Patienten bis zum EP. Bei diesen liegen die selektierten Resistenzvarianten meist als dominante Varianten vor, während die Minor- oder intermediären Resistenzvarianten zur BL nicht weiter selektiert werden, so zum Beispiel sämtliche rtA181T-Varianten. Weiterhin liegen die ADV-Resistenzvarianten zur BL häufiger in Kombination miteinander vor (viermal rtA181V+rtN236T) und weniger als Einzelvarianten (einmal rtN236T, dreimal rtA181T). Nur bei einem Patienten (Patient 5) zeigt sich jedoch die Kombinations-Variante rtA181V+rtN236T konstant über den gesamten TDF Behandlungsverlauf nachweisbar, wobei bei diesem Patienten beide Varianten als dominante Varianten vorliegen im Gegensatz zu den anderen Patienten, bei denen jeweils eine der Varianten als Minor- oder Intermediärvariante vorliegt. Der geringere Prävalenzanteil dieser Varianten an der Quasispezies ist der wahrscheinlichste Grund für die fehlende weitere Selektion und das vermehrte Vorkommen von Einzelvarianten zum EP (rtN236T dreimal, rtA181T bzw. rtA181V je einmal). Eine Ausnahme hiervon stellt Patient 17 dar, bei dem auch die dominante Variante rtN236T (41,2%) nicht weiter selektiert wird. Erstaunlicherweise tritt bei einem anderen Patienten die Kombination rtA181V+rtN236T neu auf (Patient 9 mit 1,8 bzw. 21,1%). Weiter auffallend ist, dass in der aktuellen Kohorte ausschließlich die Varianten rtA181V und rtN236T selektiert werden. Die Variante rtA181T tritt nur einmalig im Verlauf als Minorvariante neu auf (Patient 1 zu Monat 3), wohingegen die zur BL dreimal vorhandenen rtA181T-Varianten als Minorvarianten auftretend mit max. Prävalenz von 6,4% nicht mehr detektiert werden. Analog zu den aktuellen Beobachtungen zeigt sich in der klonalen Analyse von Tan et al. bei zwei Patienten trotz persistierender HBV-DNA zu Monat 15 (2,5-3,1 log₁₀ Kopien/ml) unter TDF-Monotherapie eine fehlende weitere Detektion von zur BL vorhandenen ADV-Minorvarianten (1/21 Klonen rtA181T bzw. 1/22 Klonen rtN236T). Bei einem anderen Patienten mit persistierender Viruslast von 4,7 log₁₀ Kopien/ml zu Monat 12 zeigt sich hingegen eine Entwicklung von zur BL 31/31 vorliegenden Klonen mit rtA181V- und 1/31 Klonen mit rtN236T-Nachweis auf 24/24 Klone mit rtA181V- und 2/24 Klonen zusätzlich mit rtN236T-Nachweis im Therapieverlauf⁵⁴. Auch in anderen klinischen Studien zeigt sich ein variabler Verlauf bezüglich der ADV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie zum einen mit Persistenz und Neuauftreten von ADV-Resistenzvarianten, aber auch fehlender weiterer Detektion von initial vorhande-

nen Varianten^{33,49}. Da in diesen Studien meist keine quantitative Bestimmung der Resistenzvarianten erfolgt, bleibt jedoch unklar, ob die im Verlauf nicht mehr detektierten Varianten ebenfalls wie in der aktuellen Kohorte vor allem als Minor- oder Intermediärvarianten auftreten und in welchem Prävalenzbereich die neu auftretenden Resistenzvarianten liegen. Weitere quantitative Studien wären sinnvoll um dies zu erörtern.

Einige Zellkulturstudien deuten darauf hin, dass ADV-Resistenzvarianten mit einer geringeren Suszeptibilität gegenüber TDF einhergehen können. Brunelle et al. können *in vitro* beim Vorliegen einer rtL180M+rtM204V+rtN236T Variante eine sechsfach verminderte Ansprechrate auf ADV und vierfach reduzierte Ansprechrate auf TDF feststellen im Vergleich zum HBV-Wildtyp⁵⁵. Das Vorliegen von rtN236T zeigt eine 3-bis 4,2-fache Resistenz zu TDF in zwei Isolaten⁵⁶. Die Variante rtA181V bewirkt *in vitro* eine 3,2-fache Reduktion der Sensitivität zu TDF und eine 10-fache Reduktion wenn sie in Kombination mit rtN236T vorliegt³². Weiterhin zeigt sich in einer Zellkulturstudie, dass die rtA181V/T Variante eine 2-bis 3-fach reduzierte Ansprechrate zu TDF bewirkt. Die Kombination von rtA181T+rtN236T in einem klonalen Genom-Isolat erhöht die Resistenzen zu LAM, ADV und TDF⁵⁷. Passend zu diesen *in vitro* Ergebnissen zeigt sich bei den aktuellen Patienten mit den ADV-Resistenzvarianten rtA181V und/oder rtN236T ebenfalls eine höhere persistierende Virämie zu Monat 12 (HBV-DNA im Median 3,57±0,72 (2,14-3,96) log₁₀ Kopien/ml) im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit LAM-und/oder ETV-Resistenzvarianten bzw. mit WT-Nachweis zum EP jedoch ohne Signifikanz (HBV-DNA im Median 2,57±0,99 (1,72-4,10), p=0,303 bzw. 3,05±0,96 (2,52-4,92), p=0,995).

Dies lässt eine verminderte Suszeptibilität der ADV-Resistenzvarianten bezüglich der TDF-Monotherapie vermuten. Zu einem ähnlichen Ergebnis bezüglich der viralen Suppressionsrate bei vorliegenden ADV-Resistenzvarianten kommt auch Keskin et al.. Bei 98 Patienten fällt eine unterschiedliche Kinetik der HBV-DNA-Regredienz unter TDF-Monotherapie bei therapienaiven, ADV-resistenten Patienten und Patienten mit einem vormals partiellen Ansprechen auf eine ADV-Behandlung auf. Es kommt signifikant schneller bei therapienaiven Patienten zu einer HBV-DNA-Abnahme im Vergleich zu ADV-resistenten oder partiell ansprechenden Patienten. Eine nicht mehr detektierbare HBV-DNA-Serumkonzentration wird in 77%, 60% bzw. 75% zu Monat 12 erreicht (keine Signifikanz)⁵⁸. Auch van Bömmel et al. zeigte in einer retrospektiven Multicenter-Analyse, dass die Variante rtN236T allein oder in Kombination mit rtA181V/T zu einem deutlich langsameren und nur partiellen Therapieansprechen führen kann. So weisen nach zwölf Monaten TDF-Monotherapie 33% der Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zur BL im Vergleich zu 90% der Patienten ohne ADV-Resistenzvarianten zur BL eine nicht detektierbare Viruslast (<400 Kopien/ml) auf. Über den gesamten Zeitraum von einer medianen Dauer von 23 Monaten liegt die Wahrscheinlichkeit eine HBV-DNA-Serumkonzentration von <400 Ko-

pien/ml zu erreichen beim Vorliegen einer ADV-Resistenzvariante zur BL bei 52% entgegen 100% bei fehlender ADV-Variante. Ein viraler Durchbruch wird ebenso wie in der jetzigen Studie nicht beobachtet²⁹. Einzig Patient 15 zeigt nach Dosishalbung einen erneuten Virämieanstieg um $>1 \log_{10}$ -Stufe. Konträr hierzu berichten die Studien von Fung et al. und Corsa et al. von keinem Unterschied in der viralen Kinetik nach ADV-Vortherapie bzw. -Resistenz bei 96 Wochen Therapiedauer^{59,60}. In der Studie von Kim et al. mit sechs ADV-resistenten Patienten kann bei einem Patienten mit der Variante rtA181V/T zur BL beobachtet werden, dass dieser eine persistierende Viruslast (HBV-DNA 85 IU/ml) nach 24 Monaten aufweist. Fünf weitere erreichen eine komplette Virussuppression, jedoch ist nicht ersichtlich, ob diese eine TDF-Monotherapie oder Kombinationstherapie mit LAM oder ETV erhielten⁶¹.

Eine Persistenz von ADV- und LAM-Resistenzvarianten kann ebenfalls in der TDF-Zulassungsstudie mit 641 Patienten über 144 Wochen Beobachtungszeitraum unter TDF-Monotherapie beobachtet werden, allerdings zeigen sich diese dort ohne Einfluss auf die TDF-Monotherapie. Zu Woche 144 der Zulassungsstudie zeigen 87% bzw. 88% der HBeAg(-) und 72% bzw. 71% der HBeAg(+) Patienten mit TDF-Monotherapie bzw. Umstellung von ADV auf *Open Label*-TDF eine HBV-DNA-Serumkonzentration <400 Kopien/ml⁴⁹. Eine persistierende Virämie ≥ 400 Kopien/ml zu Woche 144 ist sehr selten (5/641 Patienten, 0,8%) und ist nicht mit virologischer Resistenz assoziiert. Keine genetischen Substitutionen assoziiert mit einer verminderten Ansprechrate können detektiert werden mit Ausnahme einer Variante rtN236T, welche eine verminderte *in vitro* Ansprechrate für TDF zeigt. Anderweitig vorliegende ADV-Resistenzvarianten bleiben ohne Beeinflussung auf die TDF-Ansprechrate³¹. Von den im 3. Jahr noch virämischen Patienten (9/585, 2%) zeigt zu Woche 288 keiner mehr eine persistierende Virämie. Die Patienten mit persistierender Virämie zwischen Woche 144 und 192 weisen keine TDF-Resistenzvarianten oder *Low-Level*-Resistenzen auf⁶². Gegensätzlich hierzu zeigen sich in einer Studie mit zehn Patienten persistierende ADV-Resistenzen unter TDF-Monotherapie mit ähnlich verringertem Therapieansprechen wie in der aktuellen Kohorte. Sieben von diesen Patienten weisen eine persistierende Viruslast von >400 Kopien/ml zu Monat 12 auf und nach einer medianen Beobachtungsdauer von 17 Monaten sind es noch 5/10 Patienten⁵¹. Patterson et al. beobachtet ebenfalls eine Selektion der ADV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie, so zeigen vier Patienten persistierende ADV-Resistenzvarianten und bei vier Patienten tritt eine ADV-Resistenzvariante im Verlauf neu auf. Fünf von sieben Patienten mit der Variante rtN236T zur BL bleiben mit positivem HBV-DNA-Nachweis (>15 IU/ml) zu Woche 96. Bei drei von diesen Patienten kommt es nach Woche 36 zu keiner nennenswerten weiteren HBV-DNA-Regredienz. Weiterhin liegt nur ein partielles Therapie-Ansprechen bei 16 Patienten mit TDF-Monotherapie bzw. neun Patienten mit Kombinationstherapie TDF/LAM von insgesamt 59 Patienten vor, welche zu Woche 24 noch eine Viruslast von >351 IU/ml vorweisen.

Nach Umstellung der 16 Patienten ebenfalls auf eine TDF-LAM-Kombinationstherapie zeigt sich kein Unterschied im Verlauf im Vergleich zu den anderen neun Patienten im Erreichen eines nicht mehr detektierbaren Viruslevels. Die prozentuale Effektivität von TDF im Erreichen einer Suppression der Viruslast unterhalb der Nachweisgrenze ist in Pattersons Studie ebenfalls geringer als in vorherigen Studien. Insgesamt erreichen in dieser Studie 46% (27/59) zu Woche 48 und 64% (38/59) zu Woche 96 eine nicht detektierbare Viruslast <15 IU/ml ohne Unterschiede bezüglich der TDF Mono- oder Kombinationstherapie nach der 24. Woche, jedoch unabhängig vom Vorliegen einer Variante rtA181V/T oder rtN236T. Auf eine Detektionsgrenze von <400 Kopien/ml angeglichen wären es zu Woche 48 insgesamt 61%³³.

In der vorliegenden Studie weisen die Patienten mit der Variante rtN236T in drei von fünf Fällen stark und in den restlichen zwei leicht erhöhte HBV-DNA-Werte zu Monat 12 auf (3,44-3,96 bzw. 2,14-2,82 log₁₀ Kopien/ml). Der dominante Nachweis von rtA181V geht ebenfalls mit einer erhöhten Viruslast einher (3,69-3,93 log₁₀ Kopien/ml). Konträr hierzu zeigt sich bei Tan et al. bei einem Patienten mit rtA181V-Nachweis in sämtlichen Klonen eine nicht mehr detektierbare HBV-DNA-Serumkonzentration nach 12 Monaten TDF-Monotherapie. Bei einem anderen Patienten hingegen mit viralem Durchbruch unter vorgängiger ADV-Vortherapie zeigt sich nach Umstellung auf TDF-Therapie mit weiterhin persistierende Virämie zu Monat 12 (4,7 log₁₀ Kopien/ml) in der klonalen Analyse zur BL die Variante rtA181V in allen Klonen (31/31) und in einem Klon additiv die Varianten rtN236T und rtI233V sowie zu Monat 13 in 24/24 Klonen rtA181V und in zwei Klonen rtN236T⁵⁴. Ohne Einfluss auf die Abnahme der Viruslast zeigt sich bei Svarovskaia et al. das Vorliegen von rtN236T bei 14 Patienten und bei fünf Patienten das Vorliegen der Variante rtA181V/T zur BL im Vergleich zum Wildtyp über 24 Wochen TDF- bzw. TDF/EMC-Therapiedauer. Eine leichte Abnahme der Variante rtN236T ist zu beobachten⁶³, wie dies ebenfalls in der aktuellen Kohorte bei zwei von fünf Patienten mit initialem rtN236T-Nachweis der Fall ist.

ADV-Resistenzvarianten treten in der aktuellen Studie im TDF-Monotherapieverlauf ebenfalls in variabler Prävalenz an der patientenspezifischen HBV-Population bei Patienten ohne vorherigen BL-Nachweis neu auf: bei Patient 1 als Minorvariante rtA181T (1,1%) flankiert von vorbestehenden LAM- und ETV-Resistenzvarianten, bei Patient 9 als Kombinationsvarianten rtA181V mit 1,8%+ rtN236T mit 21,1% ohne weitere Detektion der vormals bestehenden dominanten LAM-Resistenzvarianten und bei Patient 13 als dominante Variante rtN236T mit begleitender ebenfalls neuauftretender ETV-Resistenzvariante (rtS202G mit 5,2%). Patient 1 weist eine recht suffiziente HBV-DNA-Regredienz auf 2,09 log₁₀ Kopien/ml zu Monat 6 auf, wohingegen die Patienten 9 und 13 mit je dominanter Variante rtN236T eine erhöhte HBV-DNA-Persistenz aufweisen (2,82 bzw. 3,44 log₁₀ Kopien/ml). Ein Neuauftreten von ADV-Resistenzvarianten unter TDF-

Monotherapie kann ebenfalls in anderen Studien beobachtet werden. So tritt bei einem Patienten der TDF-Zulassungsstudie, der zunächst ADV und folgend TDF erhielt, die Variante rtN236T nach 96 Wochen TDF-Monotherapie nach einer Periode des selbständigen Medikamentenstopps mit transientem virologischem Durchbruch auf. Nach Wiederaufnahme der TDF-Therapie kann die Viruslast bis Woche 196 zwar auf ein nicht mehr detektierbares Level supprimiert werden, jedoch besteht in der klonalen *in vitro* Analyse ein weiterhin vermindertes Ansprechen für TDF³¹. Tan et al. zeigen in klonaler Analyse eines Patienten mit suboptimalem Therapieansprechen auf TDF mit HBV-DNA-Serumkonzentration von 5,4 log₁₀ Kopien/ml ein Neuauftreten von rtI233V und/oder rtA181T in 5-17% der Klone⁵⁴.

Die als ADV-Resistenzvariante ebenfalls diskutierte Variante rtI233V wird in dieser Studie durch UDPS nur einmal als Minorvariante zur BL (Patient 5 mit 1,7%) detektiert und mit schwachem Bandennachweis zwei weitere Male durch INNO-LiPa jeweils intermittierend auftretend (Patient 17 zu BL, Patient 16 zu Monat 12). Sie tritt begleitend zu anderen Varianten auf (darunter rtA181V, rtL180M) oder isoliert. In einer Studie kann bei zwei Patienten mit partiellem Ansprechen auf TDF-Monotherapie die rtI233V Variante intermittierend bei wenigen Klonen nachgewiesen werden zusätzlich zu einer Variante rtA181V⁵⁴. Die Relevanz für das Therapieansprechen bei einem so geringen Nachweis bleibt fraglich, zumal in einer Studie von Schildgen et al. zwar ein vermindertes Ansprechen *in vitro* und *vivo* auf ADV bei drei Patienten für die Variante rtI233V beobachtet wird, jedoch das Ansprechen auf eine TDF-Therapie nicht beeinträchtigt ist⁶⁴. Weiterhin zeigt sich in einer weiteren Studie bei vier Patienten mit rtI233V klinisch wie auch *in vitro* während 48 Wochen keine verminderte Ansprechrate auf ADV⁶⁵.

Zusammenfassend lassen sich in dieser Kohorte Hinweise darauf finden, dass eine vermehrte Selektion von den ADV-Resistenzvarianten rtV181V und rtN236T unter TDF-Monotherapie stattfindet. Diese scheinen als Einzelvariante oder in Kombination die virale Suppression durch eine Monotherapie mit TDF negativ zu beeinflussen. Dies könnte auf eine klinische Bedeutsamkeit der *in vitro* beschriebenen Kreuz-Resistenz zwischen ADV und TDF hindeuten, welche sich im langfristigen Verlauf negativ auf das Therapieansprechen auswirken und zu einem progredienten Krankheitsverlauf der chronischen HBV-Erkrankung führen könnte mit vermehrter Morbidität und Mortalität. Auch könnte durch die nur partielle Suppression der HBV-Replikation die Selektion weiterer bislang nicht beschriebener Varianten im POL-Gen und/oder im überlappenden S-Gen gefördert werden. Weitere Studien sind zur Bestätigung dieser beobachteten Tendenz notwendig.

6.3 Entwicklung und Einfluss der LAM-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

Die LAM-Resistenzvarianten stellen zu Beginn wie auch zum EP den größten Anteil der Varianten dar, jedoch vermindert sich sowohl die Anzahl der Patienten als auch der nachgewiesenen Varianten um die Hälfte (BL 51% (19/37) verteilt auf acht und EP 40% (10/25) verteilt auf vier Patienten). Meist sind die LAM-Resistenzvarianten in Kombination mit ADV- oder ETV-Resistenzvarianten zu finden und isoliert zur BL nur zweimal bzw. zum EP nur einmal auftretend.

In dieser Studie zeigt sich eine Persistenz der BL-LAM-Resistenzvarianten nur bei drei Patienten (Patienten 1, 3, 12). Bezüglich der Persistenz von LAM-Resistenzvarianten ergibt sich eine unterschiedliche Studienlage, so sind in der Studie von van Bömmel et al. mit zehn Patienten unter TDF-Therapie die LAM-Resistenzvarianten im Verlauf nicht mehr nachweisbar. Weiterhin zeigen die zur BL vorliegenden LAM-Resistenzvarianten keinen Einfluss auf die TDF-Monotherapie⁵¹. In einer anderen Studie von Audsley et al. zeigt sich eine Persistenz der LAM-Resistenzvarianten bei Patienten mit HIV/HBV-Koinfektion trotz additiver Zugabe von TDF zu LAM. Weiterhin auffallend ist in dieser Studie, dass bei einem Patienten mit persistierender hoher Viruslast unter TDF-Therapie die *Triple*-Variante rtV173L+rtL180M+rtM204V besteht, wohingegen bei einem anderen Patienten trotz dem Vorliegen der gleichen *Triple*-Variante eine erfolgreiche HBV-DNA-Suppression erreicht wird⁶⁶. Diese Variantenkombination besteht ebenfalls bei Patient 1 der aktuellen Studie, welcher eine relativ zügig abfallende Virämie aufweist, und in Kombination mit rtM204I bei Patient 12 mit protrahiertem HBV-DNA-Abfall und höchster Virämie zu Monat 12 von den LAM-resistenten Patienten, jedoch steter weiterer Abnahme der HBV-DNA unter fortgesetzter TDF-Monotherapie >12 Monate, so dass ein langfristig negativer Einfluss dieser Variantenkombination in diesen Fällen als nicht wahrscheinlich zu werten ist.

Nur bei einem Patienten (Patient 17) ohne vorliegende LAM-Resistenzvarianten zur BL treten diese im Verlauf neu auf mit hoher Prävalenzrate >99% (rtL180M+rtM204V) in Kombination mit einer ETV-Resistenzvariante (rtS202G mit 98,0%). Von Wieder- oder Neuauftreten von LAM-Resistenzvarianten unter ETV-TDF-Kombinationstherapie wird ebenfalls in einem Fallreport berichtet (rtL180M+rtM204I, erstere mit hoher Prävalenz von >90%)⁶⁷. Die Persistenz von LAM-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie ist relevant in Bezug auf einen potentiell notwendigen Therapiewechsel, welcher z.B. wegen Medikamentenunverträglichkeit nötig sein könnte. Sollte ein Wechsel zu ETV geplant sein, kann der Effekt der ETV-Monotherapie durch vorliegende LAM-Resistenzvarianten negativ beeinflusst werden, welche auch nach längerer ADV- und/oder TDF-Monotherapie bestehen bleiben können^{68,69}.

In den bisherigen *in vitro* Studien zeigt sich kein relevanter Einfluss von persistierenden LAM-Resistenzvarianten auf die TDF-Erfolgsrate^{70,71}. Auch in klinischen Studien zeigt sich kein nega-

tiver Effekt von LAM-Vorbehandlung bzw. -Resistenzvarianten auf die TDF-Monotherapie^{29,49,50,52,59,61,72}. Ein Ansprechen von 100% kann bei 35 TDF-monotherapierten LAM-resistenten Patienten und vormals ADV-naiven Patienten beobachtet werden, welche innerhalb von 44 Wochen ein undetektierbares (<400 Kopien/ml) HBV-DNA-Level erreichen, im Gegensatz zu 44% der in der Studie mit ADV behandelten Patienten²⁷. Eine Folgestudie untersucht Patienten mit LAM-Resistenzvarianten und persistierender Virusreplikation >10⁴ Kopien/ml unter ADV-Therapie, welche auf TDF umgestellt werden. Innerhalb einer medianen Behandlungsdauer von 3.5 Monaten erreichen 95% (19/20) der Patienten eine Viruslast von <400 Kopien/ml ohne Nachweis einer ADV-Resistenz²⁸. Ein so rasches Absinken der HBV-DNA wird in der aktuellen Studie nicht beobachtet, jedoch zeigen die Patienten mit LAM-Resistenzvarianten eine deutlich niedrigere HBV-DN-Serumkonzentration (um eine log₁₀-Stufe niedriger) nach 12 Monaten Therapiedauer als die Patienten mit ADV-Resistenzvarianten. Alle Patienten mit LAM-Resistenzvarianten weisen einen HBV-DNA Abfall auf <400 Kopien/ml im Verlauf unter TDF-Monotherapie auf: Patient 1 bereits zu Monat 6 (122 Kopien/ml), Patient 3 und 17 zu Monat 12 (52 Kopien/ml bzw. 377 Kopien/ml) und Patient 12 in der Nachbeobachtungsphase zu Monat 15 (41 Kopien/ml). Patient 12 ist der einzige der Patienten, welcher nur isolierte LAM-Resistenzvarianten aufweist und hierunter einen protrahierten Abfall der HBV-DNA zeigt, die drei anderen Patienten weisen eine Kombination von LAM-ETV-Resistenzvarianten auf mit einem rascheren HBV-DNA-Abfall, so dass diskutiert werden kann, ob diese Kombination sich allenfalls sogar positiv auf das Ansprechen auf eine TDF-Monotherapie ausüben kann. Allerdings ist die Fallzahl zu klein um diesbezüglich eine eindeutige Aussage zu treffen.

Innerhalb einer zwölfmonatigen TDF-Monotherapie zeigt sich, dass die LAM-Resistenzvarianten deutlich weniger selektiert werden als die ADV-Resistenzvarianten. Zwar tritt auch bei den Patienten mit LAM-Resistenzvarianten in dieser Studie eine persistierende Virämie auf, jedoch liegt diese deutlich unterhalb derer der ADV-resistenten Patienten, und die Daten der Nachbeobachtungszeit >12 Monate zeigen - soweit vorliegend - eine weitergehende Regredienz der Virämie unter fortgesetzter TDF-Monotherapie. Es ergibt sich somit kein ausgeprägt nachteiliger Effekt von LAM-Resistenzvarianten auf eine TDF-Therapie, so wie dies bereits in anderweitigen Studien wie oben erwähnt gezeigt werden konnte. Ein Beobachtungszeitraum von 12 Monaten scheint jedoch in der Patientengruppe der protrahiert ansprechenden Patienten zu kurz um dies eindeutig zu belegen.

6.4 Entwicklung und Einfluss der ETV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie

Bezüglich der Patienten mit ETV-Resistenzvarianten ist ein inhomogener Verlauf in dieser Studie zu beobachten. Mit fünf detektierten Varianten verteilt auf die zwei mit ETV vorbehandelten Patienten stellen sie den kleinsten Teil der NA-Resistenzvarianten zur BL dar. Zum EP zeigt sich jedoch eine Zunahme der ETV-Resistenzvarianten auf sechs Varianten bei fünf Patienten. Von den fünf jeweils in Kombination mit L180M+M204V zur BL vorliegenden ETV-Resistenzvarianten werden die Minorvarianten nicht mehr detektiert und es kommt zu einer deutlichen Prävalenzreduktion der verbleibenden Variante rtT184A bei Patient 1 und konstanter weiterer Ausprägung von rtT184A und rtS202G bei Patient 3.

Erstaunlich ist, dass es in vier Fällen zu einer Neuausprägung von ETV-Resistenzvarianten zwischen Monat 6 und 12 kommt sowohl als Minor- oder dominanten Varianten, isoliert oder in Kombination mit anderen NA-Resistenzvarianten ohne stattgehabter ETV-Therapie. Nach bisherigem Wissen ist eine Variante der Aminosäuren rtT184, rtS202 und rtM250 nur mit einer verminderten Ansprechrate auf ETV verbunden, wenn gleichzeitig ein Austausch an der Aminosäureposition rtL180+rtM204 stattfindet, wie dies nur bei Patient 1, 3 und 17 der Fall ist. Bei isoliert auftretenden Varianten rtL180 und rtM204 ist ETV in geringerer Effektivität noch wirksam^{68,69}. In den bisher vorliegenden Studien ergibt sich kein Hinweis darauf, dass ETV-Resistenzvarianten eine verminderte Ansprechrate auf TDF bewirken. In der Studie von Reijnders et al. zeigt sich, dass bei fünf Patienten der Wechsel auf eine TDF-Mono- oder Kombinationstherapie zu einer Viruslastminderung trotz ETV-Resistenzvarianten führt⁶⁸. Kim et al. analysieren 18 Patienten mit Therapieversagen auf eine vorherige ETV-, LAM- und ADV-Therapie, hierunter zehn Patienten mit ETV-Resistenzvarianten und einer mit einer ETV-ADV-Resistenzvariante. 17 Patienten erreichen unter TDF-Mono- oder Kombinationstherapie mit LAM oder ETV eine Virusreduktion von <60 IU/ml, ein Patient erreicht dieses Ziel knapp nicht. Das Vorliegen von ETV-Resistenzvarianten scheint somit keinen Einfluss auf die TDF-Monotherapie zu haben⁶¹. Nach Corsa et al. zeigt sich kein Unterschied in der viralen Kinetik nach ETV-Vortherapie bzw. Resistenz innerhalb 96 Wochen TDF-Monotherapie⁶⁰. Auch Pan et al. zeigen bei 14 Patienten mit suboptimalem ETV-Therapieansprechen bei allen Patienten ein nicht mehr detektierbares HBV-DNA-Level nach medianer TDF-Behandlungszeit von 30 Wochen⁷³. Die als ETV-Resistenzvariante beschriebenen Varianten rtI169T, rtT184F/G/I/L und rtS202I können in der aktuellen Studie nicht nachgewiesen werden¹². Daten bezüglich der Relevanz von neuauftretenden ETV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie sind bisher nicht verfügbar.

Auffällig in dieser Studie ist, dass unter TDF-Monotherapie neue ETV-Resistenzvarianten in variablem Prävalenzspektrum neu auftreten und wie oben bereits erwähnt die Patienten mit

kombinierten LAM-ETV-Resistenzvarianten im Vergleich zu den anderen Patienten eine etwas geringere Viruslast unter TDF-Monotherapie nach 6 bis 12 Monaten aufweisen, was ggf. auf eine positiv beeinflussende Komponente auf das TDF-Ansprechen hindeuten könnte. In Anbetracht der kleinen Fallzahl lässt sich hierfür jedoch keine eindeutige Aussage treffen und diese Beobachtung müsste in einer größeren Fallzahl überprüft werden. Warum Patient 7 mit neu auftretender isolierter ETV-Minorvariante rtM250V zu Monat 12 die dritthöchste Virämie der Kohorte aufweist bleibt unklar. Eine *in vitro* Analyse dieser Konstellation erscheint notwendig, um die mögliche Selektion dieser Variante in der hier beschriebenen Situation erklären zu können. Ein Einfluss der ETV-Minorvariante (2,5%) zum EP oder der zur BL vorliegenden ADV-/LAM-Resistenzvarianten (1,7-5,6%) ist nicht anzunehmen.

6.5 Entwicklung und Einfluss der HBV-Wildtyp-Varianten unter TDF-Monotherapie

Erstaunlicherweise zeigt sich in dieser Studie, dass unter Berücksichtigung aller Patienten ohne NA-Resistenzvarianten zum EP (unter Ausschluss von Patient 15 nach Dosisreduktion) eine stark erhöhte HBV-DNA-Serumkonzentration (mediane HBV-DNA $3,05 \pm 0,96$ (2,52-4,92) \log_{10} Kopien/ml) zu Monat 12 vorliegt bei niedrigerer BL-Virämie im Vergleich zu den anderen Patienten (mediane HBV-DNA $6,98 \pm 0,91$ (6,30-8,80)) \log_{10} Kopien/ml). Zwei der WT-Patienten weisen die höchste HBV-DNA-Serumkonzentration der gesamten Patientenkohorte auf (Patienten 15, 16). Bei Patient 15 ist sicherlich die Dosisreduktion auf die Hälfte der TDF-Standarddosis zu Monat 5 als ursächlich anzunehmen. Interessant ist hierbei, dass trotz der Dosisreduktion und der hiermit erneut ansteigenden Virämie keine Selektion von Resistenzvarianten stattfindet.

Weiterhin zeigen die Wildtyp-Patienten mit zwei Ausnahmen auch keine Selektion der initial zur BL bei einigen Patienten vorhandenen potentiellen NA-Resistenzvarianten. Patient 11 weist eine persistierende BL-Variante rtN238T (96,3%) und Patient 18 die BL-Variante rtV191I/sW182s in abnehmender Prävalenz auf (von 17,2 auf 3,6%). Anderweitige HBsAg-Varianten werden bei diesen Patienten nicht selektiert. Im weiteren Nachbeobachtungsverlauf - soweit verfügbar - zeigt sich zumindest bei Patient 10, 11, 18 ein weiteres Absinken der HBV-DNA auf $<2,28 \log_{10}$ Kopien/ml (<200 Kopien/ml), welches gegen eine negativ beeinflussende Komponente der Variante rtN238T bei Patient 11 spricht.

Die Ursache für die persistierende Virämie bei den Patienten mit HBV-Wildtyp zum EP kann anhand der verwendeten Methoden und Erklärungskonzepte nicht schlüssig geklärt werden. Weder potentiell NA-Resistenzvarianten noch HBsAg-Varianten können in dieser Gruppe vermehrt beobachtet werden. Ebenfalls zeigt sich die BL-Viruslast der Patienten mit WT-Nachweis zum EP niedriger als im Vergleich zu den Patienten mit ADV-, LAM-, ETV-Resistenzvarianten.

Eine Non-Adhärenz zur TDF-Therapie bleibt letztendlich nicht ausgeschlossen, wenn sich auch diesbezüglich aktenanamnestisch keine offensichtlichen Hinweise finden lassen. Eine TDF-Spiegelbestimmung wäre diesbezüglich sinnvoll. Auch in der TDF-Zulassungsstudie wird von Patienten berichtet mit persistierender Virämie zwischen Woche 144 und 192 ohne TDF-Resistenzvarianten oder *Low-Level-Resistenzen*. Von 13 Patienten der TDF-Monotherapiegruppe weisen jedoch 12 Patienten nicht-detektierbare TDF-Plasmalevel auf als Hinweis für Non-Adhärenz, 8/13 Patienten weisen keine Varianten auf, drei natürliche Polymorphismen und zwei können nicht genotypisiert werden⁶².

6.6 Entwicklung und Einfluss der potentiellen NA-Resistenzvarianten

In der TDF-Zulassungsstudie wird die Variante **rtT128N** zur BL gehäuft beobachtet (2,7%), führt jedoch unter TDF-Monotherapie nicht zu phenotypischer Resistenz gegen TDF oder zu einer schlechteren Ansprechrate³¹. Der Polymorphismus korrespondiert mit der sP120T-Substitution im S-Gen, welche als *Vaccine Escape*-Variante vermutet wird. Auch wird diese Substitution im Kontext von partieller Wiederherstellung von *in vitro* Replikation bei LAM-Resistenz beschrieben⁷⁴. Diese Variante wird in der aktuellen Studie bei fünf Patienten zur BL beobachtet, jedoch nur bei zwei Patienten (Patienten 1, 3) mit Persistenz im weiteren Verlauf. Bei diesen Patienten tritt sie in Kombination mit LAM-ETV- bzw. mit ADV-Resistenzvarianten auf, weiterhin zeigen diese Patienten einen relativ raschen HBV-DNA Abfall, so dass eine negative Beeinflussung der TDF-Monotherapie nicht anzunehmen ist. Weitere vereinzelte Austausche (rtT128I/A) an dieser Position können beobachtet werden möglicherweise natürlichen Polymorphismen entsprechend.

Die Variante **rtV191I** wird in der Studie von Rodriguez-Frias et al. unter LAM- und ADV-Therapie mit zunehmender Häufigkeit beobachtet meist in Kombination mit einer rtA181T-Variante als mögliche kompensatorische Variante zur Wiedererlangung der „replikativen Fitness“. Unter ETV-Therapie zeigt sich ein deutlicher Rückgang dieser Variante, welches auf eine mögliche ADV-Resistenz und Sensitivität bezüglich ETV hindeutet und sie somit für die aktuelle Fragestellung interessant macht⁷⁵. Weiterhin tritt rtV191I bei einem multipel vorbehandelten (LAM, ADV, ETV) Patienten auf, welcher einen viralen Durchbruch unter TDF-Therapie zeigt⁷⁶. Die Variante rtV191I wird im aktuellen Patientengut zur BL fünfmal und im Verlauf nur einmal detektiert (Patient 18). Eine Kombination mit anderen Varianten liegt nicht vor. Weiterhin wird die Variante nicht selektiert, sondern zeigt sich gegenteilig mit abnehmender Prävalenz (von 17,2 auf 3,6%), so dass die Relevanz für eine verminderte Ansprechrate unwahrscheinlich ist zumal Patient 18 auch einen relativ raschen HBV-DNA Abfall zeigt auf 2,61 log₁₀ Kopien/ml (407 Kopien/ml) zu Monat 12.

Die Variante **rtA194T** wird in der aktuellen Kohorte einmal (Patient 4 zu Monat 3) mit schwacher Nachweisbande mit INNO-LiPa detektiert, jedoch nicht durch UDPS oder TG. Möglicherweise liegt somit ein falsch positives Ergebnis vor. Phänotypische Analysen in einer Studie mit HIV-HBV koinfizierten Patienten zeigen, dass das Auftreten von rtA194T in Kombination mit rtL180M+rtM204V, welches bei 2 von 21 untersuchten Patienten neu auftritt, ein 10-faches Absinken der IC50 für TDF ergibt im Vergleich zum Wildtyp⁴⁰. Eine *in vitro* Studie zeigt keine TDF-Resistenz der Variante rtA194T unabhängig vom Auftreten als Einzel- oder LAM-Kombinationsvariante⁵⁶. In der TDF-Zulassungsstudie kann diese Variante nicht nachgewiesen werden⁴⁹.

Die Variante **rtS219A** liegt in der für ADV-Resistenz terminierenden wichtigen Aminosäuren-Region rt215-226^{77,78}. In einer Studie von Rodriguez et al. wird bemerkt, dass die Variante rtS219A bei zwei Patienten mit nur partiellem Ansprechen auf ADV auftritt und somit für die aktuelle Fragestellung von Interesse ist⁴¹. Sie wird in der aktuellen Kohorte bei vier Patienten detektiert. Hiervon bei zwei Patienten (Patienten 5, 9) durchgehend bis Monat 12 und bei Patient 6 zu Monat 3 und 6. In einem anderen Fallreport wird ein virologischer Durchbruch unter ETV-Therapie mit dem klonalem Nachweis von rtL80LV, rtL91I, rtM204I, rtS219A, rtN238D und rtY245H im phenotypischen Assay *in vitro* mit 30,4-facher Resistenz zu ETV beschrieben. Es wird vermutet, dass die Varianten rtS219A und rtY245H hauptsächlich zur ETV-Resistenz geführt haben könnten⁷⁹. Bei Patient 5 mit rt219A Nachweis tritt zwischenzeitlich ebenfalls eine rtN283D Variante in niedriger Prävalenz auf, jedoch keine rtY245H Variante (Daten nicht aufgeführt). Allerdings wurde keiner der Patienten der aktuellen Kohorte mit Nachweis der Variante rtS219A mit ETV vorbehandelt. Bezüglich der Wirkung auf TDF ist bisher nichts bekannt. Die Patienten 5 und 9 mit Persistenz der rtS219A Variante neben anderen ADV-Resistenzvarianten zeigen eine erhöhte HBV-DNA-Serumkonzentration zu Monat 12, somit könnte eine negative Mitbeeinflussung auf eine TDF-Monotherapie möglich sein.

Aminosäureaustausche an der Position **rtN238** (rtN238A/D/H/E/T) werden als potentielle ADV-Resistenzvarianten bzw. Genotypen-abhängiger Polymorphismus *in vivo* als auch *in vitro* diskutiert^{75,80-82}. Bezüglich der Beeinflussung einer TDF-Monotherapie liegen bisher wenig Daten vor. Ein Patient mit Genotyp D in der Studie von Tan et al. zeigt eine Variante rtN238H in Kombination mit einer rtI233V Variante ohne weitere bekannte LAM- oder ADV-Resistenzvarianten und weist eine rasch nicht detektierbare HBV-DNA-Serumkonzentration zu Monat 6 der TDF-Monotherapie auf⁵⁴. Ebenso zeigen in der Studie von Kim et al. zwei Patienten mit der Variante rtN238H und rtN238A kein vermindertes Ansprechen auf TDF⁶¹. In der aktuellen Kohorte können ebenfalls rtN238-Varianten bei fünf Patienten zur BL beobachtet werden. Eine Persistenz der rtN238H Variante besteht bei drei Patienten (Patienten 2, 3, 17), wobei es sich bei Patient 2

um den B-genotypischen Wildtyp handelt. Bei den Patienten 3 und 17 tritt die Variante zusätzlich zu LAM-ETV-Resistenzvarianten auf, Patient 11 weist außer dieser Variante keine weiteren Varianten auf. Die HBV-DNA-Serumkonzentration bei diesen drei Patienten liegt zu Monat 12 $<2,58 \log_{10}$ Kopien/ml (<400 Kopien/ml). Rückschlüsse über die Bedeutung der Variante in Hinsicht auf eine Resistenzbeeinflussung oder natürlichen Polymorphismus sind in dieser kleinen Gruppe mit inkonsistentem Auftreten nicht möglich.

6.7 Entwicklung und Einfluss der HBsAg-Varianten

Durch die Überlagerung vom POL- und S-Gen können Varianten im überlappenden ORF zu Veränderungen in beiden Proteinen führen¹². Dies muss jedoch nicht immer deckungsgleich sein, wie sowohl in der aktuellen als auch in der Studie von Salmone et al. beobachtet wird. Die Varianten können synonym in einem ORF vorliegen und nonsynonym im überlappenden ORF³⁸. So wird beispielhaft bei Patient 8 die Variante sW178s (1,03%) detektiert ohne korrespondierende Variante rtV191I, ebenso bleibt bei Patient 5 die Variante sW187s (1,48%) ohne korrespondierenden rtA181T-Nachweis. Weiterhin zeigen sich Unterschiede in der Prävalenz-Ausprägung von korrespondierenden Varianten.

Die Variante **rtA181T/sW172s**, welche zu einem Stoppcodon im überlappenden HBsAg führen kann, wird zur BL viermal mit maximaler Prävalenz von 6,63% und im Verlauf dreimal mit maximaler Prävalenz von 25,98% detektiert. Durch das hieraus resultierende verkürzte Oberflächenprotein kann die Formation von normalen Virionen beeinträchtigt werden. Diese Variante wird für gewöhnlich in einer HBV-Population gefunden, welche mit HBV-Wildtyp durchmischt ist, wie dies auch in der jetzigen Studie zu beobachten ist. Es resultiert ein sekretorisches Defizit für virale Partikel sowie ein dominant negativer Effekt auf die Sekretion von Wildtyp-Virionen, was zu einer intrazellulären Retention von *Surface*-Protein führt. Die Selektion der Variante rtA181T/sW172s reduziert somit das typische Ausmaß des virologischen Durchbruchs, wie es eigentlich zu erwarten wäre beim Auftreten einer Resistenzvariante. Dies kann irreführend bezüglich der Diagnose einer Resistenz sein, wenn die Viruslast als einziges Kriterium für ein Medikamentenversagen benutzt wird¹⁴. In der Studie von Rodriguez-Frias et al. zeigt sich ebenfalls eine Selektion der Stoppcodon-Varianten, v.a. von sW172s unter LAM- und ADV-Behandlung⁷⁵. Die meisten Varianten sW172s liegen in der jetzigen Studie mit einer Prävalenz von $<10\%$ vor (Ausnahme Patient 4 mit 25,98%). Dieser Sachverhalt könnte die oben genannte Beobachtung von Warner et al. unterstützten in der Weise, dass die sekretionsdefizitäre Virenpopulation in Kombination mit einer HBsAg intakten Viruspopulation auftritt um die sW172s-Sekretion zu erhalten. Der geringe Prävalenzanteil könnte bei diesen Patienten zudem auch erklären, warum trotzdem eine hohe BL- und Verlaufs-Viruslast vorliegen. Ein Einfluss dieser Variante bei den

Patienten 1 und 5, bei denen sie nur als Minorvariante (<2%) vorliegt, ist wahrscheinlich gänzlich ohne Relevanz. Der Einfluss auf das Ansprechen auf eine TDF-Monotherapie bleibt wegen bislang geringer Datenlage unklar. Bei im Verlauf fehlender weiterer Selektion erscheint eine negative Beeinflussung in dieser Kohorte nicht wahrscheinlich. In der Studie von Liu et al. kann kein Einfluss der Varianten rtA181T/sW172s und rtA181T/sW172L im Vergleich zum Wildtyp auf die Ansprechrate einer TDF-Monotherapie gefunden werden. Was sich jedoch bestätigt ist, dass eine geringere intrazelluläre Viruslast beim Vorliegen der Varianten beobachtet werden kann im Vergleich zum Wildtyp⁸³.

Ebenfalls führt die Variante **rtV191I/sW182s** als Stoppcodon zu einem verkürzten Oberflächenprotein. Diese Variante tritt zur BL sechsmal (Prävalenz 1,03-18,75%) und im Verlauf nur noch einmal bei Patient 18 (3,7%) auf. Die Studie von Lee et al. zeigt, dass die Prävalenz dieser Variante bei an hepatozellulärem Karzinom und Leberzirrhose erkrankten Patienten, sowie bei älteren Patienten signifikant höher liegt und die HBV-DNA signifikant niedriger ist verglichen mit dem Wildtyp. *In vitro* wird nachgewiesen, dass durch diese Variante das Zellwachstum stimuliert wird und dies zu einer progredienten Lebererkrankung führen kann⁸⁴. Die Variante ist in der jetzigen Studie die initial am häufigsten vertretene der HBsAg-Varianten, wird jedoch nicht weiter selektiert, was auf eine suffiziente Suppression dieser Variante durch die TDF-Monotherapie hindeutet.

Varianten im HBsAg der Region Aminosäuren 95 bis 165 beeinflussen die Antikörperbindung zum Antigen. So beobachtete Torresi et al., dass die LAM-Resistenzvarianten **rtV173L/sE164D+rtM204V/sI195M**, sowie **rt204I/sW196S** und **sM198I** zu einer verminderten Bindung von anti-HBs-Antikörpern führen. Eine noch höhere Bindungsreduktion kann durch die Varianten **rtR153Q/sG145R** und **sD144E/sG145R** erreicht werden im Vergleich zum Wildtyp⁸⁵. Bestätigt werden können diese Ergebnisse durch die Studie von Sloan et al. in der die Varianten rtV173L/sE164D und/oder rtSilent/sD144E je in Kombination mit rtM204V/sI195M zu einer Reduktion der Antikörper-Reaktivität führen. Die Varianten rtM204V/sI195M+rtV173L/sE164D zeigen ein ähnliches Epitop-Antikörper-Profil wie die rtR153Q/sG145R *Vaccine Escape*-Mutante⁸⁶. Diese Varianten können in der jetzigen Studie ebenfalls nachgewiesen werden. Die Variante sE164D kann bei drei Patienten (Patienten 1, 9, 12) zur BL und zweimal im Verlauf (Patienten 1, 12) mit meist höherer Prävalenz von >20% nachgewiesen werden. In Kombination mit der v.a. im höheren Prävalenzbereich >50% auftretenden Variante sI195M liegt sie bei zwei Patienten vor (Patienten 1, 9). Die Variante sI195M kann insgesamt viermal zur BL (Patienten 1, 2, 3, 9) und im Verlauf dreimal (Patienten 1, 3, 17) nachgewiesen werden. Die Variante sG145R liegt nur einmal bei Patient 5 zu Monat 3 vor (3,71%). Ein Einfluss auf die Antikörper-

Bindfähigkeit ist zumindest bei den Varianten anzunehmen, die im höheren Prävalenzbereich in der jetzigen Studie auftreten.

In einem Fallbericht von einem multipel vorbehandelten Patienten wird berichtet, dass unter der Kombinationstherapie von ETV und TDF vermehrt Varianten des HBsAg und der POL auftreten⁶⁷. Konträr hierzu zeigt sich in der jetzigen Studie im Verlauf der TDF-Monotherapie eine deutliche Abnahme der HBsAg- und POL-Varianten. Von initial 29 zur BL vorliegenden HBsAg-Varianten, hiervon 17 Stoppcodon-Varianten, sind im Verlauf nur neun HBsAg-Varianten, darunter drei Stoppcodon-Varianten, weiter nachweisbar. Es erfolgt also eine starke Abnahme der HBsAg-Varianten und insbesondere der Stoppcodon-Varianten unter der TDF-Monotherapie, welche anscheinend durch die vorangegangenen Therapien selektiert wurden. Eine suffiziente Suppression dieser Varianten durch TDF ist somit anzunehmen und hieraus folgend eine abnehmende Auswirkung dieser Varianten auf die Virionbildung und Sekretion von viralen Partikeln. Hingegen findet eine leichte Selektion statt von HBsAg-Varianten, welche für die Antigen-Antikörper Bindung von Bedeutung sind (insbesondere der Variante sI195M und sE164D), was einen persistierenden Einfluss auf dieses Bindungsverhältnis haben könnte.

6.8 Einfluss von multiplen Vortherapien unter TDF-Monotherapie

Zwei von den drei Patienten, welche bereits im Vorfeld eine intermittierende Behandlung mit TDF erfahren hatten (Patienten 3, 15, 16), weisen interessanter Weise keine Resistenzvarianten auf (Patienten 15, 16), auch nicht nach erfolgter Dosisreduktion (Patient 15). Multiple Vortherapien bzw. eine höhere Vortherapiedauer werden als Marker für ein verlängertes Therapieansprechen diskutiert. So beobachtet Patterson et al. ein verzögertes Therapieansprechen in dem von ihm untersuchten Patientengut mit sehr langer LAM- und ADV-Vortherapiedauer (3 Jahre bzw. 1,75 Jahren)³³. Bei van Bömmel et al. liegt die Vor-Behandlungsdauer bei 35 bzw. 22 Monaten bei ebenfalls vermindertem Ansprechen auf eine TDF-Monotherapie²⁹. In der jetzigen Studie liegt die mediane Vortherapiedauer etwas niedriger mit LAM 20±22 (8 bis 98) Monaten bzw. ADV 15±11 (3 bis 43) Monaten, dennoch zeigen die Patienten nur ein partielles Therapie-Ansprechen.

6.9 Entwicklung und Einfluss der HBV-DNA-Serumkonzentration

Dass die initiale Viruslast zu Therapiebeginn einen Einfluss auf das Erreichen einer supprimierten Viruslast haben kann, wird ebenfalls in einigen Studien diskutiert. In der TDF-Zulassungsstudie benötigen Patienten, welche eine hohe HBV-DNA-Serumkonzentration von

$\geq 9 \log_{10}$ Kopien/ml zur BL aufweisen, eine längere Zeitdauer um eine HBV-DNA-Serumkonzentration < 400 Kopien/ml zu erzielen als Patienten mit niedrigerer BL-Viruslast. Zu Woche 96 ist der Prozentsatz der Patienten mit HBV-DNA-Serumkonzentration < 400 Kopien/ml jedoch gleich und zu Woche 240 liegt bei keinem Patienten eine persistierende Viruslast vor⁸⁷. Bei Patterson et al. zeigt sich eine persistierende virale Replikation von > 15 IU/ml zu allen Zeitpunkten bis Woche 96 assoziiert mit einer medianen BL HBV-DNA von $> 5,33 \log_{10}$ IU/ml liegender HBV-DNA-Serumkonzentration³³. Auch in einer Studie von van Bömmel et al. korreliert eine HBV-DNA von $< 10^7$ Kopien/ml zur BL mit einer höheren Wahrscheinlichkeit nach 12 Monaten TDF-Monotherapie eine HBV-DNA-Serumkonzentration von < 35 Kopien/ml zu erreichen als Patienten mit einer HBV-DNA-Serumkonzentration $> 10^7$ Kopien/ml⁵¹. Eine Korrelation eines raschen Absinkens der HBV-DNA-Serumkonzentration auf < 69 IU/ml innerhalb 24 Wochen TDF-Monotherapie bzw. TDF/EMC-Kombinationstherapie in Abhängigkeit der BL-Virämie ist in der Studie von Lavocat et al. ersichtlich. 53% (9/17) der Patienten erreichen eine HBV-DNA < 69 zu Woche 24 vs. 47% (8/17) erst zu einem späteren Zeitpunkt. Die HBV-DNA-Serumkonzentration zur BL ist in der langsameren Gruppe signifikant höher als in der schnelleren Gruppe (Mittelwert 6,50 vs. 4,95 IU/ml(\log_{10}))⁸⁸. Auch in der Studie von Corsa et al. ist bei Patienten mit Virämie zu Woche 96 die BL-Viruslast signifikant höher als bei Patienten mit zu Woche 96 supprimierter Viruslast (Mittelwert 7,28 vs. 5,62 \log_{10} IU/ml)⁶⁰.

In der jetzigen Studie liegt durchweg ein Patientengut mit hoher HBV-DNA-Serumkonzentration zur BL vor (mediane HBV-DNA $7,8 \pm 0,7$ (6,3 bis 8,8) \log_{10} Kopien/ml) und nur partiellem Therapieansprechen. Eine protrahierte Virämieabnahme zu Woche 24 der TDF-Monotherapie lässt sich in unserer Kohorte als Schlussfolgerung aus den oben genannten Studien und analog zu den Einschlusskriterien somit erwarten. Jedoch fällt weiter auf, dass bei den Patienten mit ADV-Resistenzvarianten zum EP die im Durchschnitt höchste persistierende Viruslast der Kohorte vorliegt (mediane HBV-DNA zu Monat 12 $3,57 \pm 0,72$ (2,14-3,96) \log_{10} Kopien/ml) als im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten (mediane HBV-DNA $2,57 \pm 0,99$ (1,72-4,10) \log_{10} Kopien/ml) und Patienten mit WT-Nachweis (mediane HBV-DNA $3,05 \pm 0,96$ (2,52-4,92) \log_{10} Kopien/ml) zum EP (jedoch ohne signifikante Unterschiede).

Auffällig hierbei ist, dass die BL-Virämie bei den Patienten mit ADV- im Vergleich zur der Gruppe der Patienten mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten zum EP ungefähr gleich hoch ist (mediane HBV-DNA zur BL $7,9 \pm 0,56$ (6,46-8,00) vs. $7,96 \pm 0,8$ (6,46-8,21) \log_{10} Kopien/ml) bzw. sogar etwas niedriger bei den Patienten mit WT-Nachweis (mediane HBV-DNA zur BL $6,98 \pm 0,91$ (6,3-8,8) \log_{10} Kopien/ml). Die Unterschiede der BL-Virämie sind ohne Signifikanz. Klare Hinweise auf Medikamenten-Non-Adhärenz ergeben sich bei diesen Patienten nicht, sind

jedoch leider bei fehlender TDF-Spiegelbestimmung nicht gänzlich ausgeschlossen. Somit bleibt der Grund für die persistierende Virämie in letztgenannter Gruppe unklar.

Trotz einer initial gleich hohen bzw. nur etwas erhöht liegenden HBV-DNA-Viruslast der Patienten mit ADV-Resistenzvarianten im Vergleich zu den Patienten ohne ADV-Resistenzvarianten, zeigt sich eine protrahierte und verminderte Viruslast-Abnahme der ADV-resistenten Patienten im Vergleich zu den Patienten ohne ADV-Resistenzvarianten. Dies deutet auf einen negativen Einfluss der ADV-Resistenzvarianten auf die Abnahmedynamik der Virämie und somit auf das TDF-Therapieansprechen hin.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch van Bömmel et al. mit Korrelation einer erhöhten Virämie zur BL (HBV-DNA Mittelwert 7,6 log₁₀ Kopien/ml) und dem Vorliegen von ADV-Resistenz mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit eine HBV-DNA-Viruslast von <400 Kopien/ml nach einer mittleren Behandlungsdauer von 23 Monaten (*Range* 6-60) zu erreichen²⁹.

Es ist davon auszugehen, dass die Höhe der HBV-DNA-Serumkonzentration zu Behandlungsbeginn einen relevanten Einfluss auf die virale Abnahmedynamik, den Zeitraum und das Erreichen einer supprimierten Viruslast hat. Dennoch zeigt sich in der jetzigen Studie, dass auch das Vorliegen von ADV-Resistenzvarianten einen negativen Einfluss auf die Abnahmedynamik der HBV-DNA-Serumkonzentration und damit auf das Therapieansprechen der TDF-Monotherapie in dieser Kohorte hat.

6.10 Entwicklung und Einfluss von HBV-Quasispezies unter TDF-Monotherapie

Durch die hohe Mutationsrate von >10⁻⁵ Nukleotid-Substitutionen/Position/Jahr setzt sich die HBV-Gesamtpopulation eines Infizierten zu jedem Zeitpunkt aus einer Quasispezies zusammen, die aus allen replikationsfähigen HBV-Varianten besteht^{6,7}. Die Quantifizierung und Beobachtung der Dynamik der Quasispezies unter einer Therapie ist in Bezug auf eine Resistenzprägung interessant. UDPS mittels GS FLX Sequenzieretechnik ermöglicht die Detektion, Identifikation und Quantifizierung von dominanten, intermediären und Minorvarianten einer Gesamtvirenpopulation⁸⁹⁻⁹². Dies kann auch in der vorliegenden Studie erfolgreich gezeigt werden.

Es zeigt sich, dass es im Verlauf der TDF-Monotherapie zu einer Homogenisierung der Quasispezies kommt mit Abnahme der Prävalenz-Streubreite zugunsten der Selektion von dominanten Varianten mit Prävalenz >20% an der patientenspezifischen HBV-Population. Der Anteil der dominanten NA-Resistenzvarianten an allen NA-Resistenzvarianten steigt von 51% zur BL auf 80% zum EP an. Die Minorvarianten und intermediären NA-Resistenzvarianten mit Prävalenz 1-20% werden hingegen zumeist nicht weiter selektiert. Der Anteil der Minorvarianten

nimmt von 33% zur BL auf 12% zum EP und der intermediären NA-Resistenzvarianten von 16% auf 8% ab. Dies lässt sich sowohl bei den ADV-, LAM-, ETV- als auch bei den potentiellen NA-Resistenzvarianten und HBs-Ag-Varianten beobachten.

Eine Abnahme der Quasispezies-Diversität kann auch in einer Studie von Lavocat et al. beobachtet werden. Hier erreichen zu Woche 24 48% (9/17) der Patienten mit vormals inkompletem Ansprechen auf ADV ein HBV-DNA-Level von <69 IU/ml ohne Differenz zwischen TDF- und TDF/EMC-Behandlung. ADV- und/oder LAM-Resistenzvarianten werden in allen 17 Patienten zur BL detektiert und bei 5/6 analysierbaren Patienten zu Woche 48. Die klonale Analyse von insgesamt 1224 Klonen zeigt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Quasispezies-Komplexität oder dem Diversitätsverhalten zur BL in beiden Therapiegruppen. Ein Trend zu vermehrter Quasispezies-Komplexität zu Woche 12, ebenso wie ein Abfall der Komplexität und Diversität zu Woche 48 kann in beiden Therapiegruppen beobachtet werden, jedoch ohne Signifikanz im Vergleich zur BL. Ein ähnlicher Verlauf ohne signifikanten Unterschied ergibt sich auch bei den Patienten mit HBV-DNA >68 IU/ml zu Woche 48⁸⁸.

Anhand der Prävalenz der vorkommenden Varianten können Rückschlüsse auf die Wahrscheinlichkeit der Selektion und klinischen Relevanz unter einer antiviralen Therapie vorgenommen werden. Eine Quantifizierung der HBV-Varianten könnte hierfür im klinischen Alltag hilfreich sein, welche sich bei einer größeren Stichprobe einfacher mit UDPS als mit klonaler Sequenzierung durchführen ließe. Hierzu wäre allerdings eine Studie mit größerer Fallzahl notwendig um einen validen *Cut-Off-Wert* zu ermitteln, ab welchem Prävalenzvorkommen einer Variante von anzunehmender phenotypischer Resistenz und somit klinischer Relevanz auszugehen ist.

6.11 Vergleich der Sequenziermethoden

Am meisten NA-Resistenzvarianten werden durch UDPS detektiert. Von diesen 74 per UDPS detektierten NA-Resistenzvarianten mit Prävalenz zwischen 1,0-99,6% können 74% (55 Varianten) ebenfalls durch INNO-LiPa detektiert werden und nur 58% (43 Varianten) ebenfalls durch TG.

Dieses Ergebnis entspricht den bisherigen Studienergebnissen, in denen UDPS ein potentes und schnelles Medium zur Detektion von Quasispezies mit geringem Prävalenzanteil-Vorkommen der Gesamtviruspopulation ab 0,1% bei chronischer HBV-Infektion darstellt³⁶⁻³⁹. Auch können mit dieser Methode bislang unbekannte Varianten identifiziert werden im Gegensatz zum *Line Probe Assay*, mit dem nur bereits bekannte Varianten detektiert werden können.

Weiterhin ist mit UDPS eine Quantifizierung der HBV-DNA Varianten möglich, was beim *Line Probe Assay* und der direkten Sequenzierung bisher nicht möglich ist^{12,34,35}.

Vor allem im Bereich der Minor- und intermediären Varianten (Prävalenz 1 bis 20% an der patientenspezifischen HBV-Population) der per UDPS detektierten NA-Resistenzvarianten ist INNO-LiPa der direkten Sequenzierung deutlich überlegen. Im Minor- bzw. intermediärem Variantenbereich werden 35% (6/17 Varianten) bzw. 67% (6/9 Varianten) der UDPS detektierten NA-Resistenzvarianten ebenfalls durch INNO-LiPa detektiert gegenüber von nur 6% (1/17) bzw. 22% (2/9 Varianten) durch TG. Im Bereich der dominanten NA-Resistenzvarianten mit Prävalenz >20% der HBV-Population ist der Unterschied nicht so stark ausgeprägt. Hier werden 90% (43/48 Varianten) der NA-Resistenzvarianten ebenfalls mit INNO-LiPa detektiert gegenüber 83% (40/48 Varianten) mit TG.

Bei Solmone et al. ist die Sensitivität der direkten Sequenzierung ebenfalls derer des *Line Probe Assays* unterlegen in Bezug auf die per UDPS detektierten HBV-Varianten. So ist es nicht möglich Resistenzvarianten, welche bei UDPS <24% Prävalenzanteil liegen mittels direkter Sequenzierung zu detektieren. Durch INNO-LiPa werden von diesen Varianten neun ebenfalls nicht detektiert, welche in einem Prävalenzbereich von 2-8% liegen³⁸. In der jetzigen Studie können gegensätzlich hierzu einige NA-Resistenzvarianten mit Prävalenz <20% auch mit TG nachgewiesen werden, auch wenn die Detektionsquote für INNO-LiPa im gleichen Prävalenzbereich deutlich höher liegt. Auch Margeridon-Thermet et al. können in ihrer Studie mit 17 therapienaiven und elf vorhertherapierten chronisch HBV- und z.T. HIV-koinfizierten Patienten mittels UDPS mehrere Varianten zeigen, die nicht per direkter Sequenzierung detektiert werden können. So werden bei den therapienaiven Patienten drei zusätzliche Resistenzvariante (Prävalenzbereich 1 bis 1,3%) und bei den vorbehandelten Patienten 18 zusätzliche Resistenzvarianten durch UDPS detektiert (Prävalenzbereich 1,4% bis 13,0%), welche nicht durch direkte Sequenzierung detektiert werden³⁹. In einer weiteren Studie von Margeridon-Thermet et al. zeigt sich UDPS auch der Sanger Sequenzierung überlegen, so können durch Sanger Sequenzierung acht LAM-Resistenzvarianten und durch UDPS 26 LAM Varianten detektiert werden. Die Varianten, welche sowohl durch Sanger Sequenzierung als auch durch UDPS detektierten werden, liegen in einem Prävalenzbereich von 15,8 bis 99,8%⁹³.

Bezüglich des Detektionspotentials von INNO-LiPa wird nach bisherigen Studienlage angenommen, dass Nukleotidaustausche ab ca. 5% Prävalenz an der HBV-Population erkannt werden^{34,35}. Auch in der jetzigen Studie ist ein deutlicher Sprung in der Detektionsrate zwischen einer Prävalenz von <5% bzw. >5% für INNO-LiPa auffällig. Bei dieser Testmethode ist nachteilig, dass nur vorbekannte Varianten detektiert werden können. Der Vorteil ist, dass bereits geringere Quasispezies erkannt werden können als mittels direkter Sequenzierung. Auch zeigt

sich diese Methode erfolgreicher einsetzbar bei geringer HBV-Serumkonzentration im Vergleich zu TG und z.T. UDPS. Nur in einem Fall besteht bei tiefer Viruslast von 52 Kopien/ml für alle drei Testsysteme keine Amplifizierbarkeit (Patient 3 zu Monat 12).

In der Literatur wird für die direkte Sequenzierung ein Anteil der Quasispezies $\geq 20\%$ der Gesamtpopulation als erforderlich für einen positiven Nachweis angesehen^{34,35}. Dies bestätigt sich auch in der jetzigen Studie, in der die Detektionsrate ab einer Prävalenz $>20\%$ an der patientenspezifischen HBV-Population für TG deutlich zunimmt.

In der Studie von Mese et al. können alle Varianten, welche mittels *Line Probe Assay* detektiert werden, ebenfalls von UDPS detektiert werden⁹⁴. Die mittlere Prävalenz der NA-Resistenzvarianten, welche sowohl durch INNO-LiPa als auch durch UDPS detektiert werden liegt bei 71,8% und etwas niedriger im Vergleich in der jetzigen Studie bei 60,0% für INNO-LiPa und 70,1% für TG ohne statistisch signifikanten Unterschied. Bei Mese et al. werden zehn Varianten nicht durch INNO-LiPa detektiert, aber durch UDPS mit einer Mittelwert-Prävalenz dieser Varianten von 14,7%, in der jetzigen Studie liegt dies im vergleichbaren Rahmen bei 16,6% für INNO-LiPa und deutlich darunter bei 9,3% für TG ohne statistisch signifikanten Unterschied. Das Prävalenzspektrum der durch INNO-LiPa ebenfalls detektierten Varianten liegt bei Mese et al. zwischen 12,1 bis 100% und etwas breiter in der jetzigen Studie (1,6 bis 99,6% für INNO-LiPa bzw. 4,0 bis 99,5% für TG). In der genannten Studie zeigen sich keine Varianten, welche nur durch INNO-LiPa aber nicht durch UDPS detektiert werden. Dies ist in der aktuellen Studie anders, hier fallen zehn Resistenzvarianten auf mit alleiniger Detektion durch INNO-LiPa. Jedoch weisen diese bis auf eine Ausnahme einen sehr schwachen Bandennachweis auf, treten isoliert einmalig ohne vorherig oder nachfolgend positive *Follow-Up* Proben auf und unabhängig von der HBV-DNA-Viruslast, so dass zu diskutieren bleibt, ob es sich hierbei um Artefakte oder technische Fehlmessungen handelt.

Es bestätigt sich hiermit die Ergebnisse der bisherigen Studien, dass UDPS ein sehr sensitives Werkzeug darstellt zur Detektion und Quantifizierung von Varianten mit breitem Prävalenzspektrum und den beiden anderen Sequenziermethoden hierin überlegen ist. INNO-LiPa zeigt sich im Vergleich zu TG in der Detektion von Minor- und intermediären Varianten überlegen, jedoch unter Auftreten von vermutlich einigen falsch positiven Ergebnisse unter Berücksichtigung von UDPS als Goldstandard. Für die Detektion von dominanten Varianten zeigen INNO-LiPa und TG eine vergleichbare Detektionsquote.

Limitierung, Vorteil und Praktikabilität der Sequenziermethoden

Die Qualität und Fehlerrate von UDPS per FLX GS Sequenziermethode ist abhängig von der Anzahl der generierten DNA-Moleküle, der Fehleranzahl, welche bei der PCR-Amplifikation und

Pyrosequenzierung auftreten können, sowie der Fragmentlänge und *Read*-Anzahl pro Nukleotid³⁷. Eine weitere Limitierung ist assoziiert mit dem Vorkommen von Homopolymeren z.B. AAA oder GGG. Bei Homopolymeren können mehrere Nukleotide in einem einzigen Zyklus eingebaut werden, während andere Sequenzen weniger Nukleotide einbauen. Diese sequenzspezifischen Effekte können einen signifikanten Einfluss auf die Leselänge haben durch eine erhöhte Fehlerrate aufgrund erschwelter Längenabschätzung durch Alterationen der Signalintensität. Die Längenabschätzung gestaltet sich schwieriger als die Unterscheidung zwischen Inkorporation oder Nicht-Inkorporation eines Nukleotids, so dass häufiger Insertion-Deletionsfehler als Substitutionsfehler vorkommen. Den Vorteil den die GS FLX Sequenzierplattform bietet ist die relativ hohe generierte *Read*-Zahl ~400,000 pro Lauf und lange Leselänge von ca. 200-300 bp im Vergleich zu anderen Plattformen (z.B. SOLiD oder Solexa)^{45,95}. Bezüglich der *Read*-Anzahl und Leselänge hat es in den letzten Jahren erhebliche Fortschritte der GS FLX Sequenzier-technik gegeben. In den Studien von Solmone et al. und Margeridon-Thermet et al. mit der GS FLX Amplikon Plattform kann eine mittlere Länge von 189 bp bzw. eine mediane Länge von 229 bp, in der Studie von Mese et al. eine mittlere Länge von 457 bp und in der jetzigen Studie eine mittlere Länge von 263 bp (Gruppe I, GS FLX Amplikon) bzw. 400 bp (Gruppe II, GS FLX Titanium) erzielt werden.

Der Vorteil von UDPS mit der GS FLX Sequenzier-technik ist ein hoher Datendurchsatz durch Massen-Parallelsequenzierung zusammengeführter MID-markierter Proben einer anzahlstarken Stichprobe und somit die Analyse von vielen unbekanntem DNA-Varianten in einem zeitlich überschaubaren Rahmen (ca. 2 Tage). Allerdings ist die Vorbereitung und Durchführung der UDPS sehr kostenintensiv und bedarf eines speziell geschulten Fachpersonals, da die einzelnen laboranalytischen Reaktionsschritte einer gewissen technischen Fähigkeit und räumlicher Auflagen bedürfen. Ebenfalls ist die Gerätebedienung, Instandhaltung und Analyse der Daten aufwendig und Bedarf Fachpersonals (z.B. Bioinformatiker zur Auswertung der enormen Datenmenge). Für kleinere Stichproben lässt sich die Verhältnismäßigkeit des doch zeitlich und finanziell nicht unerheblichen Aufwands kritisch diskutieren.

INNO-LiPa und TG sind vom zeitlichen Aufwand her (0,5-1 Tag) deutlich überschaubarere Sequenziermethoden und in jedem Labor mit einfachen Mitteln nach kurzer Einführung durchführbar. Die Datenanalyse ist ebenfalls leicht eigenständig durchführbar. Die beiden letzteren Methoden eignen sich insbesondere für kleinere Stichproben.

Für den klinischen Alltag, wenn es um eine schnelle Analyse von wenigen Proben geht, sind das *Line Probe Assay* mit INNO-LiPa und die direkte Sequenzierung mit TG einfacher und praktikabler als UDPS per GS FLX Sequenziersystem. Nachteilig ist sicher hieran, dass mit INNO-LiPa nur bekannte Varianten detektiert werden können und mit beiden Systemen keine Quanti-

fizierung der Varianten möglich ist. Umso niedriger die Prävalenz der Varianten an der Quasispezies ist, umso unzuverlässiger wird die Detektion dieser Varianten mit INNO-LiPa bzw. TG. Minorvarianten, welche im Verlauf einen Einfluss auf das Therapieansprechen haben könnten, werden ggf. verpasst, was sich nachteilig auf eine optimale Therapieanpassung auswirken könnte.

7 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Untersuchung der Dynamik von Resistenzvarianten des Hepatitis-B-Virus unter Drittlinientherapie mit Tenofovir mittels Tiefenpyrosequenzierung bei Patienten mit chronischer Hepatitis-B-Virusinfektion mit Schwerpunkt auf den Adefovir-Resistenzvarianten und Verlauf der HBV-Quasispezies

Eingereicht von: Friederike Bock

Angefertigt am:

- Universitätsklinikum Leipzig AöR, Department für Innere Medizin, Neurologie und Dermatologie, Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Sektion Hepatologie und an der
- Charité- Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie (einschließlich Arbeitsbereich Stoffwechselerkrankungen)

Betreuer: Prof. Dr. med. Thomas Berg und Dr. med. Florian van Bömmel

August 2016

In dieser Studie mit hochselektiertem und stark vorbehandeltem Patientengut ergeben sich Hinweise darauf, dass primäre ADV-Resistenzvarianten länger als andere NA-Resistenzvarianten unter einer Behandlung mit TDF persistieren. So wird eine leichte quantitative *Shift* zugunsten der ADV-Resistenzvarianten mit konstant bleibendem Anteil von 35-36% an allen NA-Resistenzvarianten (BL 35% (13/37) vs. EP 36% (9/25)) beobachtet. Die ADV-Resistenzvarianten rtA181V und rtN236T werden somit offenbar unter TDF-Monotherapie weiter selektiert, im Gegensatz jedoch zur Minorvariante rtA181T.

Interessanterweise lassen sich bei einigen Patienten jedoch auch nach Langzeitbehandlung mit TDF Varianten nachweisen, für die *in vitro* keine Kreuzresistenz mit TDF beschrieben wurde, z.B. gegen LAM und ETV. Ob dieser Beobachtung eine Selektion dieser Varianten zugrunde

liegt oder auf eine lange Lebensdauer der cccDNA des HBV zurückzuführen ist, kann im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und muss in folgenden Studien untersucht werden.

Die Patienten mit selektierten ADV-Resistenzvarianten weisen eine deutlich höhere HBV-DNA-Serumkonzentration zu Monat 12 auf (mediane HBV-DNA $3,57 \pm 0,72$ (2,14-3,96) \log_{10} Kopien/ml) als die Patienten der Gruppe mit LAM- und/oder ETV-Resistenzvarianten bzw. WT-Nachweis zum EP (mediane HBV-DNA $2,57 \pm 0,99$ (1,72-4,10) bzw. $3,05 \pm 0,96$ (2,52-4,92) \log_{10} Kopien/ml), jedoch ohne Unterschied von statistischer Signifikanz. Dies könnte auf eine negative Beeinflussung der TDF-Monotherapie durch die ADV-Resistenzvarianten und auf eine klinische Bedeutsamkeit der *in vitro* beschriebenen Kreuz-Resistenz zwischen ADV und TDF hindeuten. Ein Durchbruch der HBV-DNA wird jedoch in dieser Studie wie auch in anderen Studien nicht in Verbindung mit Resistenzvarianten gegen ADV beobachtet.

Die Anzahl der LAM-Resistenzvarianten halbiert sich unter TDF-Monotherapie, sie nehmen jedoch weiterhin den größten Anteil der NA-Resistenzvarianten ein (BL 51% (19/37) verteilt auf acht und zum EP 40% (10/25) verteilt auf vier Patienten). Diese Patienten weisen weiterhin eine persistierende Virämie auf, allerdings auf tieferem Niveau im Vergleich zu den Patienten mit ADV-Resistenzvarianten. Erstaunlicher Weise treten auch ETV-Resistenzvarianten neu während der TDF-Monotherapie auf, auch bei Patienten mit fehlender ETV-Exposition. Bei Patienten mit dominanten ETV-Resistenzvarianten fällt auf, dass diese im Vergleich zu den anderen Patienten eine etwas niedrigere HBV-DNA-Serumkonzentration erreichen. Eine positive Verstärkung der TDF-Wirkung durch diese Varianten wäre somit zu diskutieren.

Hinweise auf eine klare TDF-Resistenzvariante ergeben sich weder unter den bekannten, noch unter den potentiellen NA-Resistenzvarianten. Interessanter Weise zeigt sich auch bei Patienten ohne NA-Resistenzvarianten ein nur partielles Therapieansprechen mit stark erhöhter persistierender HBV-DNA-Viruslast, ohne dass hierfür erklärend vermehrt potentielle NA- oder HBsAg-Varianten zu beobachten wären. Eine Therapieadhärenz als ausschlaggebenden Faktor für eine erfolgreiche therapeutische Wirkung ist evident, konkrete Hinweise für eine medikamentöse Non-Adhärenz ergeben sich nicht. TDF-Spiegelbestimmungen wären zum sicheren Therapieadhärenz-Beweis bei diesen Patienten sinnvoll.

Bezüglich der HBsAg-Varianten fällt insbesondere eine starke Abnahme der unter der vorherigen Therapie selektierten Stoppcodon-Varianten auf. TDF scheint diese offenbar suffizient zu supprimieren und hiermit ihren Einfluss auf die Virionbildung und Sekretion von viralen Partikeln zu vermindern. Hingegen findet eine leichte Selektion der für die Antigen-Antikörper Bindung wichtigen Varianten sI195M und sE164D statt, was einen persistierenden Einfluss auf dieses Bindungsverhältnis haben könnte.

Weiterhin kommt es zu einer Homogenisierung der zirkulierenden HBV-Quasispezies über die Dauer der TDF-Monotherapie. Dominante NA-Resistenzvarianten mit per UDPS detektierter initialer Prävalenz >20% an der patientenspezifischen HBV-Population werden meist selektiert und nehmen in der Folge den größten Anteil der Quasispezies der NA-Resistenzvarianten ein (BL 51% (19/37), EP 80% (20/25)). Wohingegen von UDPS als initiale Minor- (Prävalenz <5%) und intermediäre NA-Resistenzvarianten (Prävalenz 5-20%) quantifizierte Varianten meist nicht weiter selektiert werden unabhängig davon welche (potentiellen) NA- oder HBsAg-Varianten vorliegen. Ein Neuauftreten von ADV-, LAM- und ETV-Resistenzvarianten unter TDF-Monotherapie erfolgt mit variablem Prävalenzspektrum (1,0-99,6%).

UDPS mittels GS FLX Sequenziersystem stellt ein potentes Medium für die Detektion, Identifikation und Quantifizierung von HBV-DNA-Varianten dar. Es ist dem *Line Probe Assay* per INNO-LiPa und der direkten Sequenzierung per TG überlegen, insbesondere in der Detektion von Minorvarianten der HBV-Quasispezies. INNO-LiPa zeigt sich sensitiver gegenüber TG in der Detektion von Minor- und intermediäre Resistenzvarianten, jedoch mit vermutlich einigen falsch positiven Ergebnissen. Ab einer Prävalenz von >20% an der patientenspezifischen HBV-Population gleichen sich die Detektionsraten von INNO-LiPa und TG an. Statistisch bleibt der Unterschied zwischen den nicht- bzw. ebenfalls detektierten Varianten zwischen LiPa und TG ohne Signifikanz.

Der Vorteil von UDPS liegt im hohen Datendurchsatz per Massen-Parallelsequenzierung und somit der Analyse von vielen unbekannt DNA-Varianten einer hohen Stichprobenzahl. Es bedarf jedoch Fachpersonals zur Test-Durchführung und Datenanalyse. INNO-LiPa und TG stellen effiziente, einfach praktikable und kostengünstigere Testsysteme dar für quantitativ kleinere Analysen. Für den klinischen Alltag sind die zuletzt genannten Systeme besser geeignet, allerdings mit der Gefahr möglicherweise im Verlauf relevante Minorvarianten zu verpassen. Weitere Studien, ab welcher Prävalenz die Varianten von phänotypischer Resistenz und somit Relevanz sind, wären sinnvoll um die Gefahr der Nicht-Detektion von Varianten besser einordnen zu können.

Es handelt sich um eine kleine heterogene Kohorte mit relativ kurzer Beobachtungsdauer, welche retrospektiv beobachtet wird. Leider ist nicht zu allen Zeitpunkten ein Serumsample verfügbar bzw. amplifizierbar. Aufgrund der kleinen Größe der Kohorte können nur bedingt statistischen Vergleiche durchgeführt werden und somit keine allgemein gültigen Therapieempfehlungen abgeleitet werden. Weitere anzahlstärkere Langzeitstudien sind notwendig um die in dieser Studie beobachtete Tendenz der negativen Beeinflussung von ADV-Resistenzvarianten auf die TDF-Monotherapie zu bestätigen.

8 Literaturverzeichnis

1. Ganem, D. & Prince, A. M. A. M. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.* **350**, 1118–29 (2004).
2. Ott, J. J., Stevens, G. A., Groeger, J. & Wiersma, S. T. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. *Vaccine* **30**, 2212–9 (2012).
3. WHO | Hepatitis B. (World Health Organization, 2015). at <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
4. Beck, J. & Nassal, M. Hepatitis B virus replication. *World J. Gastroenterol.* **13**, 48–64 (2007).
5. Nowak, M. A. *et al.* Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 4398–402 (1996).
6. Osiowy, C., Giles, E., Tanaka, Y., Mizokami, M. & Minuk, G. Y. Molecular Evolution of Hepatitis B Virus over 25 Years. *J. Virol.* **80**, 10307–10314 (2006).
7. Domingo, E., Sheldon, J. & Perales, C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 159–216 (2012).
8. Ganem, D. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **168**, 61–83 (1991).
9. Ganem, D. Virology. The X files--one step closer to closure. *Science* **294**, 2299–300 (2001).
10. Allen, M. I. *et al.* Identification and characterization of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. Lamivudine Clinical Investigation Group. *Hepatology* **27**, 1670–7 (1998).
11. Stuyver, L. J. *et al.* Nomenclature for antiviral-resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology* **33**, 751–757 (2001).
12. Zoulim, F. & Locarnini, S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology* **137**, 1593–608.e1–2 (2009).
13. Cornberg, M. *et al.* [Prophylaxis, diagnosis and therapy of hepatitis B virus infection - the German guideline]. *Z. Gastroenterol.* **49**, 871–930 (2011).
14. Warner, N. & Locarnini, S. The antiviral drug selected hepatitis B virus rtA181T/sW172* mutant has a dominant negative secretion defect and alters the typical profile of viral rebound. *Hepatology* **48**, 88–98 (2008).
15. European Association For The Study Of The Liver. EASL Clinical Practice Guidelines: management of chronic hepatitis B. *J. Hepatol.* **50**, 227–42 (2009).
16. Wedemeyer, H., Cornberg, M., Protzer, U., Berg, T. & Dollinger, M. M. [German guidelines on diagnosis and therapy of hepatitis B]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **132**, 1775–82 (2007).
17. Richman, D. D. The implications of drug resistance for strategies of combination antiviral chemotherapy. *Antiviral Res.* **29**, 31–33 (1996).
18. Lai, C. L. *et al.* A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. *N. Engl. J. Med.* **339**, 61–8 (1998).
19. Lai, C.-L. *et al.* Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin. Infect. Dis.* **36**, 687–96 (2003).
20. Marcellin, P. *et al.* Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **348**, 808–16 (2003).
21. Squires, K. *et al.* Tenofovir disoproxil fumarate in nucleoside-resistant HIV-1 infection: a randomized trial. *Ann. Intern. Med.* **139**, 313–20 (2003).

22. Gallant, J. E. *et al.* Efficacy and safety of tenofovir DF vs stavudine in combination therapy in antiretroviral-naïve patients: a 3-year randomized trial. *JAMA* **292**, 191–201 (2004).
23. van Bömmel, F., Wünsche, T., Schürmann, D. & Berg, T. Tenofovir treatment in patients with lamivudine-resistant hepatitis B mutants strongly affects viral replication. *Hepatology* **36**, 507–508 (2002).
24. Bani-Sadr, F., Palmer, P., Scieux, C. & Molina, J. M. Ninety-six-week efficacy of combination therapy with lamivudine and tenofovir in patients coinfecting with HIV-1 and wild-type hepatitis B virus. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 1062–4 (2004).
25. Núñez, M. *et al.* Activity of tenofovir on hepatitis B virus replication in HIV-co-infected patients failing or partially responding to lamivudine. *AIDS* **16**, 2352–4 (2002).
26. Dore, G. J. *et al.* Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate in antiretroviral therapy-naïve and -experienced patients coinfecting with HIV-1 and hepatitis B virus. *J. Infect. Dis.* **189**, 1185–92 (2004).
27. van Bömmel, F. *et al.* Comparison of adefovir and tenofovir in the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection. *Hepatology* **40**, 1421–5 (2004).
28. van Bömmel, F. *et al.* Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) infection and high HBV DNA level during adefovir therapy. *Hepatology* **44**, 318–25 (2006).
29. van Bömmel, F. *et al.* Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. *Hepatology* **51**, 73–80 (2010).
30. De Clercq, E. & Holý, A. Acyclic nucleoside phosphonates: a key class of antiviral drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **4**, 928–40 (2005).
31. Snow-Lampart, A. *et al.* No resistance to tenofovir disoproxil fumarate detected after up to 144 weeks of therapy in patients monoinfected with chronic hepatitis B virus. *Hepatology* **53**, 763–73 (2011).
32. Qi, X., Xiong, S., Yang, H., Miller, M. & Delaney, W. E. In vitro susceptibility of adefovir-associated hepatitis B virus polymerase mutations to other antiviral agents. *Antivir. Ther.* **12**, 355–62 (2007).
33. Patterson, S. J. *et al.* Tenofovir disoproxil fumarate rescue therapy following failure of both lamivudine and adefovir dipivoxil in chronic hepatitis B. *Gut* **60**, 247–54 (2011).
34. Lok, A. S. F. *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.* **40**, 3729–3734 (2002).
35. Zoulim, F. New nucleic acid diagnostic tests in viral hepatitis. *Semin. Liver Dis.* **26**, 309–17 (2006).
36. Margulies, M. *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376–80 (2005).
37. Wang, C., Mitsuya, Y., Gharizadeh, B., Ronaghi, M. & Shafer, R. W. Characterization of mutation spectra with ultra-deep pyrosequencing: application to HIV-1 drug resistance. *Genome Res.* **17**, 1195–201 (2007).
38. Solmone, M. *et al.* Use of massively parallel ultradeep pyrosequencing to characterize the genetic diversity of hepatitis B virus in drug-resistant and drug-naïve patients and to detect minor variants in reverse transcriptase and hepatitis B S antigen. *J. Virol.* **83**, 1718–26 (2009).
39. Margeridon-Thermet, S. *et al.* Ultra-deep pyrosequencing of hepatitis B virus quasispecies from nucleoside and nucleotide reverse-transcriptase inhibitor (NRTI)-treated patients and NRTI-naïve patients. *J. Infect. Dis.* **199**, 1275–85 (2009).
40. Sheldon, J. *et al.* Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir. Ther.* **10**, 727–34 (2005).
41. Rodriguez-Frias, F. *et al.* Adefovir for chronic hepatitis B treatment: identification of virological

- markers linked to therapy response. *Antivir. Ther.* **13**, 991–9 (2008).
42. Svicher, V. *et al.* Role of hepatitis B virus genetic barrier in drug-resistance and immune-escape development. *Dig. Liver Dis.* **43**, 975–83 (2011).
 43. *GS FLX Sequencing Method Manual. Genome* (2007).
 44. *GS FLX Titanium Sequencing Kit XLR70.*
 45. *GS FLX Amplicon DNA Library Preparation Method Manual. Library (Lond).* (2007).
 46. *Using Multiplex Identifier (MID) Adaptors for the GS FLX Titanium Chemistry- Technical Bulletin. Life Sci.* (2009).
 47. *GS FLX emPCR Method Manual.* (2007).
 48. Siemens Healthcare Diagnostic Inc., Tarrytown, NY, U. *TRUGENE HBV Genotyping Kit Manual for OpenGene™ DNA Sequencing System. 07364707*, (2008).
 49. Heathcote, E. J. *et al.* Three-year efficacy and safety of tenofovir disoproxil fumarate treatment for chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **140**, 132–43 (2011).
 50. Berg, T. *et al.* Tenofovir is effective alone or with emtricitabine in adefovir-treated patients with chronic-hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* **139**, 1207–17 (2010).
 51. van Bömmel, F. *et al.* Evolution of adefovir-resistant HBV polymerase gene variants after switching to tenofovir disoproxil fumarate monotherapy. *Antivir. Ther.* **17**, 1049–58 (2012).
 52. Marcellin, P. *et al.* Tenofovir disoproxil fumarate versus adefovir dipivoxil for chronic hepatitis B. *N. Engl. J. Med.* **359**, 2442–55 (2008).
 53. Shaw, T., Bartholomeusz, A. & Locarnini, S. HBV drug resistance: mechanisms, detection and interpretation. *J. Hepatol.* **44**, 593–606 (2006).
 54. Tan, J. *et al.* Tenofovir monotherapy is effective in hepatitis B patients with antiviral treatment failure to adefovir in the absence of adefovir-resistant mutations. *J. Hepatol.* **48**, 391–8 (2008).
 55. Brunelle, M.-N. *et al.* Susceptibility to antivirals of a human HBV strain with mutations conferring resistance to both lamivudine and adefovir. *Hepatology* **41**, 1391–8 (2005).
 56. Delaney, W. E. *et al.* Intracellular metabolism and in vitro activity of tenofovir against hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 2471–7 (2006).
 57. Villet, S. *et al.* Impact of hepatitis B virus rtA181V/T mutants on hepatitis B treatment failure. *J. Hepatol.* **48**, 747–55 (2008).
 58. Keskin, O. *et al.* Efficacy of tenofovir in adefovir-experienced patients compared with treatment-naïve patients with chronic hepatitis B. *Antivir. Ther.* (2014). doi:10.3851/IMP2732
 59. Fung, S. *et al.* Randomized comparison of tenofovir disoproxil fumarate vs emtricitabine and tenofovir disoproxil fumarate in patients with lamivudine-resistant chronic hepatitis B. *Gastroenterology* **146**, 980–8 (2014).
 60. Corsa, A. C. *et al.* No Resistance to Tenofovir Disoproxil Fumarate Through 96 Weeks of Treatment in Patients With Lamivudine-Resistant Chronic Hepatitis B. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* (2014). doi:10.1016/j.cgh.2014.05.024
 61. Kim, Y. J. *et al.* Tenofovir rescue therapy for chronic hepatitis B patients after multiple treatment failures. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6996–7002 (2012).
 62. Kitrinou, K. M. *et al.* No detectable resistance to tenofovir disoproxil fumarate after 6 years of therapy in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* **59**, 434–42 (2014).
 63. Svarovskaia, E. S. *et al.* Hepatitis B virus wild-type and rtN236T populations show similar early HBV DNA decline in adefovir refractory patients on a tenofovir-based regimen. *J. Viral Hepat.* **20**, 131–40 (2013).
 64. Schildgen, O. *et al.* Variant of hepatitis B virus with primary resistance to adefovir. *N. Engl. J. Med.*

- 354**, 1807–12 (2006).
65. Curtis, M., Zhu, Y. & Borroto-Esoda, K. Hepatitis B virus containing the I233V mutation in the polymerase reverse-transcriptase domain remains sensitive to inhibition by adefovir. *J. Infect. Dis.* **196**, 1483–6 (2007).
 66. Audsley, J. *et al.* Prolonged use of tenofovir in HIV/hepatitis B virus (HBV)-coinfected individuals does not lead to HBV polymerase mutations and is associated with persistence of lamivudine HBV polymerase mutations. *HIV Med.* **10**, 229–35 (2009).
 67. Sede, M. *et al.* Long-term monitoring drug resistance by ultra-deep pyrosequencing in a chronic hepatitis B virus (HBV)-infected patient exposed to several unsuccessful therapy schemes. *Antiviral Res.* **94**, 184–7 (2012).
 68. Reijnders, J. G. P. *et al.* Antiviral effect of entecavir in chronic hepatitis B: influence of prior exposure to nucleos(t)ide analogues. *J. Hepatol.* **52**, 493–500 (2010).
 69. Tenney, D. J. *et al.* Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology* **49**, 1503–14 (2009).
 70. Lada, O. *et al.* In vitro susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to adefovir and tenofovir. *Antivir. Ther.* **9**, 353–63 (2004).
 71. Yang, H. *et al.* Cross-resistance testing of next-generation nucleoside and nucleotide analogues against lamivudine-resistant HBV. *Antivir. Ther.* **10**, 625–33 (2005).
 72. Baran, B. *et al.* Efficacy of tenofovir in patients with Lamivudine failure is not different from that in nucleoside/nucleotide analogue-naïve patients with chronic hepatitis B. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1790–6 (2013).
 73. Pan, C. Q. *et al.* Response to tenofovir monotherapy in chronic hepatitis B patients with prior suboptimal response to entecavir. *J. Viral Hepat.* **19**, 213–9 (2012).
 74. Torresi, J. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *J. Clin. Virol.* **25**, 97–106 (2002).
 75. Rodriguez-Frías, F. *et al.* Ultra-deep pyrosequencing detects conserved genomic sites and quantifies linkage of drug-resistant amino acid changes in the hepatitis B virus genome. *PLoS One* **7**, e37874 (2012).
 76. Lee, H. W., Chang, H. Y., Yang, S. Y. & Kim, H. J. Viral evolutionary changes during tenofovir treatment in a chronic hepatitis B patient with sequential nucleos(t)ide therapy. *J. Clin. Virol.* **60**, 313–6 (2014).
 77. Schildgen, O. *et al.* Successful therapy of hepatitis B with tenofovir in HIV-infected patients failing previous adefovir and lamivudine treatment. *AIDS* **18**, 2325–7 (2004).
 78. Bartholomeusz, A. & Locarnini, S. A. Antiviral drug resistance: clinical consequences and molecular aspects. *Semin. Liver Dis.* **26**, 162–70 (2006).
 79. Karatayli, E. *et al.* Molecular characterization of a novel entecavir mutation pattern isolated from a multi-drug refractory patient with chronic hepatitis B infection. *J. Clin. Virol.* **53**, 130–4 (2012).
 80. Yim, H. J. *et al.* Evolution of multi-drug resistant hepatitis B virus during sequential therapy. *Hepatology* **44**, 703–12 (2006).
 81. Ciftci, S. *et al.* Analysis of potential antiviral resistance mutation profiles within the HBV reverse transcriptase in untreated chronic hepatitis B patients using an ultra-deep pyrosequencing method. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **79**, 25–30 (2014).
 82. Angus, P. *et al.* Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology* **125**, 292–7 (2003).
 83. Liu, Y., Miller, M. D. & Kitrinos, K. M. HBV clinical isolates expressing adefovir resistance mutations show similar tenofovir susceptibilities across genotypes B, C and D. *Liver Int.* **34**, 1025–32 (2014).

84. Lee, S.-A., Kim, K., Kim, H. & Kim, B.-J. Nucleotide change of codon 182 in the surface gene of hepatitis B virus genotype C leading to truncated surface protein is associated with progression of liver diseases. *J. Hepatol.* **56**, 63–9 (2012).
85. Torresi, J. *et al.* Reduced antigenicity of the hepatitis B virus HBsAg protein arising as a consequence of sequence changes in the overlapping polymerase gene that are selected by lamivudine therapy. *Virology* **293**, 305–13 (2002).
86. Sloan, R. D. *et al.* Antiviral resistance mutations potentiate hepatitis B virus immune evasion through disruption of its surface antigen a determinant. *Antivir. Ther.* **13**, 439–47 (2008).
87. Gordon, S. C. *et al.* Efficacy of tenofovir disoproxil fumarate at 240 weeks in patients with chronic hepatitis B with high baseline viral load. *Hepatology* **58**, 505–13 (2013).
88. Lavocat, F. *et al.* Similar evolution of hepatitis B virus quasispecies in patients with incomplete adefovir response receiving tenofovir/emtricitabine combination or tenofovir monotherapy. *J. Hepatol.* **59**, 684–95 (2013).
89. Lindström, A., Odeberg, J. & Albert, J. Pyrosequencing for detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4788–95 (2004).
90. Ijaz, S. *et al.* Dynamics of lamivudine-resistant hepatitis B virus during adefovir monotherapy versus lamivudine plus adefovir combination therapy. *J. Med. Virol.* **80**, 1160–70 (2008).
91. Mello, F. C. A., Lago, B. V., Lewis-Ximenez, L. L., Fernandes, C. A. & Gomes, S. A. Detection of mixed populations of wild-type and YMDD hepatitis B variants by pyrosequencing in acutely and chronically infected patients. *BMC Microbiol.* **12**, 96 (2012).
92. Chevaliez, S., Rodriguez, C. & Pawlotsky, J.-M. New virologic tools for management of chronic hepatitis B and C. *Gastroenterology* **142**, 1303–1313.e1 (2012).
93. Margeridon-Thermet, S. *et al.* Low-level persistence of drug resistance mutations in hepatitis B virus-infected subjects with a past history of Lamivudine treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 343–9 (2013).
94. Mese, S. *et al.* Role of the line probe assay INNO-LiPA HBV DR and ultradeep pyrosequencing in detecting resistance mutations to nucleoside/nucleotide analogues in viral samples isolated from chronic hepatitis B patients. *J. Gen. Virol.* **94**, 2729–38 (2013).
95. Shendure, J. & Ji, H. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* **26**, 1135–45 (2008).

9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwertige Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit werde im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in dieser Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum: 01.08.2016

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Friederike Boer". The signature is written in a cursive, flowing style.

10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Friederike Bock hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: van Bömmel, F. *et al.* Evolution of ADV-resistant HBV polymerase gene variants after switching to TDF disoproxil fumarate monotherapy. *Antivir. Ther.* **17**, 1049–58 (2012).

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung

11 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Prof. Dr. med. Thomas Berg und Dr. med. Florian van Bömmel für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und die Betreuung während der Durchführung dieser Arbeit.

Dr. Bernd Timmermann, Max Planck Institut für Molekulare Genetik, Berlin und Bastian Beggel, Max Planck Institut für Informatik, Computational Biology and Applied Algorithmics, Saarbrücken danke ich für die wertvolle Kooperation bezüglich der Tiefenpyrosequenzierung.

Ebenso gilt mein Dank Frau Barbara Malik, technische Assistentin, und den weiteren Labormitarbeitern für die angenehme Atmosphäre und produktiven Anregungen während der experimentellen Laborarbeiten an der Charité–Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum.

Besonderer Dank geht an meine Familie und Freunde für die fortwährende geduldige Unterstützung während der Projektdauer und darüber hinaus.